

UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des sciences de l'ingénieur

Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Génie de l'environnement

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.

Par

MEKNACHI Abdellah

Devant le jury composé de

M.W. Naceur	Professeur, U. de Blida	Président
M. Boulahdid	Professeur, ENSSMAL, Alger	Examineur
M. Abouseoud	Maître de conférence, U de Médéa	Examineur
A. Badis	Maître de conférence, U de Blida	Rapporteur

Avril 2010

.(tilapia *Oreochromis niloticus*

(biomarqueurs)

Catalase

Protéase

Catalase

Protéase

Catalase

Cu²⁺

Protéase

..(bioindicateurs)

Mytilus galloprovincialis

,(Catalase)

Protéase

,Protéase ,Catalase ,*Oreochromis niloticus* ,

,*Mytilus galloprovincialis*

RESUME

Ce travail a visé l'étude en première partie de l'effet des métaux traces sur les différents biomarqueurs générés chez le poisson tilapia *Oreochromis niloticus*. Parmi les biomarqueurs, la mesure de marqueurs biochimiques chez les poissons paraît particulièrement intéressante en termes de sensibilité, spécificité et précocité. L'induction de l'enzyme antioxydante Catalase, mesurée au niveau du foie et des branchies, est le signe de l'exposition des poissons au stress oxydatif causé par les polluants métalliques. Par ailleurs, l'augmentation des dépenses énergétiques allouées à la défense et traduite par l'induction de l'enzyme antioxydante CAT ainsi que 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 au xénobiotique (Cu^{2+}) dans le test chronique. De ce fait, une forte pertinence est accordée aux biomarqueurs CAT et protéase comme étant un signal précoce de la dégradation de l'état de santé des organismes indicateurs.

Dans la deuxième partie de ce travail, on a procédé à la transplantation des moules *Mytilus galloprovincialis* aux niveaux de trois ports de pêches de la wilaya de Tipaza dans le but d'évaluer le degré de pollution de ces derniers tout en validant les différents biomarqueurs étudiés. En effet, une corrélation positive a été établie entre le niveau de pollution des différentes localités de test et le degré d'induction de l'activité de défense CAT. De même, les activités de l'enzyme antioxydante étaient proportionnelles à la concentration en cuivre accumulé par les moules transplantées. Par ailleurs, L'inhibition de l'activité de l'enzyme digestive protéase a été corrélée liée directement aux effets des polluants présents dans les différentes localités de contamination. Aussi, la protéase s'est montrée plus sensible au manque de ressources nutritionnelles dans le site de décontamination.

Enfin, les différents mécanismes de capture et d'élimination des éléments traces chez les organismes aquatiques ont fait l'objet d'une modélisation par des modèles cinétiques à bases physiologiques.

Mots clés : métaux traces, biomarqueurs, *Oreochromis niloticus*, Catalase, stress oxydatif, protéase, *Mytilus galloprovincialis*, ports de pêches, modèles cinétiques à bases physiologiques.

SUMMARY

This work aimed studies it in first part of the effect of metals traces on the various biomarqueurs generated in the fish tilapia *Oreochromis niloticus*. Among the biomarqueurs, the measurement of biochemical markers in fish appears particularly interesting in terms of sensitivity, specificity and precocity. The induction of the antioxydant enzyme Catalase, measured on the level of the liver and the gills, is the sign of the exposure of fish to the oxydative stress caused by the metal pollutants. In addition, the increase in the energy expenditure allocated with the defense and translated by the induction of antioxydant enzyme CAT as well as the disturbance of the digestive enzyme protease is at the origin of the mischief of biometrics and the bioenergetics' metabolism following the exposure to xenobiotic (Cu^{2+} in the chronic test). So a strong relevance is granted to biomarqueurs CAT and protease as being an early signal of the degradation of the health of the indicating organisms.

In the second part of this work, one carried out the transplantation of the mussels *Mytilus galloprovincialis* on the levels of three fishing ports of the wilaya of Tipaza with an aim of evaluating the degree of pollution of the latter while validating the various studied biomarqueurs. Indeed a positive correlation was established between the level of pollution of the various localities of test and the degrees of induction of the activity of defense CAT. In the same way, the activities of the antioxydant enzyme proportional to the copper concentration accumulated by the mussels were transplanted. In addition, the inhibition of the activity of the digestive enzyme protease was related directly to the effects of the pollutants present in the various localities of contamination. Also, the protease was shown more sensitive to the lack of nutritional resources in the site of decontamination.

Lastly, the various mechanisms of capture and elimination of the elements traces at the watery organizations were the subject of a modeling by kinetic models at physiological bases.

Key words: metals traces, biomarkers, *Oreochromis niloticus*, Catalase, oxidative stress, protease, *Mytilus galloprovincialis*, fishing ports, kinetic models at physiological bases.

REMERCIEMENT

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude en vers DIEU pour sa clémence et pour m'avoir donné le courage, la volonté et surtout la santé pour réaliser ce mémoire.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur le Dr Badis Abdelmalek, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir confié ce sujet de thèse. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez portée pendant ces années.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude aux membres du jury : Monsieur le Pr Naceur Mohamed Wahibe de l'université de Blida, Monsieur le Pr Boulahdid Mostefa de l'ENSSMAL-Alger et Monsieur le Dr Abouseoud Mahmoud de l'université de Médéa qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je tiens à vous remercier sincèrement et j'espère que vous serez aussi intéressés à lire ce document que je l'ai été à l'écrire.

Je suis très reconnaissant envers deux autres personnes qui ont énormément compté dans l'aboutissement de ce travail ; Messieurs Djelali Mostapha et Anane Rachide du CNRDPA, avec qui j'ai passé des moments supers autant sur le plan scientifique qu'humain. Merci à vous deux. Vous m'avez fait confiance et vous m'avez permis d'avancer par vos conseils et votre aide afin de pouvoir clôturer ce travail. Je vous remercie d'avoir apporté vos connaissances et d'avoir passé de nombreux moments à m'aider dans mes expériences aux laboratoires et lors des différentes campagnes de transplantation et d'échantillonnage des moules dans le programme de surveillance active.

Je suis également très reconnaissant aux stagiaires qui ont travaillé à mes côtés : Abed S, Sami M, Lamouri F et Zouaoui F.

Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur le Dr Hachmen Mouloud, ex directeur du CNDPA, pour ses grandes qualités aussi bien humaines que

professionnelles. Merci également à Monsieur Ghazali Mohamed directeur du CNRDPA pour m'avoir permis de réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles.

Un immense merci à l'ensemble des membres du laboratoire CNRDPA, pour m'avoir aidé à réaliser mes travaux dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie également le personnel du service ressource vivante pour m'avoir fourni le matériel biologique de tests (poisson tilapia), et tout particulièrement M. Guenachi B et Bouklaleche B, pour leurs aides et soutiens constants avant et lors de la réalisation de ce projet.

Je veux également vous remercier, vous, le personnel que j'ai connu au CNRDPA pour vos caractères bien sympathiques et vos aides.

Merci également aux pêcheurs du port de gouraya et plus particulièrement à M Ismail, pour leurs collaboration lors des campagnes de transplantation et d'échantillonnage des moules. Merci beaucoup.

Mes plus vifs remerciements vont à l'ensemble du département chimie industrielle de l'Université de Blida, tout particulièrement au Dr Boutoumi, Dr Ouzen, Mr Dahmouce, Zoubir, Morad et Mouloud.

Merci également Mr Harkati Yazid et Mr Mahdi de l'INSFP-Blida pour m'avoir accueilli à plusieurs reprises au sein des laboratoires. Merci encore à Mr Medjadj T du CRN-Alger.

Je tiens évidemment à accorder mon soutien et mon estime à mes collègues étudiants.

Je ne serai bien sûr jamais arrivé là sans l'aide et le soutien de ma famille. Merci à mes parents pour avoir toujours cru en moi, cru que j'y arriverai, parfois même plus que moi, merci de m'avoir soutenu dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci pour tout. J'espère vous rendre le bonheur que vous m'avez toujours apporté. Je remercie tout particulièrement mon frère Mohamed pour ses biens faits et pour l'aide qu'il m'a apporté lors de la rédaction de ce manuscrit.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENT.....	4
TABLE DES MATIERES.....	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	8
INTRODUCTION	12
1. LES POLLUANTS METALIQUES : PROPRIETES TOXICOLOGIQUES, BIOACCUMULATION ET TECHNIQUE DE BIOSURVEILLANCE	15
1.1 Les métaux	15
1.2 Le Cuivre « Cu »	17
1.3 Le Cadmium « Cd »	20
1.4 Le Plomb « Pb »	22
1.5 L'Argent « Ag »	24
1.6 Spéciation et biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques.....	26
1.7 Processus physiologiques de bioaccumulation des métaux	28
1.8 Surveillance de la qualité de l'environnement	35
2. OUTILS D'EVALUATION EN ECOTOXICOLOGIE	38
2.1 Introduction	38
2.2 Ecotoxicologie	39
2.3 Indicateurs biologiques	42
2.4 Réponses à un stress au sein d'un système biologique	45
2.5 Etude du stress oxydant	51
2.6 Perturbation du métabolisme énergétique	56
3. CHOIX DU MATERIEL BIOLOGIQUE TEST.....	58
3.1 Modèle poisson	58

3.2 Choix du matériel biologique test : Moule	66
4. MATERIEL ET METHODES: STRATEGIE EXPERIMENTALE, DISPOSITIFS ET METHODES ANALYTIQUES	70
4.1 Modèle Poissons	70
4.1.1 Tests d'écotoxicité chronique	71
4.1.2 Tests d'écotoxicité courtes durées	72
4.2 Model Moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	86
4.2.1 Procédure de transplantation	87
4.2.2 Compagnes d'échantillonnage et stratégie expérimentale	88
5. RESULTATS ET DISCUSSION MODELE POISSON	93
5.1/- Model poisson	93
5.1.1 Test d'écotoxicité chronique	93
5.1.2 Test d'écotoxicité courte durée	123
5.2 Model moule	140
5.2.1/- Paramètres hydrologiques	140
5.2.2/- Résultats des dosages biochimiques des biomarqueurs	143
5.2.3/- Résultats des mesures biométriques	152
6. MODILISATION DE LA BIOACCUMULATION	157
6.1 Introduction	157
6.2 Les modèles cinétiques à compartiments	159
6.3 Influence de la matière organique sur la biodisponibilité et la bioaccumulation des éléments traces	164
6.4 Les modèles cinétiques à base physiologique	168
CONCLUSION	179
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS	184
APPENDICE	186
GLOSSAIRE	193
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	196

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 Cycle géochimique simplifié des métaux	5
Figure 1.2 réactions d'échanges du métal <i>M</i> avec les constituants organiques et inorganiques du milieu	16
Figure 1.3 Modèle conceptuel de certains processus physico-chimiques importants menant à la prise d'un oligo-métal par micro-organisme aquatique	20
Figure 1.4 Schéma récapitulatif du modèle de l'ion libre	20
Figure 2.1 Représentation graphique de l'ordre séquentiel des réponses à un stress au sein d'un système biologique	35
Figure 2.2 schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène sur les macromolécules	42
Figure 2.3 Schéma représentant les réactions catalysées par les 3 principales enzymes antioxydantes	44
Figure 3.1 Caractéristiques morphologiques spécifiques de <i>Tilapia nilotica</i> adulte avec des barres verticales noires typiques sur la nageoire caudale	49
Figure 3.2 La moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	57
Figure 3.3 Corps et morphologie de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	58
Figure 4.1 Dispositif expérimental	60
Figure 4.2 Planning expérimental pour les périodes d'étude (test chronique)	61
Figure 4.3 Planning expérimental pour les périodes d'études (tests courte durée)	62

Figure 4.4 Procédures expérimentales (dosages biochimiques)	69
Figure 4.5 Planning expérimental pour les périodes de contamination, décontamination sur les différents sites d'études	77
Figure 4.6 campagnes d'échantillonnage (fréquence de visite, mesures in situ et analyses au laboratoire)	78
Figure 5.1 Evolution de la température durant la journée et pendant tout le cycle expérimental	84
Figure 5.2 Evolution de la conductivité (Cd), TDS et la salinité (Sal) durant la journée et pendant tout le cycle expérimental	85
Figure 5.3 Evolution du pH durant la journée et pendant tout le cycle expérimental	86
Figure 5.4 Evolution de l'oxygène dissous durant la journée et pendant tout le cycle expérimental	87
Figure 5.5 Evolution de l'excrétion azotée durant le cycle expérimental	89
Figure 5.6 Evolution des poids moyens des tilapias durant la période d'étude	94
Figure 5.7 Variation du taux de croissance spécifique (TCS) durant la période d'étude	94
Figure 5.8 Relation taille (L) - Poids (P) des tilapias	96
Figure 5.9 Etude de l'effet du cuivre sur les rapports somatiques	96
Figure 5.10 Etude de l'effet du cuivre sur l'activité de la catalase dans le foie des poissons tilapias <i>Oreochromis niloticus</i>	102
Figure 5.11 Etude de l'effet du cuivre sur l'activité de la catalase dans les branchies des poissons tilapias <i>Oreochromis niloticus</i>	103
Figure 5.12 Etude de l'effet du cuivre sur l'activité de la protéase dans l'intestin des poissons tilapias <i>Oreochromis niloticus</i>	105

Figure 5.13 Evolution de la concentration moyenne en cuivre total dans l'eau des aquariums de contamination	110
Figure 5.14 Etude de l'effet des éléments métalliques (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur l'excrétion azotée	114
Figure 5.15 : Etude de l'effet des éléments métalliques (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur l'excrétion phosphorée	115
Figure 5.16 : Etude de l'effet des éléments traces (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur les taux de croissance spécifiques TCS	117
Figure 5.17 Etude de l'effet des éléments traces (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur les rapports hépatosomatique RHS	118
Figure 5.18 Etude de l'effet des éléments traces (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur les rapports gonadosomatique RGS	119
Figure 5.19 Etude de l'effet de la concentration en métal sur l'activité de la catalase dans le foie des tilapias <i>Oreochromis niloticus</i>	122
Figure 5.20 Etude de l'effet de la concentration en métal sur l'activité de la catalase dans les branchies des tilapias <i>Oreochromis niloticus</i>	124
Figure 5.21 Etude de l'effet de la concentration en métal sur l'activité protéase dans l'intestin des tilapias <i>Oreochromis niloticus</i>	127
Figure 5.22 Variation des teneurs en sels nutritifs dans les sites de contamination	131
Figure 5.23 Variation de l'activité catalase durant la période d'étude	133
Figure 5.24 Variation de l'activité protéase durant la période d'étude	139
Figure 5.25 Variation de l'indice de condition (IC) dans les différentes localité de tests en fonction du temps	142
Figure 5.26 Variation de la croissance des moules durant la période d'étude	143

Figure 6.1 Schéma conceptuel type d'un modèle de bioaccumulation d'un organisme représenté par un seul compartiment	149
Figure 6.2 Modèle de bioaccumulation chez les organismes aquatiques	151
Figure 6.3 schéma de répartition d'un élément trace dans l'environnement aquatique	154
Figure 6.4 Capture et élimination des micropolluants chez les organismes	158
Figure 6.5 : Mécanismes de capture et d'élimination chez les poissons	159
Tableau 1.1 Comparaison entre stratégies in situ/transplants	26
Tableau 2.1 Avantages des différents compartiments trophiques	33
Tableau 5.1 Valeurs moyennes des paramètres bioénergétiques GPJ, R_{mx} et R_{mt}	90
Tableau 5.2 Valeurs moyennes des rapports des différentes formes d'énergie	92
Tableau 5.3 Valeurs moyennes des taux du glucose et des protéines dans le foie et les branchies des poissons tilapias	100
Tableau 5.4 Concentration du cuivre accumulé par les spécimens <i>O. niloticus</i>	102
Tableau 5.5 les espèces chimiques du cuivre les plus probablement présents en solution pour $7 < \text{pH} < 8$	108
Tableau 5.6 Valeurs moyennes des taux du glucose et des protéines dans le foie et les branchies des poissons tilapias <i>Oreochromis niloticus</i>	120
Tableau 5.7 degré de réponse de la CAT aux effets des éléments traces métalliques	126
Tableau 5.8 Caractéristiques physico-chimiques des sites d'échantillonnages	129
Tableau 5.9 Valeurs moyennes des sels nutritifs mesurées dans le site de référence et de décontamination	132
Tableau 5.10 Concentration du cuivre accumulé par les spécimens transplantés	135

INTRODUCTION

Les eaux de surface et côtières sont souvent contaminés par de nombreux produits chimiques dont des éléments métalliques rejetés par l'industrie, l'agriculture et les communautés urbaines. Les zones estuariennes et côtières avec les sites portuaires, sous forte influence continentale, sont les plus touchées par ce type de contamination. Les problèmes posés par la dispersion de polluants dans l'environnement ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique depuis maintenant de nombreuses décennies. La prise de conscience de la nécessité de préserver les écosystèmes aquatiques a ainsi fait émerger certaines questions, notamment celles du devenir de ces polluants dans l'environnement ainsi que de leurs effets sur les communautés animales et végétales [1, 2, 3].

Afin de connaître et de suivre l'évolution de la contamination chimique des écosystèmes aquatiques, des programmes de recherche et de surveillance s'appuyant sur le dosage des métaux dans l'eau et les sédiments ont été mis en œuvre. Cependant l'analyse chimique des polluants présents dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique, ce qui rend les techniques de prélèvement et de mesure assez complexes. Les risques de contamination au moment de l'échantillonnage et de l'analyse sont nombreux, rendant les mesures difficiles. Ces problèmes ont été surmontés par l'utilisation de techniques « ultra-propres » dans l'échantillonnage. Or, la mesure directe des contaminants dans l'eau fait appel à des techniques analytiques sophistiquées, difficilement applicables dans un réseau pérenne de mesure de routine de la qualité et de la santé des écosystèmes aquatiques. Par ailleurs, la variabilité temporelle du milieu littoral et limnique ne confère que peu de représentativité à une mesure ponctuelle dans la colonne d'eau. Enfin, une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus par les

populations animales ou végétales exposées aux polluants, et ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies...) ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants. 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 [1, 2, 3, 4, 5, 6].

C'est dans cette optique que Goldberg (1975) a proposé de suivre, à l'échelle internationale, les concentrations des contaminants dans les organismes vivants pour surveiller le milieu environnant. C'est le principe des « bioindicateurs quantitatifs » basé sur le fait que les organismes aquatiques concentrent les contaminants, en particulier les métaux traces, en relation avec les concentrations présentes dans le milieu [5].

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 bioindicateurs [05, 07, 08, 09].

D'autres outils, les biomarqueurs (reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel), sont utilisables pour étudier la biodisponibilité des contaminants [10, 11]. Ils sont alors étudiés plus pour leur contribution à la compréhension mécanistique de l'action des polluants [1, 2, 3, 11, 12, 13].

Dans ce contexte l'unité de recherche URDPA-CNRDPA-Boulsmail développe actuellement un programme de gestion des écosystèmes aquatiques et de surveillance environnementale contribuant aux recherches des indicateurs de pollution. Dans ce cadre nous avons réalisé nos recherches portant sur deux modèles biologiques : le Tilapia du Nil « *Oreochromis niloticus* » et la moule méditerranéenne « *Mytilus galloprovincialis* ». Ces deux espèces ont été employées afin de mieux cerner les thématiques de recherches de l'écotoxicologie moderne en laboratoire et *in situ*, dont l'objectif principal est la contribution à la recherche de biomarqueurs comme réponse précoce susceptible d'apporter une information

intégrée sur l'état de l'écosystème aquatique ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation.

Ce mémoire s'articule sur six chapitres :

Chapitre 1 : consacré à une synthèse bibliographique rassemblant des données concernant les polluants métalliques, leurs propriétés toxicologiques ainsi que les mécanismes de bioaccumulation et les techniques de biosurveillance environnementale.

Chapitre 2 : dédié à la présentation des outils d'évaluation écotoxicologique, en particulier les biomarqueurs, et présente ceux choisis pour notre étude sur l'interaction élément trace/bioindicateur.

Chapitre 3 : présente les modèles biologiques utilisés dans cette étude, le *Tilapia Oreochromis niloticus* et la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Chapitre 4 : décrit les stratégies expérimentales pour lesquelles nous avons opté compte tenu des objectifs de ce présent travail. Ainsi, les dispositifs, le matériel et méthodes analytiques mis en oeuvre tout au long de ce travail sont présentés.

Chapitre 5 : regroupe l'ensemble des résultats acquis au cours de différentes expérimentations au laboratoire et *in situ* avec leurs interprétations et discussions.

Chapitre 6 : comprend les généralités concernant les modèles de bioaccumulation et les différentes possibilités de traiter les variétés des modèles à base physiologiques.

Une synthèse et une conclusion générale couronne le travail effectué.

CHAPITRE 1

LES POLLUANTS METALIQUES : PROPRIETES TOXICOLOGIQUES, BIOACCUMULATION ET TECHNIQUE DE BIOSURVEILLANCE.

1.1 Les métaux

Les métaux sont des composants naturels de l'écorce terrestre dans laquelle on les rencontre généralement sous forme de minerais, associés entre eux et à de nombreux éléments (oxygène et soufre en particulier). Ils sont donc aussi naturellement présents dans les roches drainées par les eaux de surface et les nappes souterraines, de même que dans les poussières atmosphériques. Les volcans, de même que les incendies de forêt, sont des sources naturelles importantes de métaux pour la géosphère et l'hydrosphère [14].

Un métal est un élément chimique, issu le plus souvent d'un minerai doté d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'homme depuis l'Antiquité. Les utilisations des métaux sont multiples et très diversifiées, depuis les additifs de plomb dans les carburants jusqu'aux sels d'argent de l'industrie photographique, au nickel ou au cadmium des batteries d'accumulateurs, au zinc des gouttières ou au chrome des aciers inoxydables, au cuivre de l'industrie électrique ou à l'arsenic des produits phytosanitaires. Les sources de contamination le sont par conséquent aussi. Durant toutes les phases d'élaboration, d'utilisation et/ou de recyclage de ces produits, des métaux sont rejetés dans l'environnement, soit directement dans les eaux continentales ou marines, soit dans l'atmosphère transportés par les vents, associés aux aérosols avant de se déposer par voie sèche ou humide à la surface de la terre ou de l'océan [15].

Ainsi, les métaux traces sont présents dans tous les compartiments de l'environnement (fig 1.1) et contribuent surtout à la dégradation des écosystèmes

aquatiques et leurs biodiversités [07]. Enfin, les conséquences de telle pollution, que soient sanitaires (liées à l'ingestion d'eau, de poissons...), écologiques (qui ont trait à la dégradation du milieu biologique), esthétiques (perturbation de l'image d'un milieu), industrielles (la quantité et la qualité des eaux requises pour les utilisations industrielles est souvent très élevées) ou agricoles (la texture du sol, sa flore bactérienne, les cultures et le bétail, sont sensibles à la qualité de l'eau) ont toujours des répercussions socio-économiques [16].

Certains métaux, comme le fer, le cuivre ou le zinc, sont essentiels aux organismes vivants parce qu'ils sont nécessaires à la structure moléculaire de nombreuses co-enzymes. Cependant, au-delà d'une certaine concentration, ils deviennent toxiques. D'autres éléments traces comme le mercure, le plomb ou le cadmium n'ont pas de rôle biologique apparent et sont toxiques même à faibles concentrations [17].

Présent dans l'hydrosphère, les métaux traces contaminent progressivement les écosystèmes aquatiques : l'eau, les sédiments et les organismes vivants de ce système. Ces trois compartiments sont interdépendants ; il existe en effet des échanges entre les phases aqueuse, solide et biotique. Les métaux sont donc distribués entre ces trois phases. Par ailleurs, les métaux sont présents au sein des différentes phases, sous différentes formes chimiques. La spéciation chimique des métaux traces dans les environnements aquatiques dépend des facteurs physico-chimiques du milieu (température, dureté, pH, matière organique...), ainsi que les propriétés même des métaux [17, 18].

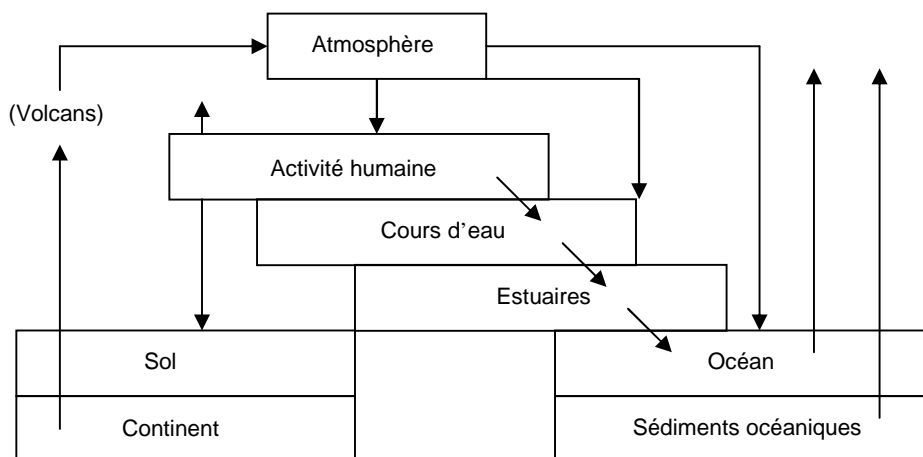


Figure 1.1: Cycle géochimique simplifié des métaux [15].

L'activité humaine n'a apporté aucun changement dans les volumes de métaux traces, il n'y a ni création, ni suppression [15]. La plupart des éléments traces se trouve initialement dans la croûte terrestre, cependant, le flux anthropogénique de ces éléments vers l'hydrosphère ou l'atmosphère dépasse souvent le flux naturel [19]. Ces actions entraînent un changement de la répartition des métaux, de leurs formes chimiques (ou spéciation) et des concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion (fumées, égouts, voitures...) [15, 19].

1.2 Le Cuivre « Cu »

1.2.1 Cycle et sources naturelles et anthropiques

Le cuivre est présent dans l'environnement de manière ubiquitaire. Sa concentration dans l'écorce terrestre est estimée à environ 70 ppm (30 à 100 ppm) [5, 20]. Le transport par le vent des poussières de sol, les éruptions volcaniques, les décompositions végétales, les feux de forêts et les aérosols marins constituent les principales sources naturelles d'exposition [20]. Les principales sources anthropiques sont :

- L'industrie du cuivre et des métaux en général ;
- L'industrie du bois ;
- L'incinération des ordures ménagères ;
- La combustion de charbon, d'huile et d'essence ;
- La fabrication de fertilisants (phosphate).

Le milieu environnemental le plus exposé au cuivre est le sol : 97 % du cuivre libéré dans l'environnement s'y retrouve contre seulement environ 3 % dans les eaux et 0,04 % dans l'air [20, 21].

La contamination des sols est due principalement aux scories d'extraction et de broyage des minerais de cuivre dans lesquelles le cuivre est présent sous forme de sulfures ou de silicates insolubles. Les autres sources de contamination des sols sont les boues provenant des usines de traitement des eaux usées, de traitement et conservation du bois, les déchets de galvanoplastie, l'industrie du fer et de l'acier et les dépôts de cuivre non recyclés provenant de la plomberie et des installations

électriques [21, 22]. Dans les eaux, le cuivre provient pour la majeure partie de l'érosion des sols par les cours d'eau : 68 % ; de la contamination par le sulfate de cuivre : 13 % ; et des rejets d'eaux usées qui contiennent encore du cuivre, même après traitement [05]. Dans l'air, la principale source de contamination est l'entraînement de poussières de sol par le vent. Par ordre d'importance, les autres sources d'exposition ubiquitaire sont : l'activité volcanique, la décomposition végétale, les feux de forêts et les aérosols marins [22].

1.2.2 Propriétés biologiques et toxicité

Le cuivre est un élément essentiel chez l'homme et l'animal. Il est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques, notamment pour la formation d'hémoglobine et la maturation des polynucléaires neutrophiles. De plus, il est un co-facteur spécifique de nombreuses enzymes et métalloprotéines de structure [19, 20, 23, 24].

Chez l'homme l'absorption de cuivre est possible par toutes les voies mais elle s'effectue de manière prépondérante par voie orale et absorption gastro-intestinale [23]. En liaison avec ses fonctions organiques multiples, le cuivre présente une large distribution dans l'organisme via le sang associé à des protéines [24] dont la céruloplasmine (80-90 %), l'albumine et divers acides aminés [23]. Les plus fortes concentrations tissulaires en cuivre sont mesurées au niveau du foie, des muscles et de la moëlle osseuse [23]. Le foie est le principal organe cible avec des taux physiologiques chez l'adulte de 18 à 45 mg de cuivre/g de matière sèche. La demi-vie du cuivre dans le sang est de 13 à 33 jours. L'intervalle de valeurs physiologiques de cuivre dans le sérum est de 800 à 1200 µg/L. Ces valeurs sont plus élevées de 10 % chez la femme [22].

Le cuivre est un oligo-élément qui est associé à de nombreuses enzymes telles que la cytochrome oxydase, la superoxyde dismutase, la lysyl oxydase, la dopamine β –hydrolase. La cytotoxicité du cuivre observée lors d'intoxication se ferait par inhibition enzymatique du système pyruvate-oxydase par compétition au niveau des groupements sulfhydriles des protéines. La glucose-6-phospho-deshydrogénase et la glutathion-réductase sont inhibées (inhibition compétitive) proportionnellement à

la concentration intracellulaire du cuivre [22]. De plus, le cuivre en excès produit des radicaux libres responsables de lésions cellulaires au niveau de l'ADN et d'organites tels que les mitochondries ou les lysosomes [23].

La principale voie d'élimination du cuivre est la bile (80 % du cuivre hépatique) d'où une excrétion majoritairement (72 %) par voie fécale. L'excrétion urinaire de cuivre est très faible (0,5-3 %) soit environ 30-60 µg par jour chez l'adulte [23].

Les cas d'intoxications par l'eau de boisson correspondent à des doses élevées, de 35 à 200 mg/L, de cuivre. Les effets toxiques observés sont des vomissements, une léthargie, une anémie profonde liée à une hémolyse intravasculaire, une rhabdomyolyse. Surviennent secondairement une cytolyse hépatique par nécrose centrolobulaire et une insuffisance rénale aiguë (possible par simple nécrose tubulaire aiguë). Le syndrome dysentérique par toxicité directe sur la muqueuse digestive est responsable parfois d'hémorragies digestives. Les pertes hydroélectrolytiques peuvent s'accompagner d'une insuffisance rénale [22].

La toxicité du cuivre pour les organismes aquatiques est globalement basée sur ses interactions avec les protéines, enzymes, acides nucléiques et métabolites, de la paroi cellulaire, de la membrane et dans le cytoplasme. Le métal toxique ou bio disponible est transporté de la solution vers le cytoplasme, à travers la membrane. Ceci dépend de l'affinité relative du métal pour les ligands de la solution et le récepteur membranaire, ou de la répartition solution - membrane pour un complexe lipophile [25].

Pour les poissons au moins deux voies de pénétration du cuivre sont à considérer : les voies respiratoires et le système digestif. L'incorporation dans les cellules par l'une ou l'autre des voies va suivre les mêmes règles que pour un organisme unicellulaire : adsorption à la surface puis transport et diffusion à travers la membrane. Cependant, les conditions à la surface des cellules branchiales (contact direct avec l'eau environnante) ou épithéliales (milieu gastrique) sont fondamentalement différentes et les changements de spéciation du cuivre à l'intérieur de l'appareil digestif (désorption des particules due au changement de pH...) doivent être prises en compte [26].

La toxicité vis à vis des organismes marins dépend de la forme chimique du cuivre et de son état d'oxydation. En particulier, la concentration létale en 48 h pour 50 % des

larves d'huîtres plates serait de 1 à 3 µg/L et des inhibitions de croissance du phytoplancton se produisent à partir de 4 µg/L. Les caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, dureté, teneurs en autres inorganiques) agissent sur le degré de dissociation entre les formes métalliques et ioniques. Le cuivre complexé est moins toxique que le cuivre à l'état ionique [05].

1.3 Le Cadmium « Cd »

1.3.1 Cycle et sources naturelles et anthropiques

Le cadmium rejeté dans l'atmosphère provient de sources naturelles et anthropiques. Le cadmium présent dans la croûte terrestre peut être dispersé dans l'air par entraînement de particules provenant du sol et par les éruptions volcaniques. Cependant, les activités industrielles telles que le raffinage des métaux non ferreux, la combustion du charbon et des produits pétroliers, les incinérateurs d'ordures ménagères et la métallurgie de l'acier constituent les principales sources de rejet atmosphérique [27]. Le cadmium atmosphérique provient aussi de l'automobile, du rejet dans la nature ou de l'incinération intempestive de batteries au nickel-cadmium [24]. Le cadmium et ses composés ne sont pas ou sont très peu volatils. Dans l'air, le cadmium est présent sous forme particulaire, la principale forme étant l'oxyde de cadmium (les autres formes étant des sels de cadmium) [27].

Dans l'eau, le cadmium provient de l'érosion naturelle, du lessivage des sols ainsi que des décharges industrielles et du traitement des effluents industriels et des mines [27]. En milieu aquatique, le cadmium est relativement mobile et peut être transporté sous forme de cations hydratés ou de complexes organiques ou inorganiques.

Dans l'eau douce, le cadmium est le plus souvent associé à des matières colloïdales et particulaires et, selon les calculs thermodynamiques, les formes solubles de cadmium consistent principalement en ion Cd^{++} libre et en petite quantité de CdCl_2 et de CdSO_4 . Lorsqu'il atteint les milieux aquatiques marins, le cadmium subit en partie une désorption des particules et il est remplacé par des substances chélatrices. Dans la mer, les calculs thermodynamiques permettent de prévoir que

66% du cadmium soluble est présent sous forme de Cd^{++} libre, 26% sous forme de $\text{Cd}(\text{OH})_2$, 01% sous forme de CdCl_2 et 01% sous forme de CdSO_4 [28].

Le cadmium est assez mobile dans les sols, néanmoins il a tendance à s'accumuler dans les horizons supérieurs du sol, riches en matière organique. La mobilité du cadmium est essentiellement fonction du pH du sol [27].

1.3.2 Propriétés biologiques et toxicité

Contrairement à de nombreux métaux, le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants [05, 06].

Le cadmium pénètre dans l'organisme humain principalement par voie respiratoire (l'absorption de la quantité inhalée est de l'ordre de 50%), accessoirement par voie digestive avec l'alimentation et l'eau de boisson (l'absorption porte sur 3 à 7% de la quantité ingérée) [24]. Ces taux d'absorption peuvent être augmentés lors de carences alimentaires en calcium, en fer, en zinc, en cuivre ou en protéines. Le cadmium est transporté dans le sang fixé à l'hémoglobine ou aux métallothionéines. Le cadmium se concentre principalement dans le foie et les reins (entre 50 % et 70 % de la charge totale). Il est également retrouvé dans le pancréas, la glande thyroïde et les glandes salivaires. Ainsi, Les effets critiques majeurs de la présence du cadmium dans les reins sont : l'augmentation de l'excrétion de protéines de faible poids moléculaire dans l'urine, résultant d'une lésion des cellules tubulaires proximales et l'élévation du risque d'ostéoporose [29].

Dans les différents tissus, le cadmium se fixe sélectivement sur les métallothionéines. Le cadmium libre est à l'origine des effets toxiques observés. Le cadmium possède une demi-vie de l'ordre de 20 à 30 ans dans le rein et de 30 jours dans le sang [24, 27, 30].

Par sa présence dans l'environnement, le cadmium pourrait cependant, du fait du processus d'accumulation des doses, participer au risque d'hypertension et à l'augmentation de fréquence des cancers rénaux et prostatique, voire pulmonaires. Il est classé dans le groupe 2A par le CIRC [24]. Parmi les groupes à risque il convient de mentionner les personnes âgées, les diabétiques et les fumeurs. Il se peut que le

risque soit plus élevé dans le cas des femmes qui, disposant de moindres réserves de fer, absorbent davantage le cadmium que les hommes à exposition égale [29].

Les concentrations de cadmium dans les organismes aquatiques dépendent de divers facteurs liés à l'environnement, et notamment : de la teneur en cadmium dans l'eau, de la position de l'organisme au sein de la chaîne trophiques et, en particulier, des formes chimiques de cadmium auxquelles l'organisme est exposé [28].

Les algues ont une sensibilité moindre au cadmium que les organismes appartenant à des niveaux trophiques supérieurs du fait que la principale voie d'introduction s'effectue à partir de l'eau environnante. Les crustacés peuvent supporter des concentrations de cadmium comprises entre 5 et 10µg Cd/l. Chez les mollusques, la gamme des concentrations de cadmium efficace est analogue à celle qui affecte les crustacés. Ainsi, chez les poissons, à des concentrations aussi faibles que 5µg/l, divers effets sont observés sur le développement. A des concentrations supérieures à 10µg/l, une mortalité ainsi qu'une inhibition enzymatiques et une inhibition de la régénération des nageoires ont été enregistrés [28].

1.4 Le Plomb « Pb »

1.4.1 Cycle et sources naturelles et anthropiques

Dans l'air, les émissions de plomb provenant de poussières volcaniques véhiculées par le vent sont reconnues d'importance mineure. Les rejets atmosphériques sont principalement anthropiques [05].

Afin d'évaluer la contamination actuelle de l'atmosphère, certains auteurs ont reconstruit la chronologie des flux de plomb dans les glaces de l'Antarctique depuis environ 30 000ans. Ils concluent de leur étude que plus de 99 % du plomb présent aujourd'hui dans la troposphère de l'hémisphère nord est d'origine humaine principalement du fait de l'adjonction de composés alkylés dans les essences. L'étude des rapports des isotopes stables du plomb montre que les émissions de plomb industriel dans l'atmosphère dépassent de deux ordres de grandeur les émissions naturelles [15, 31].

Durant les temps préhistoriques, la principale source de plomb à l'océan était la source fluviale mais, aujourd'hui, cette source est devenue négligeable devant la source atmosphérique, la cause principale étant encore à l'heure actuelle la combustion des carburants automobiles [05, 06, 15, 31].

Le plomb a la réputation de rester solidement lié aux particules sédimentaires. Néanmoins, dans les sédiments, le plomb peut être remis en solution lors de la dégradation aérobie de la matière organique particulaire à laquelle il est associé. Cette solubilisation s'observe également en subsurface par dissolution des oxydes de fer et de manganèse [05, 06, 15, 31].

En dépit d'une certaine mobilité du plomb constatée dans les sédiments, il est possible d'utiliser les sédiments comme enregistreurs de la chronologie de la contamination. Les sédiments sont tout de même un puits géochimique pour le plomb. Dans les sédiments côtiers, la contamination par le plomb est très largement répandue ; les sédiments océaniques sont aussi perturbés [15, 31].

1.4.2 Propriétés biologiques et toxicité

La toxicité des composés minéraux du plomb est en rapport avec leur plus ou moins grande hydrosolubilité. Par ordre de toxicité décroissante, donc en allant du composé le plus soluble vers le moins soluble dans l'eau, on trouve : le nitrate, le chlorure, l'acétate basique, le minium, le carbonate, le sulfure, le phosphate. L'acétate basique a été à l'origine d'accidents aigus, souvent mortels. L'hydrocarbonate (céruse), bien qu'insoluble dans l'eau, peut être partiellement solubilisé, notamment au contact de l'acide chlorhydrique gastrique, et provoquer des intoxication sévère surtout chez l'enfant. Le plomb serait plus toxique lorsqu'il est pris avec l'eau de boisson qu'en mélange avec les aliments, ce qui explique la gravité fréquente des intoxications saturnines d'origine hydrique [24].

Le plomb pénètre essentiellement dans l'organisme humain par voie digestive et pulmonaire. La voie pulmonaire est surtout importante pour les personnes exposées en milieu professionnel, qui inhalent le plomb sous forme particulaire. En population générale, le plomb peut être ingéré avec les aliments contaminés et l'eau de boisson émanant de canalisations contenant du plomb. Le plomb est d'abord

transporté par le sang où l'on peut le doser facilement (dosage de la plombémie). Il se fixe ensuite dans les différents tissus et en particulier au niveau de l'os où il est majoritairement stocké (80 à 90 % du plomb total présent dans l'organisme). Si la demi-vie du plomb dans les tissus mous et dans le sang est d'environ 30 jours, sa demi-vie dans l'os est très longue, de l'ordre de 1 an dans l'os trabéculaire et 10 à 20 ans dans l'os compact. Ce toxique ainsi accumulé pourra par exemple être mobilisé à partir du squelette chez la femme enceinte, passer la barrière placentaire et venir contaminer le fœtus. Le plomb est principalement éliminé dans les urines (75%). 15 à 20% du plomb sont éliminés dans les fèces. Le plomb est également excrété dans la salive, dans la sueur, dans les larmes, dans les cheveux...[32,33].

Des effets sur la respiration, la croissance, la reproduction, le développement et le comportement ont été observés chez des vertébrés et des invertébrés aquatiques exposés au plomb. Le plomb sous forme inorganique exercerait sa toxicité en entrant en compétition avec les métaux essentiels au fonctionnement normal de cellule. Le plomb modifie la biologie de la cellule en perturbant de nombreuses voies métaboliques et différents processus physiologiques. Il inhibe les enzymes de la biosynthèse de l'hème, catalyse des réactions de peroxydation des lipides et interfère avec les processus médiés par le calcium au niveau membranaire et cytosolique. Le plomb tétra-éthyle, bien qu'instable dans l'eau de mer, pourrait être absorbé rapidement par les organismes. De fait, des effets de plomb sur la croissance de certaines espèces phytoplanctoniques ont été enregistrés à partir de 0,5 µg/L. Les invertébrés marins aux stades embryonnaires sont plus sensibles que les adultes. Ainsi, la concentration inhibitrice du développement embryonnaire de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) est d'environ 500 µg/L ; de plus, à cette concentration, un grand nombre de larves sont anormales. Chez la moule, *Mytilus edulis*, en présence de plomb (0,1 mg/L), il y a perturbation du métabolisme des autres métaux divalents: notamment le calcium, le magnésium et le cuivre [05, 06, 32, 34].

1.5 L'Argent « Ag »

1.5.1 Cycle et sources naturelles et anthropiques

L'argent naturel, métal très rare (63^{ème} rang dans l'ordre d'abondance des éléments de l'écorce terrestre) est disséminé sur toute la surface de la terre [35]. Avec la production minière, l'industrie photographique est la source majeure d'argent retrouvé dans l'environnement. Il est donc principalement émis dans les rejets urbains. Les émissions naturelles sont essentiellement dues à l'érosion des sols [36]. De nombreux sels d'argent tels que les chlorures, les sulfures, les phosphates, les carbonates et les arsénates sont assez peu solubles (pK_{sp} 10 à 50); il en résulte que les concentrations d'argent dissous dans les eaux naturelles sont très faibles []. Les activités anthropiques conduisent à une redistribution importante de l'argent naturel. À titre d'illustration, les concentrations moyennes dans les boues de stations d'épuration sont de 20 mg/kg soit 200 fois plus importantes que dans la croûte terrestre en moyenne [35].

Dans les eaux douces, l'argent peut former des ions complexes avec les chlorures, l'ammonium et les sulfates, des composés organiques solubles, s'adsorber sur les substances humiques et les particules en suspension, et s'incorporer ou s'adsorber sur les organismes vivants. Dans les endroits riches en matière organique en décomposition, l'argent précipite fortement en sulfures ou se combine avec les substances humiques. La sorption est le principal processus contrôlant la partition dans l'eau ; elle est affectée par le pH, les conditions rédox et la présence de matière organique. Dans les sédiments, l'argent se retrouve surtout associé à la fraction fine sous forme Ag_2S , chimiquement inerte [36].

1.5.2 Propriétés biologiques et toxicité

L'argent, élément non essentiel à la vie, est le plus souvent considéré comme l'un des métaux les plus toxiques sous la forme ionique, au second rang après le mercure, pour les organismes aquatiques ou terrestres [35].

L'absorption de l'argent se fait surtout par inhalation et voie orale. La population générale est exposée à l'argent principalement *via* la nourriture et l'eau de boisson. Après absorption par voie orale, il est distribué dans tout l'organisme, se concentrant particulièrement dans le foie. Il est déposé dans les tissus sous forme de sels insolubles. La coloration de la peau (grise ou bleu-grise) des individus atteints d'argyrie semble être due à la photoréduction de ces sels en Ag métal, puis de

l'oxydation de ce dernier en sulfure d'argent (Ag_2S) noir [36]. Par ingestion d'argent nitrate, un risque d'effet caustique sur l'oesophage et l'estomac peut se manifester. La toxicité est liée à la formation d'acide nitrique dans l'estomac [37].

Dans les tissus des animaux et des humains l'argent n'existe qu'à l'état de traces. Cependant, il s'accumule lentement dans le corps au cours de la vie. Des études ont montré que presque tout l'argent ingéré est rapidement excrété et que très peu est absorbé) [35]. L'argent est éliminé principalement dans les fèces [36].

Chez les poissons, l'exposition à l'argent induit directement ou indirectement la synthèse de métallothionéines en particulier dans le foie et les branchies dans le cadre de processus de détoxification []. L'ion Ag^+ est très toxique chez les poissons d'eau douce, surtout lorsqu'il est présent principalement sous sa forme libre. La présence de chlorures ou de thiosulfates modèrent cette toxicité [35, 38]. Chez les poissons d'eau douce, l'ion Ag^+ exerce sa toxicité sur le transport de Na^+ et Cl^- au travers des branchies en inhibant les activités Na^+/K^+ ATPase [35]. La complexation de l'ion libre Ag^+ contribue à diminuer sa toxicité [38]. La toxicité de l'argent est moindre dans les eaux marines que dans les eaux douces, du fait des fortes concentrations en chlorures qui font chuter la concentration en Ag^+ . Les organismes marins sont donc moins touchés que les organismes d'eau douce par la pollution à l'argent [36].

1.6 Spéciation et biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques

Dans les systèmes environnementaux comme les sols ou l'eau, les métaux traces peuvent exister sous des formes chimiques variées (espèces) : libre, complexé avec un ligand « simple » organique ou inorganique, complexé avec un ligand colloïdal ou macromoléculaire, adsorbé ou incorporé à des particules en suspension, adsorbé ou assimilé par un organisme vivant (ligand biotique). (fig 1.2). La répartition quantifiée du métal entre ces différentes formes physico-chimique définit sa spéciation.

Cette spéciation conditionne son devenir et son transfert dans le milieu, ainsi que sa biodisponibilité et sa toxicité dans l'environnement [11, 39, 40].

Il a été montré que la toxicité d'un métal trace est dépendante de sa spéciation et que le métal ionique libre (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , etc.) est une des formes les plus réactives, avec les espèces neutres, puisque plus facilement assimilables par les organismes vivants [41, 42, 43]

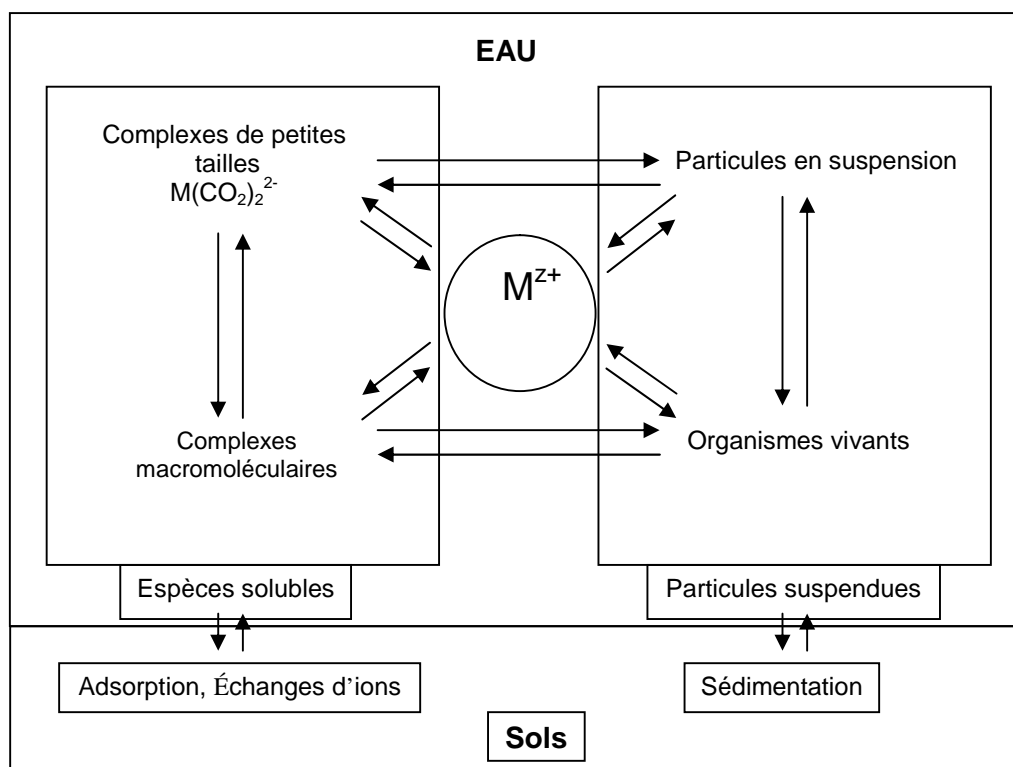


Figure 1.2 : réactions d'échanges du métal M avec les constituants organiques et inorganiques du milieu

Les phénomènes de complexation faisant intervenir les métaux sont gouvernés par un ensemble de paramètres physico-chimiques. Ceux-ci modifient la spéciation des métaux, c'est à dire qu'ils influent sur la répartition des différentes formes chimiques métalliques, mais agissent également sur l'assimilation par les organismes vivants. Parmi ces paramètres, on peut citer le pH, le potentiel d'oxydoréduction et bien sûr la quantité de ligands disponible (aussi appelée capacité complexante) [04, 40, 44].

C'est ainsi que, dans la plupart des cas, les concentrations métalliques totales sont connues pour être de mauvais indicateurs d'effets sur les organismes du compartiment aquatique. Pour que les métaux présents dans les différents

compartiments de l'environnement aquatique exercent un effet sur les organismes, ils doivent être sous une forme chimique ayant la capacité d'atteindre les cibles biologiques. En d'autres termes, il est nécessaire qu'ils soient biodisponibles [44].

Il existe dans la littérature plusieurs définitions de la biodisponibilité. Certains auteurs considèrent qu'un métal est biodisponible s'il est assimilable par les organismes, pour d'autres il faut en plus qu'il soit susceptible d'induire un effet [04].

Les études de transfert et d'accumulation des métaux par les biocénoses aquatiques ont donc nécessité le développement d'outils permettant de prédire la spéciation de métaux dans le milieu environnant et d'établir un lien entre cette spéciation et la biodisponibilité envers les organismes aquatiques y évoluant. On peut ainsi citer deux modèles de prédiction, le modèle de l'ion libre (FIAM "*free ion activity model*") et le modèle du ligand biologique (BLM "*biotic ligand model*") [04, 44].

1.7 Processus physiologiques de bioaccumulation des métaux

1.7.1 Définitions

La bioaccumulation est le processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise. Les micropolluants s'accumulent dans les organismes aquatiques à travers différents mécanismes : via l'absorption directe de l'eau par les branchies ou la peau (bioconcentration), via l'absorption de particules en suspension (ingestion) et via la consommation d'aliments contaminés (bioamplification) [05, 11, 45, 46, 47].

L'accumulation des substances chimiques dans les organismes dépend de plusieurs mécanismes :

- La bioconcentration est un cas particulier de bioaccumulation. Elle est définie comme le processus par lequel une substance (ou un élément) se trouve présent dans un organisme vivant à une concentration supérieure à celle de son milieu environnant. C'est donc l'accroissement direct de la concentration d'un contaminant lorsqu'il passe de l'eau à un organisme aquatique. Le facteur de concentration (FBC) peut être défini comme une constante issue du

rapport de la concentration d'un élément dans un organisme en état d'équilibre à sa concentration dans le biotope [05, 11, 45, 48, 49, 50].

- La bioamplification est le processus par lequel le prédateur concentre une substance (ou un élément) à un niveau supérieur à celui où il se trouve dans la proie. Ainsi, le concept de bioaccumulation résulte de la balance nette des processus de capture, de stockage et d'excrétion d'une substance dans un organisme, due à une exposition dans l'eau, la nourriture, le sédiment et l'air. La bioaccumulation, phénomène capital au niveau de l'organisme, est exprimée par la différence entre la quantité de métaux qui pénètre au travers des barrières biologiques et celle qui est éliminée vers le milieu extérieur (processus d'excrétion). Pénétration, stockage dans les organes cibles et élimination seront sous la dépendance des facteurs abiotiques du milieu, de la nature du contaminant et des caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'organisme ou de l'espèce considérée [05, 11, 46, 47, 49].
- L'accumulation d'une substance dans un organisme va également dépendre de sa capacité à le métaboliser et à l'éliminer. C'est ce qu'on appelle la biotransformation qui peut réduire la toxicité d'une substance en l'éliminant ou au contraire l'augmenter en la métabolisant sous forme active [11, 45, 51, 52].

La bioaccumulation d'un composé dans un organisme est typique de ce composé, du milieu aquatique dans lequel il se trouve et de l'organisme ciblé. Même en l'absence de toxicité aiguë ou chronique avérée, la bioaccumulation d'une substance est un résultat en soit car certains effets ne sont mesurables qu'à un stade plus tardif ou bien se manifestent aux générations suivantes ou à un stade un plus haut de la chaîne alimentaire [11].

1.7.2 Mécanisme de capture des métaux

Dans le milieu naturel, les organismes sont soumis à différentes sources de métaux, qui sont le milieu aqueux et l'alimentation qui comprend une source végétale ou animale selon le régime alimentaire, mais également des débris organiques

présents dans les matières en suspension pour les organismes filtreurs, ainsi que dans le sédiment pour les dépositivores [18, 53].

Pendant tout processus physiologique d'échange avec le milieu environnant, les molécules exogènes pénètrent à travers les barrières biologiques séparant l'environnement interne de l'organisme du milieu externe. Quand la contamination se fait, ces barrières (cutanées et respiratoires pour la contamination directe, et intestinale pour la contamination trophique) montrent des propriétés biologiques liées à leur structure et aux conditions physico-chimiques de l'environnement (température, pH, électrolytes, etc.). La membrane plasmique est la structure primaire impliquée dans ces processus [05].

1.7.2.1 Capture des métaux en solution

La capture, par la surface perméable, de beaucoup de métaux traces en solution se fait généralement par diffusion passive ne requérant aucune dépense d'énergie [05, 08, 45]. Ainsi, les complexes métalliques lipo-solubles et les formes ioniques ou faiblement complexées sont considérées comme les plus biodisponibles [18]. La diffusion passive peut être facilitée (diffusion par gradients de concentration, déplacement dans un champ électrique, présence de solvants, transport par canaux spécifiques aux cations essentiels) en utilisant des protéines de transports associées à la membrane (les différents processus sont semblables à ceux rencontrés chez les microorganismes unicellulaire) (fig 1.3) [02, 05, 08].

La concentration de l'ion libre métallique a une grande importance dans le contrôle de la capture métallique à partir des solutions. Le métal sous forme d'ion libre a été proposé comme l'espèce métallique dissoute la plus biodisponible [41, 42, 43].

Ainsi, le transport des ions métalliques passerait par la voie d'un canal protéique non spécifique sur la membrane cellulaire (fig 1.3). Une fois dans la cellule, le métal sera capté par un autre ligand afin de prévenir sa diffusion vers l'extérieur. Ces différents ligands constituent un système de « piégeage cinétique » dont l'efficacité dépend de l'importance de leur synthèse et de la force de liaison avec le métal.

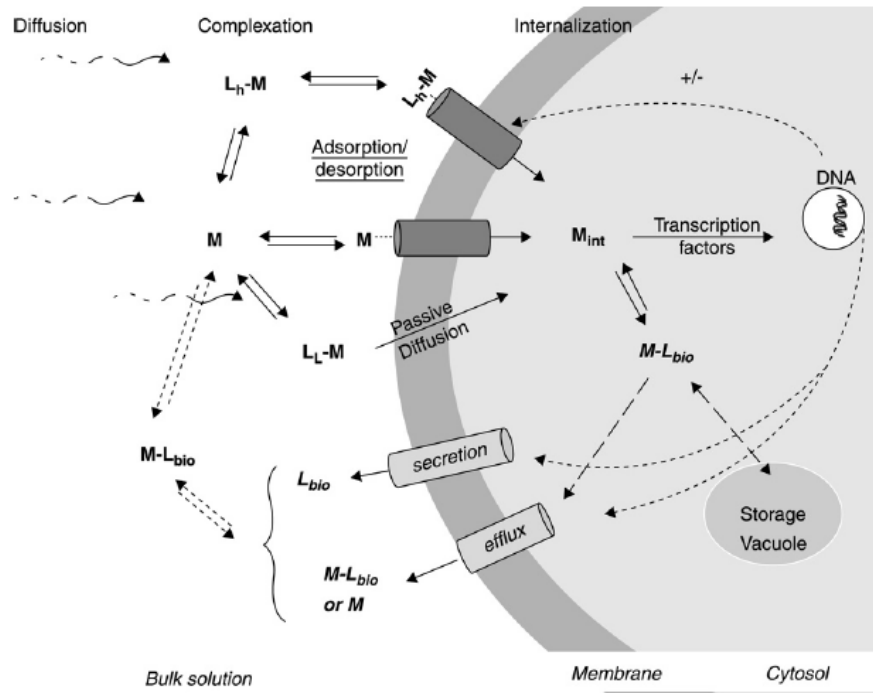


Figure 1.3 : Modèle conceptuel de certains processus physico-chimiques importants menant à la prise d'un oligo-métal par micro-organisme aquatique (L: ligand ; M:métal) (Indices inférieures L: lipophile; h: hydrophile; bio: biologique; int: internalisé) [54].

Le transport dans la cellule et dans les organes de stockage se fait par déplacement, par affinités successives (jusqu'au puits cinétique ou jusqu'à l'excrétion). La vitesse d'assimilation sera fonction de la réaction la plus lente (réaction limitante), qui est souvent le transfert intracellulaire.

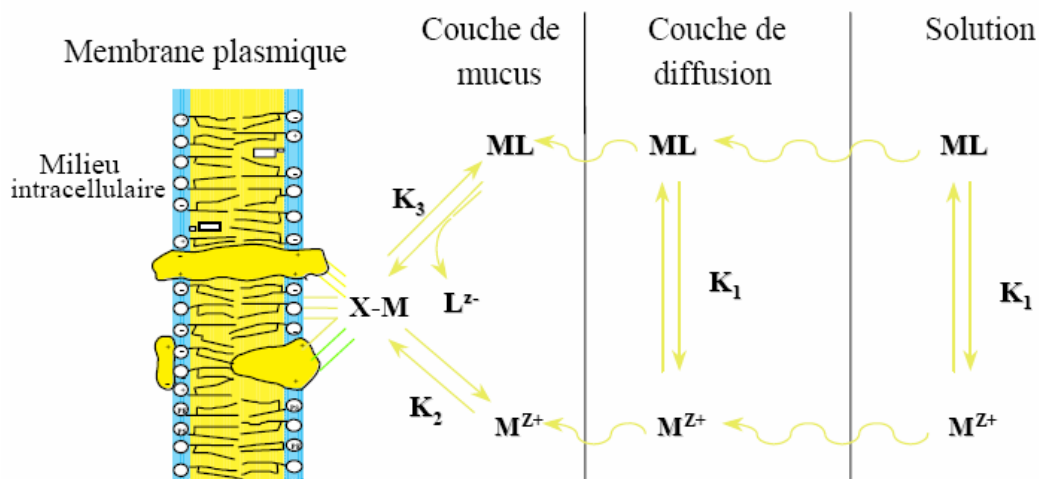


Figure 1.4 : Schéma récapitulatif du modèle de l'ion libre (k₁, k₂, k₃ vitesses) [05].

Ainsi, le modèle de l'ion libre (FIAM) traduit l'interaction d'un métal (Me^{Z+}) chez un organisme en trois étapes successives: advection/diffusion du métal à l'équilibre dans la solution « baignant » l'interface entre la membrane biologique et le milieu d'exposition (1), réaction de complexation avec un site de surface (2), transport à travers la membrane (3). (fig 1.4) [05].

1.7.2.2 Capture des métaux par voie trophique

L'accumulation des métaux par la nourriture peut représenter une voie importante d'apport de métaux. En effet, les métaux en solution sont considérés comme les plus biodisponibles, mais les concentrations élevées enregistrées au niveau de la nourriture, du sédiment et des particules en suspension font de l'alimentation une source importante de métaux pour les organismes aquatiques. Cependant, différents facteurs tels que les formes physico-chimiques, les forces de liaisons des métaux aux aliments, la qualité de ces aliments et la position des espèces dans les chaînes alimentaires interviennent sur la disponibilité des métaux à partir de la nourriture [18, 53, 55].

1.7.3 Mécanisme d'excrétion des métaux

La bioaccumulation des métaux par les organismes aquatiques peut également être contrôlée par leur excrétion. L'élimination des métaux peut être démontrée en plaçant des organismes d'un milieu contaminé vers un milieu propre, que ce soit lors d'expérimentation en laboratoire ou en nature [18].

Parallèlement aux étapes de pénétration et de répartition des contaminants au sein de l'organisme, de nombreux mécanismes physiologiques et biochimiques contribuent à les éliminer [45]. Tous les organismes aquatiques piègent des métaux en quantités importantes mais pour beaucoup d'espèces, l'excrétion des métaux accumulés n'est pas négligeable. Les quatre processus principaux sont : la défécation, la perte *via* la surface perméable, la désorption passive et les granules d'expulsion [05, 52].

L'organe d'excrétion des métaux est le rein. Les métaux stockés dans les granules peuvent être perdus à travers le tractus alimentaire sous forme de fèces. L'égestion par les fèces est le processus dominant pour la décontamination métallique. Ces métaux présents dans les lysosomes ou les sphérocristaux sont excrétés par exocytose du contenu vacuolaire, par épanchement de podocytes rénaux ou encore par diapédèse de granules *in toto* dans le tractus urinaire. A cette voie principale *via* le rein s'ajoute chez les bivalves la voie trans-tégumentaire, par synthèse du byssus ou de la coquille ou encore par les gamètes lors de la ponte. Certains de ces mécanismes d'excrétion ont un caractère nettement épisodique, ce qui est susceptible d'amplifier les variations temporelles des concentrations en métaux chez les bivalves [04, 05].

1.7.4 Mécanisme de stockage des métaux

Après la capture et l'excrétion des métaux, le troisième facteur déterminant l'accumulation des éléments traces est la séquestration des métaux absorbés dans les tissus. Plusieurs mécanismes existent incluant les piégeages des métaux et la séquestration d'éléments dans des granules ou dépôts insolubles qui peuvent être ou non associés à des lysosomes [05, 18]. De fait, une multitude de ligands capables de fixer les métaux essentiels ou non essentiels ont été identifiés, et incluent des protéines ayant une forte affinité avec les métaux, les lysosomes et des concrétions minérales ou organiques. Ces différents types de ligands sont présent chez un grand nombre d'organismes et peuvent s'exprimer de façon plus ou moins importante en fonction de l'élément, de l'organisme ou du tissu considéré. Les ligands protéiques permettant la fixation des ions métalliques sont très largement représentés dans le règne vivant et incluent en particulier les métallothionéines ;MT(animaux) et les phytochélatines (végétaux). Chez les organismes aquatiques, les MT contribuent à la régulation du métabolisme des métaux essentiels (Cu et Zn), et à la protection des organismes contre les effets toxiques des métaux non essentiels (Cd, Hg...) [18, 56]. De nombreux autres composés peuvent intervenir dans la séquestration des métaux. Des composés de faible masse moléculaire comme certains acides aminés (taurine, lysine) et le glutathion (GSH) ont été identifiés. Cependant au niveau cytosolique, la métallothionéine peut être considérée comme le composé le plus

important dans l'homéostasie des métaux [03, 08, 56]. Un autre type de détoxification très répandu est la biominéralisation des métaux, ce dernier type de stockage étant la voie préférentielle de détoxification chez les invertébrés marins [18].

1.7.5 Facteurs affectant la bioaccumulation des métaux

Les processus de contamination et de décontamination sont superposés dans le temps et leur importance relative varie fortement selon les modalités de la contamination (voies d'entrée, doses absorbées, etc.), selon les niveaux d'accumulation dans l'organisme et dans les organes et selon les facteurs physicochimiques du milieu environnant [05, 18].

Le concept de bioaccumulation résulte donc de plusieurs mécanismes, agissant simultanément ou avec un décalage dans le temps. Les capacités de bioaccumulation, pour un même produit chimique, peuvent varier considérablement selon l'espèce considérée, le stade de développement des individus, les caractéristiques écologiques du système et les propriétés du contaminant [05, 08].

L'étude de l'interaction entre les contaminants et les barrières biologiques est d'un intérêt considérable pour la compréhension des phénomènes écotoxicologiques, particulièrement la bioaccumulation et les transferts à travers les chaînes trophiques. Il est bien connu que les niveaux de concentrations métalliques dans les organismes ne sont pas le seul résultat de leur biodisponibilité dans l'environnement. Les processus impliqués sont très complexes et sont influencés par le contaminant (taille molécule, spéciation chimique, etc.), l'organisme récepteur (propriétés membranaires, composition chimique, processus actifs), et l'environnement intra et extracellulaire (température, pH, etc.) [05].

En générale, trois groupes de facteurs, intimement liés, vont intervenir dans les interactions entre les composés métalliques et les barrières biologiques [04, 05, 08, 18, 40, 44] :

- Les caractéristiques physico-chimiques du milieu : température, pH, concentration en chlorures et en MES, nature et abondance des ligands

organiques et inorganiques dans les phases dissoutes et particulières, condition trophique, etc.

- Les propriétés chimiques du contaminant qui correspondent à la nature du contaminant, aux formes chimiques dans le biotope (colonne d'eau, sédiments), à leur spéciation et biodisponibilité, à leur concentration, etc.
- Les facteurs biologiques de l'organisme notamment les propriétés structurales et les fonctions des barrières biologiques: surface d'échange et accessibilité des sites de fixation, processus de transport et capacité d'absorption, mais aussi à une échelle plus importante les différentes étapes du cycle biologique tels que la croissance, la reproduction, la nutrition, l'excrétion, etc.

1.8 Surveillance de la qualité de l'environnement

Les nombreuses méthodes permettant de surveiller la qualité de l'environnement peuvent être réparties en deux catégories, clairement distinctes : la détection des polluant et éventuellement leur quantification, dans les milieux physiques et biologiques, d'une part, et l'évaluation des effets des pollution sur les organismes vivants, soit au niveau des individus, soit au niveau des population et/ou communautés, d'autre part. Après plusieurs années d'utilisation de ces différentes méthodologies, il apparaît qu'aucune d'entre elles n'est exclusive et ne peut, à elle seul, fournir des informations fiables et complètes sur l'état de l'environnement. En d'autre terme, c'est l'association judicieuse de ces différentes approches qui permet d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes qui y vivent [01, 03].

1.8.1 La biosurveillance

La biosurveillance se définit comme « l'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution » [57]. C'est aussi « l'étude de la réponse biologique des organismes aux contaminants chimiques » [58].

Selon Bruno Andral [59], La biosurveillance repose dans la capacité de la cible biologique à concentrer dans ses tissus les contaminants chimiques dans un facteur proportionnel à leur biodisponibilité. Ainsi, L'objectif des réseaux de surveillance environnementale est de suivre les variations spatiales et temporelles des niveaux de contamination chimique dans le champ moyen de dilution des différents apports de contaminant affectant chaque unité du référentiel géographique d'un site donné [08].

En général, on distingue deux principes de biosurveillance :

- La biosurveillance dite sensible, qui utilise des organismes qui répondent au stress causé par la pollution. La mesure de cette sensibilité définit trois concepts : le biomarqueur qui se situe au niveau infra-individuel, le bio-indicateur qui se place au niveau individuel (altérations physiologiques, tissulaires ou morphologiques visibles) et le biointégrateur qui se situe au niveau de la population et/ ou de la communauté (variation densitaire, présence/absence d'espèces [08, 57].
- La biosurveillance par accumulation, qui utilise des organismes qui ont la capacité de stocker les polluants dans leurs tissus (bioaccumulateurs) suite à des mécanismes de fixation et/ou de transfert. Le bioaccumulateur sert ici de matrice de dosage de différents polluants [05, 08, 57].

On distingue principalement deux stratégies de mise en oeuvre de la biosurveillance:

- La première appelée méthode *in situ* (ou biosurveillance passive), utilise les organismes déjà présents sur le site (organismes indigènes) [59]. Elle a l'avantage d'être rapide. En effet, les organismes ayant déjà été exposés aux polluants, il ne reste plus qu'à les collecter et à les analyser.

La densité et la localisation des emplacements de prélèvement devront répondre aux objectifs de l'étude. Les enquêtes à grande échelle couvrant de plus grands domaines exigeront évidemment plus d'emplacements que des études de sources ponctuelles de pollution. Pour ces dernières, les sites d'échantillonnage sont fréquemment choisis le long des gradients par rapport à la source de pollution.

Cependant, l'utilisation d'espèces indigènes détermine bien souvent le nombre et la localisation des emplacements [57].

- La seconde appelée méthode des transplants (ou biosurveillance active) emploie des organismes dits transplantés [59]. Elle peut être utilisée par exemple lorsque la méthode *in situ* n'est pas envisageable (absence d'organismes correspondant aux critères de l'étude). Cette dernière nécessite plus de temps. En effet, il faut laisser le temps aux transplants (organismes provenant d'une zone «saine ») d'accumuler les polluants présents dans leur nouvel environnement, cette phase d'exposition pouvant être plus ou moins longue selon le type d'organismes choisi et le polluant étudié [08, 57]. La transplantation peut être employée à différents endroits à n'importe quel moment.

Le tableau 1.1 résume les caractéristiques propres à chacune de deux stratégies [57].

Tableau 1.1 : Comparaison entre stratégies *in situ*/transplants

In Situ	Transplants
Les résultats peuvent être obtenus en quelques jours.	Les temps d'exposition des transplants sont plus longs (plusieurs semaines).
Les résultats démontrent la pollution des années précédentes.	Les résultats illustrent la pollution pendant la période d'exposition.
Les niveaux accumulés sont habituellement au-dessus des limites de détection (temps d'exposition plus long).	Les concentrations accumulées peuvent être indétectables sur une période d'exposition trop courte.
Faible surveillance, peu de risques de vandalisme.	Risques potentiels de vandalisme.
Coûts liés aux transports vers les sites de prélèvement et aux analyses chimiques.	Coûts supplémentaires relatifs aux matériaux et au temps de préparation des transplants avant exposition.
Manque potentiel d'échantillons indigènes pour obtenir une couverture géographique suffisante.	La densité des points de prélèvement, le nombre de transplants et les conditions d'étude sont contrôlées.

CHAPITRE 2

OUTILS D'EVALUATION EN ECOTOXICOLOGIE

2.1 Introduction

L'environnement est depuis longtemps connu pour sa capacité à véhiculer des substances toxiques pour l'homme ou les écosystèmes. Les chimistes ont pris l'habitude de mesurer la concentration d'un certain nombre de molécules présentes dans l'eau, l'air ou les sols afin de surveiller ainsi la qualité de ces milieux [60]. Or, L'analyse chimique des polluants présents dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique [01, 04, 05, 06]. De même, la mesure directe des contaminants dans l'eau fait appel à des techniques analytiques sophistiquées et coûteuses, difficilement applicables à un réseau de surveillance [05, 06]. La variabilité temporelle des milieux aquatiques ne confère cependant que peu de signification à une mesure ponctuelle [05, 06, 59]. Par ailleurs, une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus par les populations animales ou végétales exposées aux polluants, et ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies...) ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants. 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 des écosystèmes [01, 02, 03].

Le suivi de la perturbation de cibles biologiques peut pallier cette difficulté. Par exemple, la spécificité d'un biomarqueur pour certaines familles de molécules chimiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, polychlorobiphényles, métaux lourds, produits phytosanitaires...) permet d'une part de révéler la présence de ces

polluants, et d'autre part de renseigner sur la biodisponibilité de ces polluants ainsi que sur les effets biologiques précoces sur les organismes [01, 03, 08].

Une gestion adaptée et pertinente des milieux aquatiques doit reposer sur des outils d'évaluation de l'intégrité des écosystèmes mise à mal par le transfert et l'accumulation dans l'environnement des produits de l'activité humaine. Parallèlement aux mesures chimiques, désormais utilisées dans les programmes de surveillance, la mesure de variables biologiques est susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de l'écosystème aquatique ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification. De ce fait, les variables biologiques sont un complément indispensable au sein d'un programme de surveillance et d'alerte [01].

2.2 Ecotoxicologie

L'écotoxicologie a pour but d'étudier le comportement et les effets de polluants dans les écosystèmes. Face aux nombreuses substances issues des activités technologiques qui se retrouvent quotidiennement dans l'environnement, la détection rapide d'une présence excessive de contaminants, la détermination de leur toxicité et une prévention des atteintes nuisibles sont nécessaires pour assurer la protection des écosystèmes [61].

L'écotoxicologie est définie comme « *le domaine d'étude qui intègre les effets écologiques et toxiques des polluants chimiques sur les populations, les communautés et les écosystèmes ainsi que leur devenir (transfert, transformation, dégradation) dans l'environnement* » [62].

Cette discipline comporte plusieurs aspects ou domaines d'étude, tous interdépendants les uns des autres [62] :

- Le *monitoring* des polluants dans l'environnement par le biais d'analyses chimiques et l'usage d'espèces animales et végétales indicatrices de contamination et/ou de biomarqueurs d'exposition ;

- L'étude du devenir des polluants dans un écosystème récepteur ; leur transfert entre les différents compartiments abiotiques des écosystèmes ainsi qu'entre ces compartiments abiotiques et les organismes vivants, les transformations physico-chimiques et biologiques qu'ils peuvent subir et les conséquences sur leurs potentiels toxiques, etc. ;
- Les modalités et mécanismes d'action des polluants ;
- La prévision des effets des polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes.

2.2.1 Tests écotoxicologiques

Dans les tests écotoxicologiques différents moyens sont utilisés pour mesurer la toxicité d'un produit. Le moyen le plus communément utilisé est la mesure de la mortalité ou de la reproduction, mais il y a un intérêt croissant dans l'utilisation de paramètres plus sensibles. Les effets biochimiques, physiologiques, reproductifs et comportementaux peuvent aussi apporter des mesures de la toxicité. La plupart des tests de toxicité apportent une estimation de la dose qui affecte 50% de la population. Ce peut être par exemple la concentration létale moyenne qui tue 50% de la population. Il est aussi possible d'estimer la concentration maximale qui ne provoque aucun effet.

Ces tests de toxicité ou bioessais, se distinguent en deux types :

- Les tests de toxicité aiguë qui se réalisent sur une durée très courte (par rapport au temps de génération de l'organisme). 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 par rapport au temps de génération de l'organisme. Ce sont par exemple les tests sur la reproduction. 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 [18, 55].

Récemment, la volonté de développer des méthodes plus sensibles et plus rapides que les tests classiques de mortalité ou reproduction a permis la mise en oeuvre du concept de biomarqueurs.

2.2.2 Intérêt des bioessais

La prédiction des effets de composés toxiques sur les écosystèmes récepteurs, qui est l'un des objectifs majeurs de l'écotoxicologie, est basée sur des outils et des méthodes dont la pertinence, au regard de l'objectif visé, est inversement proportionnelle au coût et à la simplicité. Les plus aisés à mettre en oeuvre sont les tests monospécifiques réalisés au laboratoire dans des conditions standardisées. Une seule espèce, considérée comme représentative d'une classe d'organisme d'un niveau trophique donné ou/et comme cible privilégiée du toxique par sa place ou son rôle dans l'écosystème, est étudiée. Ces tests sont caractérisés par leur simplicité et rapidité de mise en oeuvre, leur sensibilité, leur reproductibilité et leur coût économique modéré. Les conditions biotiques (espèce, âge) et abiotiques (température, temps d'exposition, composition physico-chimique du milieu) sont contrôlées et standardisées ce qui permet une comparaison des résultats obtenus notamment sur différents polluants et entre différents laboratoires. Ils constituent ainsi une première approche d'évaluation du danger. Par ailleurs, ces tests sont le plus souvent associés pour former une batterie de tests afin de réaliser un screening du potentiel toxique des contaminants considérés. Les espèces tests étudiées sont issues de différents niveaux trophiques d'un écosystème récepteur considéré [62].

A l'opposé des tests monospécifiques, les études *in situ* permettent d'étudier les impacts en conditions réelles et en vraie grandeur d'une contamination du milieu par une (ou des) substance(s) toxiques(s), mais posent d'énormes problèmes méthodologiques (comment isoler les effets des substances étudiées du bruit de fond provoqué par la présence d'un grand nombre d'autres substances, sur quel écosystème de référence se baser pour mesurer un effet ?) et sont très coûteuses [62].

2.3 Indicateurs biologiques (Bioindicateurs)

Le terme de bioindicateur a été défini et employé de façons très diverses, certains auteurs l'employant même pour désigner des descripteurs de type biomarqueur. selon [Blandin \[63\]](#) un indicateur biologique (ou bio-indicateur) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications naturelles ou provoquées. [Lagadic et al \[03\]](#), préconisent d'utiliser comme définition celle de Guelorget et Perthuisot, qui considèrent que les bioindicateurs sont « des espèces ou groupe d'espèces qui, par leur présence et/ou absence, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie ».

Globalement, les indicateurs biologiques renseignent sur l'état des écosystèmes à partir de la compilation de données biologiques qui peuvent être très diverses. Il s'agit bien de mesurer des modifications liées surtout aux activités humaines qui détournent les écosystèmes de leur évolution naturelle.

L'utilisation des indicateurs est aujourd'hui reconnue comme l'une des techniques les plus efficaces pour la recherche écologique appliquée aux eaux de surface et aux eaux côtières ([directive 2000/60/CE sur la qualité écologique de l'eau](#)) [\[07\]](#). Lors de l'étude des relations de cause à effet entre stressors et santé des écosystèmes (incidences sur l'élément biologique), un grand nombre d'indicateurs biologiques et écologiques ont été élaborés comme autant d'outils susceptibles de suivre les modifications de la biodiversité du niveau moléculaire (gène) à celui de l'écosystème. Les indicateurs biologiques peuvent être définis comme des mesures de la santé des organismes face aux stressors environnementaux, qui portent sur plusieurs niveaux d'organisation biologique et d'échelle temporelle de réponse [\[07\]](#).

La mesure directe de la présence de contaminants dans les tissus de certains organismes, appelés «biomonitorseurs», a fait l'objet d'une surveillance à long terme en Méditerranée. Un facteur important à prendre en compte lorsqu'on met en place un système de biosurveillance est l'organisme qu'il convient d'utiliser [05, 07]. Des critères de sélection des biomonitorseurs ont été proposés par plusieurs chercheurs [02, 05, 07, 08] les plus cités sont discutés ci-dessous :

- Leur sédentarité sur la zone d'étude afin que l'état des individus puisse être directement corrélé avec le niveau de pollution du site. Des animaux se déplaçant sur de grandes distances ou ne visitant les sites étudiés qu'occasionnellement ne peuvent en effet être le reflet du niveau de contamination du lieu où ils auront été capturés ;
- Leur facilité d'identification, de capture ou de récolte tout au long de l'année ;
- Une taille de la population suffisante car l'impact de prélèvement réguliers sur la structure et la densité de la population doit être négligeable ;
- Une aire de dispersion large et connue, ce qui permet les comparaisons entre différents sites, mais augmente également la probabilité de trouver des sites peu impactés que possible par la pollution ;
- Une longévité de plusieurs années et une résistance aux polluants présents, afin que les individus soient au contact des contaminants pendant des périodes suffisantes pour que les changements de réponses biologiques (ex biomarqueurs) atteignent un niveau mesurable. Cette persistance des individus dans le milieu permet également de suivre l'évolution des paramètres étudiés au cours de temps, et éventuellement d'apprécier la réversibilité des dommages si des mesures sont prises pour réduire le niveau de contamination ;
- Leur aptitude à concentrer le contaminant, sans effet létal, aux concentrations rencontrées dans le milieu ;
- Des relations dose/effet et cause/effet doivent pouvoir être établies ;
- La biologie de l'espèce doit être suffisamment connue pour différencier le signal du bruit de fond ;
- Les effets de variations des facteurs abiotiques doivent être connus.

La batterie d'organismes indicateurs utilisés par différents chercheurs est large (elle comprend des algues, des invertébrés et des vertébrés) (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Avantages des différents compartiments trophiques [64].

Avantages de l'utilisation des algues :
<ul style="list-style-type: none"> - Indicateurs d'effets à court terme du cycle de vie court ; - Producteurs primaires ; - Echantillonnage très facile et peu coûteux ; - Bien adaptés pour la mesure de paramètres fonctionnels (biomasse, dosage de chlorophylle, ...) - Sensibles à certains polluants particuliers comme les herbicides.
Avantages de l'utilisation de macro-invertébrés :
<ul style="list-style-type: none"> - Bon indicateur de conditions locales car peu mobiles ; - Intègre les variations à court terme : les communautés réagissent à long terme mais certains stades sensibles répondent rapidement ; - Facilité de mise en œuvre, l'utilisation de niveaux taxonomiques peu poussés est possible et donne de bonnes indications ; - Echantillonnage facile ; - Abondants dans la plupart des écosystèmes ; - Source de nourriture de nombreux poissons.
Avantages de l'utilisation des poissons :
<ul style="list-style-type: none"> - Bon indicateurs d'effets à long terme à cause de leur durée de vie ; - Représentants de différents niveaux trophiques (omnivores, insectivores, herbivores, planctonivores et piscivores) - Situés au sommet de la chaîne trophique et consommés par l'Homme ; - Relativement faciles à échantillonner et très faciles à déterminer au niveau de l'espèce ; - Utilisation pour les usages de l'eau (catégories piscicoles) ; - De nombreux poissons sont considérés comme des espèces menacées.

2.4 Réponses à un stress au sein d'un système biologique

L'évaluation des conséquences toxicologiques de la présence d'un xénobiotique au sein d'un écosystème aquatique est complexe. Cette démarche suppose une approche intégrative de différents paramètres. En effet, la seule présence d'un xénobiotique dans un système écologique donné ne constitue pas, en soi-même, un élément suffisamment pertinent pour en déduire un risque pour les biocénoses. Des liens doivent être établis entre les niveaux externes d'exposition (mesures chimiques de la présence du contaminant dans l'écosystème), les niveaux internes de contamination tissulaire (sa bioaccumulation dans les organismes) et les effets biologiques induits. Ainsi, l'exposition, le devenir et les effets des polluants au sein des écosystèmes aquatiques nécessitent une étude écotoxicologique multiparamétrique [04].

Le défi de l'écotoxicologie réside donc dans le fait qu'il s'agira de repérer des dommages préjudiciables aux populations bien en amont de leur apparition. Afin de comprendre la cascade d'évènements aboutissant à l'apparition de ces effets, l'ordre séquentiel des réponses à un stress est présenté en figure (2.1) [04].

Ces enjeux impliquent donc, en théorie, la nécessité de développer des outils permettant une détection précoce de la toxicité exercée par un contaminant. Les effets à des niveaux hiérarchiques élevés sont, le plus souvent, précédés par des changements de processus biologiques à des niveaux inférieurs. C'est sur la base de ce postulat que le développement d'indicateurs biologiques prédictifs d'effets plus tardifs a été motivé [11]. Pour cela, des paramètres biologiques sont utilisés comme signaux d'alarme : les biomarqueurs.

En résumé, dans le contexte environnemental, les biomarqueurs offrent l'avantage d'être des indicateurs sensibles démontrant que le contaminant a été internalisé par l'organisme, a été distribué dans les différents tissus et a induit des effets toxiques au niveau de cibles spécifiques [04].

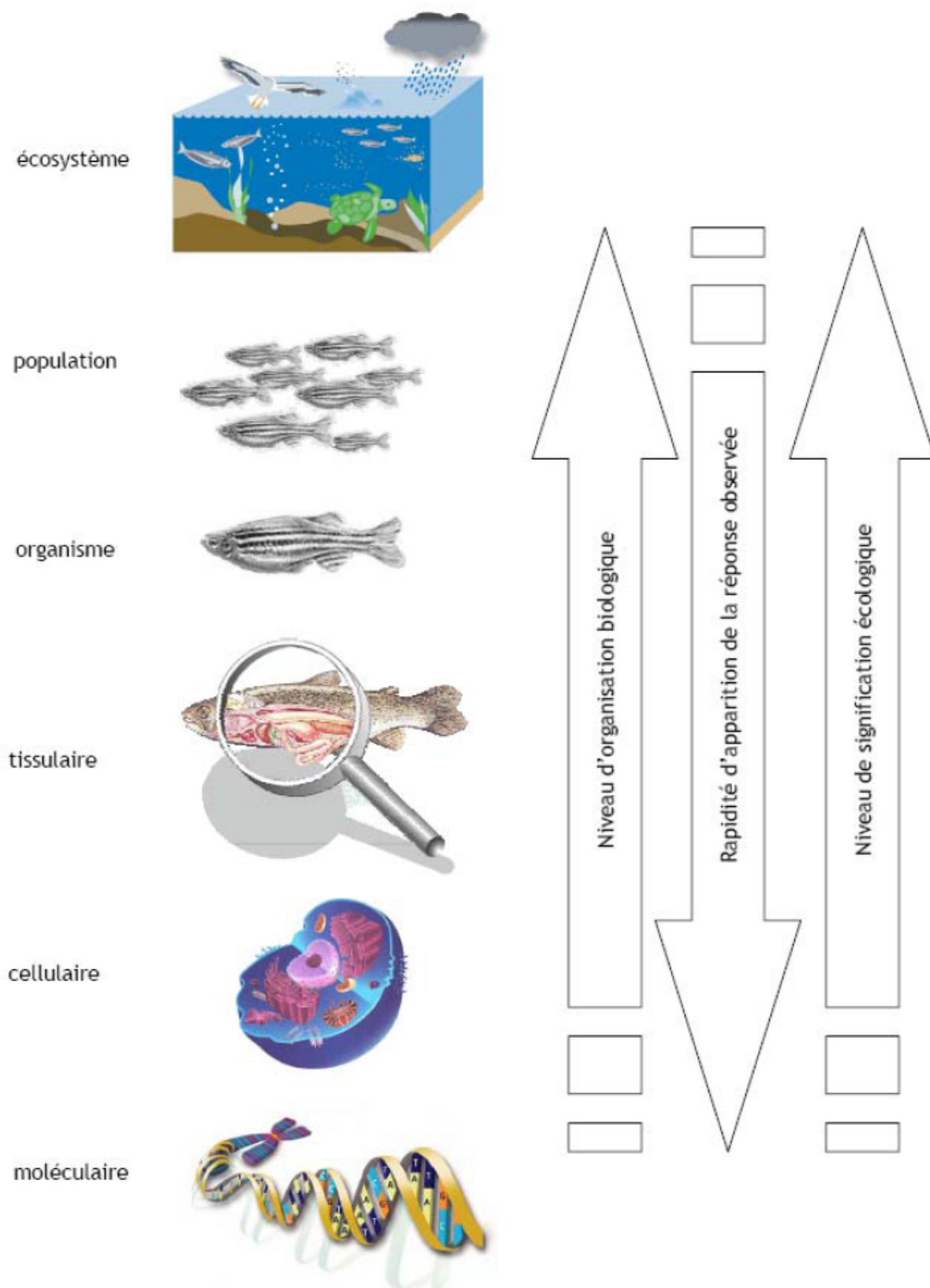


Figure 2.1 : Représentation graphique de l'ordre séquentiel des réponses à un stress au sein d'un système biologique.

2.4.1 Les biomarqueurs : notions et concepts

2.4.1.1 Définition et intérêts biologiques

Plusieurs définitions ont été données au terme “biomarqueur”. Ce terme est généralement utilisé dans un sens très large, incluant quasiment toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel ; ce danger pouvant être chimique, physique, ou biologique [10].

La définition ayant été retenue par [Lagadic et al \[02\]](#) est la suivante : un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. Ce changement peut alors être associé à l'exposition en elle-même, aux effets toxiques ou à la sensibilité vis-à-vis du contaminant environnemental.

Dans ce sens, il est important de replacer l'approche des biomarqueurs dans un contexte fonctionnel. En effet, qu'ils interviennent dans le maintien de l'homéostasie ou qu'ils traduisent des perturbations fonctionnelles, la possibilité d'utiliser les biomarqueurs mesurés au sein des individus comme marqueurs précoces de dysfonctionnement ultérieurs au niveau des populations apparaît effectivement comme une éventualité particulièrement attractive [02].

Des expériences en conditions contrôlées ont montré l'intérêt des biomarqueurs pour évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques [03, 65, 66] conduisant à proposer de les utiliser dans les programmes de surveillance de la qualité de l'environnement. L'avantage du biomarqueur dans le suivi de la qualité de l'environnement est qu'il reflète la biodisponibilité, à la fois des molécules-mères et des produits de dégradation [18]. Ce type d'information est particulièrement important lorsque, par exemple, les processus de dégradation rendent les métabolites plus biodisponible, donc potentiellement plus dangereux, que les molécules mères [03].

Par ailleurs, les biomarqueurs peuvent rendre compte de la distribution des contaminants dans le milieu. En fonction de leur habitat et de leur position dans les réseaux trophiques, les espèces sources de biomarqueurs peuvent en effet fournir des indications sur la façon dont les polluants se diluent dans le milieu ou, au contraire, se concentrent dans certains compartiments de l'écosystème [03].

L'approche fondamentale de la notion de biomarqueur consiste essentiellement en une évaluation de ce type d'outil biologique dans la perspective de leur utilisation chez des organismes exposés à des substances chimiques susceptibles de contaminer leur environnement. De fait, la démarche expérimentale d'évaluation des biomarqueurs consiste non seulement en l'acquisition de connaissances fondamentales mais également en la définition des critères dits de validation, qui rendent compte des possibilités d'utilisation de ces outils biologiques dans les cas, avérés ou pressentis, de pollution de l'environnement [01, 02].

En dépit de ces avantages, le handicap principal à l'utilisation des biomarqueurs dans le milieu naturel demeure l'interférence avec d'autres facteurs de l'environnement. Dans le milieu naturel, différents facteurs peuvent donner lieu à des réponses des paramètres biochimiques/physiologiques utilisés en tant que biomarqueurs. Ainsi les conditions climatiques, les caractéristiques physicochimiques du milieu, les particularités génétiques des espèces, les relations inter-individuelles et/ou inter-spécifiques ou les interactions entre les polluants eux-mêmes qui, dans l'environnement, se trouvent en mélange, peuvent compliquer singulièrement l'interprétation des réponses des biomarqueurs. En effet, la connaissance des facteurs de variation naturelle des biomarqueurs est fondamentale pour distinguer le signal d'une perturbation causée par des polluants du « bruit de fond » que constituent les fluctuations naturelles des biomarqueurs [01, 02, 03, 08].

2.4.1.2 Classification des biomarqueurs

Il est classique, en écotoxicologie, de distinguer trois types de biomarqueurs :

Les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effet de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition [02, 11].

Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, les biomarqueurs d'exposition sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans des liquides corporels (métabolites spécifiques de la conjugaison au glutathion, adduits à l'ADN, etc.) [02]. Dans ce cas, leur suivi consiste en la détection au sein d'un individu de métabolites issus de la métabolisation du xénobiotique ou de produits issus de son interaction avec certaines biomolécules ou cellules cibles [04].

L'utilisation des biomarqueurs d'effet permet de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et, qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, a exercé un effet toxique sur une cible critique [02]. Il s'agit donc d'altérations (biochimiques, physiologiques ou autres) mesurables au sein des tissus ou des fluides corporels d'un organisme et pouvant être reconnues comme étant associées de manière avérée statistiquement ou possible du point de vue mécanistique à une pathologie ou un état sanitaire altéré [10, 11].

Les biomarqueurs de sensibilité indiquent quant à eux la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre au stress induit par l'exposition à un xénobiotique. Cette catégorie de biomarqueurs peut donc notamment inclure des facteurs génétiques [02].

Cependant, et d'après *Amiard et al* [08], cette classification des biomarqueurs ne recouvre pas toujours précisément les mêmes définitions selon les auteurs, ce qui a amené certains écotoxicologues à préférer la division proposée par De Lafontaine *et al* contrastant les biomarqueurs de défense et les biomarqueurs de dommage.

Parmi les biomarqueurs de défense, on comprend entre autres la métallothionéine, les enzymes de biotransformation des HAP et des PCB et les défenses antioxydantes enzymatiques qui sont des systèmes de détoxification ou de dégradation et dont leur teneur augmente en présence de contaminants dans le

milieu [18]. *A priori*, ces mécanismes de défense ont un impact tout à fait positif sur la santé des organismes puisqu'ils vont leur permettre de survivre dans un environnement détérioré. En effet, dans des zones fortement contaminées, de nombreuses espèces de plantes et d'animaux sont capables de faire face à la présence de substances chimiques potentiellement toxiques. Le concept de « coût de tolérance » pose l'hypothèse que la capacité à résister à un xénobiotique présente une dépense d'énergie pour l'organisme, ce qui implique une diminution de l'énergie disponible pour ses autres besoins, c'est-à-dire le métabolisme de base, la croissance et la reproduction [08].

Les biomarqueurs de dommage traduisent une atteinte biologique plus ou moins importante pouvant conduire à une incapacité à se reproduire, voire à survivre. L'importance des effets néfastes en fonction du degré de contamination du milieu est quantifiée par la relation dose/effet. Aux doses les plus faibles, aucun effet néfaste n'est observé mais lorsque la dose augmente, une réponse biologique va apparaître et s'amplifier [08].

2.4.1.3 Qualités requises

Un biomarqueur doit être un indicateur sensible de la biodisponibilité d'un polluant et de réponses biologiques précoces. De manière à évaluer objectivement les qualités des biomarqueurs, les critères ci-dessous sont généralement admis [11] :

- La technique analytique permettant de quantifier le biomarqueur doit être efficace (en termes de sensibilité, justesse et précision), d'un coût relativement peu élevé et facile à mettre en oeuvre ;
- La réponse doit être sensible pour constituer un paramètre d'alarme précoce ;
- Le niveau basal de la variable biologique doit être clairement identifié de manière à distinguer le bruit de fond naturel (variabilité naturelle) du niveau induit par la contamination (signal) ;

- Les mécanismes impliqués dans la relation entre la réponse du biomarqueur et l'exposition au polluant doivent être connus ou, tout au moins, supposés ;
- La signification toxicologique du biomarqueur (c'est-à-dire la relation entre sa réponse et un impact possible sur l'organisme) doit être établie.

A cela il faut ajouter qu'un biomarqueur mesuré au niveau individuel ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer, voire même éventuellement de prédire les effets des polluants sur les populations et communautés évoluant dans leur environnement naturel [02]. Cette exigence n'est pourtant que rarement satisfaite, les biomarqueurs sont alors étudiés plus pour leur contribution à la compréhension mécanistique de l'action des polluants que pour leur pertinence écologique [01, 02, 03].

En plus de ces critères, il a été suggéré que les biomarqueurs doivent être préférentiellement des outils dont l'utilisation s'avère non-invasive ou destructive pour les organismes, de façon à permettre leur mesure sur des espèces protégées voire en voie de disparition [03, 08, 13]. Les caractéristiques biologiques et physiologiques de l'organisme modèle doivent enfin être connues, de manière à ce que les sources de variations non contrôlables (croissance, développement, reproduction, etc.) soient minimisées [04, 08].

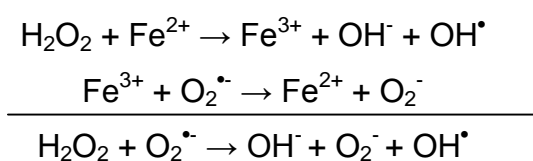
2.5 Etude du stress oxydant

2.5.1 Le système antioxydant cellulaire

L'origine du stress oxydant chez les organismes aérobies provient de la consommation intracellulaire de la molécule d'oxygène qui est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques mais qui génère dans le même temps la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou « *reactive oxygen species* » (ROS) qui sont potentiellement toxiques pour la cellule [08, 67].

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 [04]. La réactivité des ROS, peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes. Toutefois, la formation d'espèces réactives ne s'accompagne pas systématiquement de phénomènes de toxicité. En particulier, certaines espèces réactives sont des intermédiaires de processus physiologiques normaux (respiration cellulaire ou les phénomènes inflammatoires) [04, 68]. Les principales sources de production des ROS proviennent de la phosphorylation oxydative de l'ADP, des chaînes de transport d'électron microsomales, de l'activité phagocytaire et de l'activité de certaines enzymes oxydantes comme la tryptophane dioxygénase, la xanthine oxydase et la cytochrome P450 réductase qui produisent des anions superoxydes et comme la guanyl cyclase et la glucose oxydase capables de générer du peroxyde d'hydrogène [08, 67]. Ainsi, les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydoréduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène non nulle. Du fait de leur très grande réactivité, ces dérivés de l'oxygène peuvent réagir avec la plupart des composés cellulaires. Le contrôle rigoureux de leur formation et de leur élimination par le biais de différents systèmes antioxydants préserve donc les cellules de leurs effets délétères [04, 08].

Par ailleurs, les polluant chimiques sont d'importants producteurs de ROS. En effet, les xénobiotiques connus pour leurs propriétés redox comme les quinones, les métaux de transition, les colorants diazoïques, les herbicides bipyridyles et les composés aromatiques nitrés induisent la formation de radicaux superoxydes [08]. En effet, les métaux de transition (notamment Fe^{2+} et Cu^{2+}), seront susceptible d'induire une réduction du peroxyde d'hydrogène intracellulaire, induisant ainsi la formation d'un ion hydroxyde (OH^-) mais également d'un radical hydroxyle [04, 69]. Cette réaction d'oxydoréduction est alors tout à fait similaire à la réaction de Fenton qui, dans le cas du fer, se décompose ainsi :



Pour pouvoir maîtriser la formation de ces espèces réactives, les cellules disposent d'un complexe antioxydant de défense constitué d'enzymes spécifiques (Superoxyde dismutase, Catalase, Glutathione peroxydase) et de molécules qui piègent les espèces radicalaires au niveau des membranes (vitamine E, β -carotène) ou de la phase aqueuse (acide ascorbique, acide urique et glutathion) [08, 67].

On définit le stress oxydant lorsque la formation des ROS excède les capacités de défense du système antioxydant. Au niveau cellulaire, il se traduit par l'altération et plus particulièrement l'oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines et les lipides et par une perturbation généralisée de la balance redox (ratios GSH/GSSG et NADH/NAD⁺). Ses effets cytotoxiques se traduisent par des perturbations structurales et fonctionnelles comme des inhibitions enzymatiques, des dégradations des protéines, de la peroxydation lipidique, des processus inflammatoires et des phénomènes de morts cellulaires (fig II.2) [08, 67].

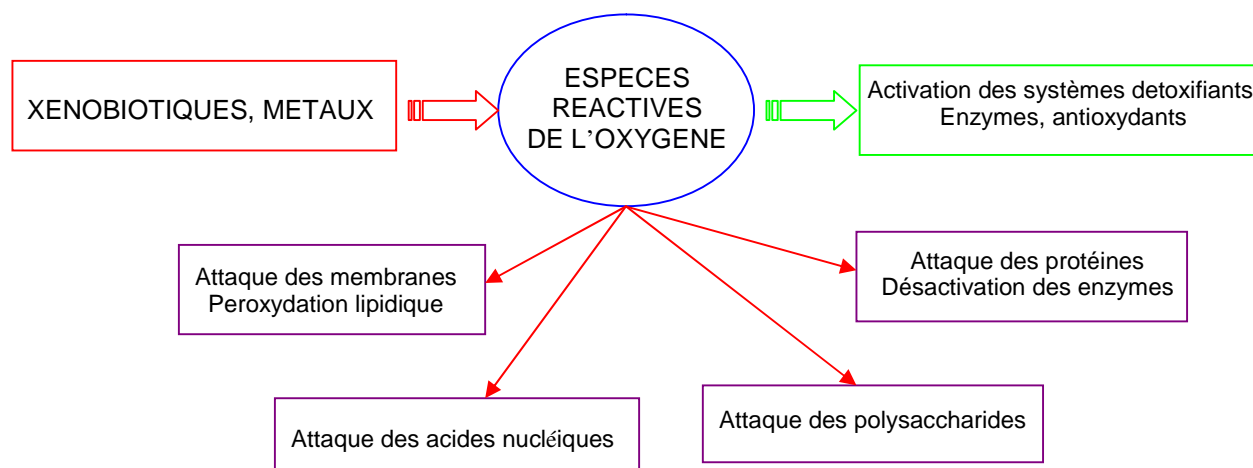
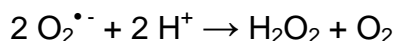


Figure 2.2 : schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène sur les macromolécules [67].

De fait, la mesure des enzymes antioxydantes peut donner une indication du statut antioxydant de l'organisme et peut ainsi être utilisée en tant que biomarqueur du stress oxydant. L'intérêt majeur des paramètres antioxydants en tant que biomarqueurs réside dans le caractère aspécifique de leur réponse, ce qui constitue un avantage dans le contexte de la contamination multiple des écosystèmes [02].

2.5.1.1 Les superoxydes dismutases (SOD)

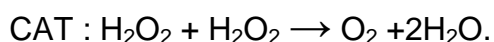
Ces enzymes antioxydantes conventionnellement appelées EC 1.15.1.1 regroupent des métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde selon la réaction suivante [04, 67, 70] :



Ces enzymes possèdent au niveau de leur site actif un métal de transition (qui peut être le cuivre, le manganèse, ou le fer) qui va capter un électron de l'anion superoxide et le transférer au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif. Chaque métal présent au site actif va conférer des propriétés particulières à la SOD, notamment en terme de localisation dans la cellule [67]. Trois sortes de SOD sont ainsi identifiées dans la cellule la SOD à cuivre et à zinc (Cu/ZnSOD) que l'on retrouve dans le cytosol, la Cu/ZnSOD qu'on retrouve au niveau des liquides extracellulaires et la SOD à fer et à manganèse (Fe/MnSOD) qui se trouve dans les mitochondries [70].

2.5.1.2 La catalase (CAT)

Cette enzyme cytosolique appelée conventionnellement EC 1.11.1.6 est une hémoprotéine tétramérique dont chaque sous unité contient un groupement héminique avec Fe^{3+} lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH, H^+ qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous unités résulte en une perte de l'activité catalase. C'est une enzyme importante dans le système de défense antioxydant protégeant les organismes contre un stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante [67, 68, 71] :



Elle limite ainsi la formation de radicaux OH^\bullet . La plupart des cellules aérobies contiennent cette enzyme dans le cytosol et dans les peroxysomes. Elle est présente à de fortes concentrations dans le foie et dans les globules rouges [70].

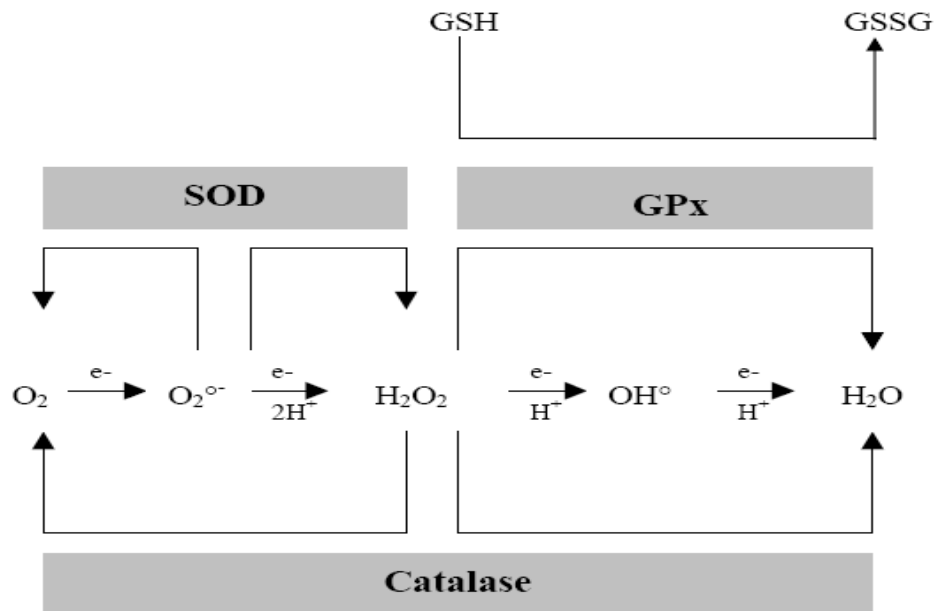
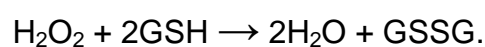


Figure 2.3 : Schéma représentant les réactions catalysées par les 3 principales enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT) [70].

2.5.1.3 Les glutathion peroxydases (GPO_x)

Enzyme à sélénium présente à la fois dans le cytosol et la mitochondrie, transforme le peroxyde d'hydrogène mais aussi les peroxydes lipidiques. Le peroxyde d'hydrogène et les lipoperoxydes sont réduits en présence de glutathion. Deux molécules de glutathion cèdent deux H au peroxyde d'hydrogène. Les deux glutathions forment une liaison disulfure alors que le peroxyde d'hydrogène donne deux molécules d'eau [70] :



Ces peroxydases sont également capables de réduire les peroxydes membranaires issus de l'oxydation des acides gras et du cholestérol, selon le schéma réactionnel suivant [04] :



Parmi ces enzymes, on distingue : la glutathion peroxydase sélénium dépendante (SeGPO_x) ou EC 1.11.1.9 est une métalloprotéine tétramérique dont chaque sous unité contient un atome de sélénium et qui joue un rôle majeur dans la lutte contre les processus de lipoperoxydation endogène et exogène; la phospholipide hydroxyperoxyde glutathion peroxydase (PLGPO_x) ou EC 1.11.1.12, dont le rôle principal est de protéger les liposomes et les biomembranes contre les dommages peroxydatifs et la glutathion peroxydase sélénium indépendante, qui ne réagit que faiblement par rapport aux peroxydes organiques [67, 70].

2.6 Perturbation du métabolisme énergétique

Chez tous les organismes vivants, l'ensemble des processus biochimique et physiologiques est étroitement dépendant de la quantité d'énergie disponible au niveau cellulaire [02]. Concernant les organismes hétérotrophes, l'obtention de l'énergie est conditionnée par la prise de nourriture et la dégradation de celle-ci afin de libérer l'énergie contenue (assimilation). Une fois la nourriture ingérée, les aliments sont soumis notamment à l'action d'enzymes, par le processus de digestion qui représente l'ensemble des processus par lesquels les aliment bruts (glucides, protéines, lipides) sont transformés en des molécules plus petites assimilables, les nutriments (oses, acides aminé, acides gras) [08].

Le foie et le pancréas des vertébrés ainsi que la glande digestive ou hépatopancréas des crustacés et des mollusques jouent des rôles importants dans la digestion des aliment, en synthétisant et en sécrétant les enzymes digestives. Cependant, ces organes sont aussi la cible des contaminants chimiques qui y sont transportés pour leur détoxification. De ce fait, ils constituent les principaux sites d'accumulation des contaminants, et en particulier des contaminants métalliques, chez les animaux aquatiques [08]. Etant donné que la glande digestive ou l'hépatopancréas ont un rôle majeur aussi bien au niveau de la digestion que dans le

stockage et la détoxification des composés toxiques, il semble intéressant de mieux connaître l'effet éventuel des polluants sur l'activité des enzymes digestives sécrétées par ces organes.

Par ailleurs, dans le cadre d'une évaluation de la qualité des milieux, les variations d'activités enzymatiques sont souvent une des premières réponses au stress ; elles représentent donc des points utiles dans la confirmation des effets toxiques avant que ces derniers ne soit perceptibles à des niveaux d'organisation biologiques supérieurs (cellulaire, tissulaire, physiologique) [02, 11].

Le tractus digestif peut exercer un double rôle dans le processus d'écotoxicité puisqu'il constitue à la fois une voie d'absorption et un site d'action potentiel pour les toxiques. Par leur présence dans le tractus digestif, les activités enzymatiques sont susceptibles d'être influencées par les toxiques, et par conséquent d'entraîner des répercussions sur l'ensemble du processus digestif nécessaire à l'obtention d'énergie. En présence de métaux dans le milieu, des réponses différentes sont observées en fonction de l'espèce, de l'enzyme, de l'élément métallique ainsi que du temps et du mode d'exposition étudiés. Des exemples d'inhibition d'activité d'enzymes digestives ont également été mis en évidence lors d'exposition des organismes à des contaminants organiques [08].

Le suivi de l'impacte potentiel des contaminants sur les activités 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 résulter en une diminution de la croissance et de la reproduction avec un impact possible sur le maintien de la population. La mesure de ces variations d'activités enzymatiques a ainsi été proposée par plusieurs auteurs comme biomarqueurs d'exposition [08, 72].

CHAPITRE 3

CHOIX DU MATERIEL BIOLOGIQUE TEST

3.1 Modèle poisson

Les poissons forment un compartiment clé des écosystèmes aquatiques. Des points de vue médiatique, patrimonial ou même naturaliste, ils possèdent une évocatrice plus importante que celle des invertébrés ou des végétaux aquatiques par exemple. Ceci se double d'un intérêt halieutique, ce qui leur confère également une forte valeur économique.

Mais ce sont surtout les caractéristiques biologiques des poissons qui en font de bons indicateurs de l'état des écosystèmes aquatiques. A des échelles de temps et d'espaces très diverses, ils permettent d'apprécier l'intégrité d'un milieu ou d'en évaluer les altérations. Par leur position dans les trophiques, ils sont à même d'intégrer les modifications et les altérations des premiers niveaux de ces réseaux. Les poissons apparaissent comme de bons indicateurs non seulement de la qualité physico-chimique des écosystèmes aquatiques mais de l'intégrité de l'habitat physique. Cette particularité des peuplements de poissons est la base théorique de nombreuses méthodes d'évaluation de la qualité, que ce soit de manière globale, ou plutôt centrée l'habitat physique offert aux poissons [04, 07, 73].

3.1.1 Avantage du modèle poisson

Les poissons, pris comme modèle expérimental, présentent de nombreux avantages [04, 07, 09]:

- Ces vertébrés sont répandus dans l'ensemble des niches écologiques des eaux marines et continentales ;

- Ce sont de bons représentants de la diversité écologique des milieux aquatiques ;
- Les progrès de l'aquaculture facilitent leur élevage et autorisent leur reproduction toute l'année ;
- L'abondance de leurs œufs et la grande sensibilité de leurs stades embryolarvaires facilitent la réalisation de tests significatifs courts et d'un coût réduit ;
- Leur tolérance aux variations des facteurs abiotiques du milieu en fait de bons candidats pour le développement de l'écotoxicologie multifactorielle.

Enfin, la majorité des chercheurs considèrent que les poissons sont des organismes d'essai parce qu'ils sont disponibles tout au long de l'année, sensibles aux toxiques, favorables pour des essais au laboratoire, et font donc l'objet de valeur pour l'évaluation de la pollution aquatique [09].

3.1.2 Modèle biologique « Tilapia poisson du Nil : *Oreochromis niloticus* »

Dans cette étude le tilapia *Oreochromis niloticus* (famille des Cichlidae) a été choisi comme organisme d'essai.

Le tilapia peut facilement vivre dans des conditions de laboratoire. Ainsi, il fit l'objet de plusieurs travaux de recherches et de tests d'écotoxicité [09, 71, 74, 75, 76, 77, 78]. Le Tilapia a été aussi choisi pour sa disponibilité et sa répartition géographique.

3.1.2.1 Systématique [79]

Règne : Animal

Embranchement : Métazoaires

Super classe : Gnatostomes

Classe : Poissons

Sous classe : téléostéens

Ordre : Percomorphes

Sous ordre : Perciformes

Super famille : Percoïdes

Famille : Cichlidae

Genre : *Oreochromis*

Espèce : *Oreochromis niloticus*

3.1.2.2 Morphologie [80]

Les espèces de cette famille se reconnaissent aisément par:

- Le tilapia a une forme trapue (fig III.1) ;
- Tête portant une seule narine de chaque côté ;
- Os operculaire non épineux ;
- Corps comprimé latéralement, couvert essentiellement d'écaillés cycloïdes et parfois d'écaillés cténoïdes ;
- Longue nageoire dorsale à partie antérieure épineuse ;
- Nageoire anale avec au moins les 3 premiers rayons épineux ;
- Incubation buccale avec garde uniparentale maternelle.

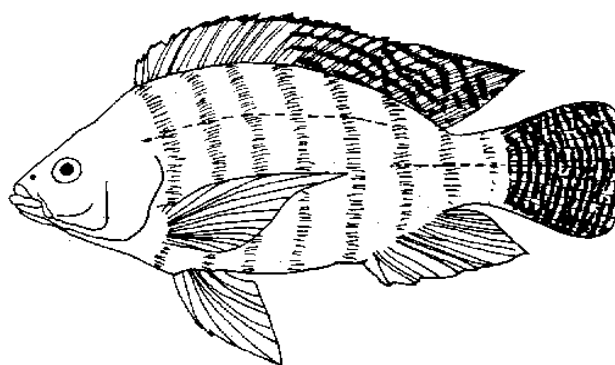


Figure 3.1 : Caractéristiques morphologiques spécifiques de *Tilapia nilotica* adulte avec des barres verticales noires typiques sur la nageoire caudale.

3.1.2.3 Distribution géographique

Tilapia, poisson d'eau douce présente une répartition originelle strictement africaine couvrant les bassins du Nil ; du Niger ; des Volta et du Sénégal [81]. 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. Maintenant les tilapias sont cultivés dans le monde entier (production aquaculture) [82].

En Algérie, l'introduction de *O. niloticus* est très récente (Bou-Ismaïl Avril 2002), et a porté sur 4000 alevins et 200 géniteurs importés d'Égypte.

3.1.2.4 Ecologie

Le poisson *T. nilotica* se rencontre en milieu naturel entre 13,5° et 33°C [83]. La température optimale pour une meilleure croissance des individus est entre 25 et 28°C [82]. Mais l'intervalle de tolérance thermique observé en laboratoire est plus large : 7 à 41°C pendant plusieurs heures [83]. Au stade juvénile, la mortalité des spécimens commence à apparaître à 13,6°C, à une température de 8,6°C il y a mortalité totale [82]. Quant à la température optimale de reproduction elle se situe entre 26 et 28°C, le minimum requis étant 22°C. Cette espèce ne se nourrit pas en dessous de 15°C [82, 83].

L'euryhalinité de *T. nilotica* est également bien connue [84] car, on le rencontre dans des eaux de salinité variable. Toutefois au-delà de plus ou moins 20‰ l'espèce subit un stress important qui la rend sensible à une série de maladies, réduisant sa compétitivité. De plus, la reproduction serait inhibée en eau saumâtre à partir de 15 à 18‰ [83, 84].

De même, *Oreochromis niloticus* tolère des fluctuations de pH importantes, ce qui explique sa présence dans des eaux avec des valeurs de pH comprise entre 5 et 11. L'optimum de pH se situe entre 6.5 et 8.5.

Au point de vue concentration en oxygène dissous, cette espèce tolère à la fois de nets déficits et des sursaturations importantes, son exigence en oxygène dissous est de 4 à 5 mg/l. Ainsi jusqu'à 3 ppm d'oxygène dissous *T. nilotica* ne présente pas de difficulté métabolique particulière mais au dessous de cette valeur, un stress respiratoire se manifeste

3.1.2.5 Régime alimentaire

Etant donné que les arcs branchiaux de *T. nilotica* disposent de branchiospines fines, longues et nombreuses et de microbranchiospines, l'eau qui y transite est véritablement filtrée de son plancton. Cette espèce est donc, en milieu naturel, essentiellement phytoplanctonophage et consomme de multiples espèces de Chlorophycées, Cyanophycées, Euglenophycées, etc.; ce qui ne l'empêche pas également d'absorber du zooplancton et même des sédiments riches en bactéries et Diatomées.

Mais en milieu artificiel (systèmes de pisciculture) cette espèce est pratiquement omnivore valorisant divers déchets agricoles, tirant parti des excréments de volailles, de déchets ménagers, acceptant facilement des aliments composés sous forme de granulés, etc. Cette capacité d'adaptation à divers aliments et déchets est phénoménale et est à la base de sa haute potentialité pour la pisciculture [81].

3.1.3 Activités métaboliques des poissons

3.1.3.1 Métabolisme de l'oxygène

L'activité métabolique du poisson est traduite par sa consommation en oxygène. Celle-ci diminuant le taux d'oxygène ambiant, sa connaissance est fondamentale pour déterminer les renouvellements d'eau nécessaires dans les élevages. Cette consommation est fonction de l'espèce, la taille, la température ainsi que l'état physiologique et nutritionnel du poisson [85].

L'oxygène doit circuler du milieu extérieur vers les mitochondries et le système cardio-respiratoire est à la base de ces flux. La régulation de l'apport d'oxygène aux tissus se fait au niveau de deux sites : celui de la diffusion à travers les épithéliums respiratoires et celui du transport des surfaces respiratoires vers les tissus. Le fonctionnement du système cardio-respiratoire peut être appréhendé de façon simple par le suivi de la consommation d'oxygène (MO_2), autrement dit le taux métabolique aérobie [86].

De façon très classique, on considère que le métabolisme de routine d'un organisme varie entre deux limites. La limite basse est le taux métabolique basal ou métabolisme de maintenance : c'est le taux métabolique, incompressible, d'un organisme au repos, à jeun et hors maturation sexuelle [87]. La limite haute est le métabolisme maximal. Celui-ci est parfois confondu avec le taux métabolique actif qui est associé à la dépense énergétique mesurée durant un exercice soutenu de forte intensité [88]. L'écart entre le métabolisme standard et actif représente le registre métabolique aérobie, qui quantifie la quantité d'énergie mobilisable par un organisme à un moment donné et dans un environnement donné.

Lorsque les apports nutritifs ne sont pas limitants, on peut considérer en première approximation que la question de l'apport et de la distribution de l'énergie se restreint à celle de l'approvisionnement, du transport et de la distribution de l'oxygène (accepteur final d'électrons) vers les sites cellulaires de production d'ATP i.e., les mitochondries. Au sens large, la respiration est l'ensemble des mécanismes physico-chimiques et biochimiques qui fournissent à l'être vivant l'énergie nécessaire à son métabolisme [86].

3.1.3.2 Les déchets métaboliques

Tous les animaux tirent leur énergie de la consommation de molécules complexes. Ces molécules sont métabolisées par l'animal qui assure ainsi ses fonctions physiologiques (croissance, reproduction etc.). Le rendement de ces réactions biologiques étant inférieur à 100%, des sous-produits du métabolisme sont rejetés par l'animal sous forme dissoute et particulaire [89].

Les excréments représentent la fraction non digérée de l'aliment, sous forme de particules rejetées par le tube digestif. La composition chimique (carbone, azote, phosphore, éléments traces) et les caractéristiques physiques (taille, masse volumique, hydratation, etc.) des fèces sont fonction, d'une part, de l'aliment et, d'autre part, du poisson (espèce, stade d'élevage, etc.). La composition des fèces est évaluée à partir de mesures normalisées de digestibilité (rapport entre la fraction digérée et la fraction ingérée) des matières premières entrant dans la composition de

l'aliment ; la digestibilité globale étant la somme des digestibilités des différentes matières premières qui le composent [85, 89].

Les sous-produits dissous sont le résultat de l'excrétion, principalement par les branchies et le rein. Les principaux métabolites dissous sont le CO_2 pour le carbone, l'ammoniaque et l'urée (NH_3 et $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) pour l'azote et les orthophosphates (PO_4) pour le phosphore. Le CO_2 rejeté représente environ 50% du carbone ingéré. L'ammoniaque est la principale forme d'excrétion de l'azote (80 à 90%) et chez la majorité des poissons, l'azote excrété représente 50 à 70% de l'azote ingéré. L'excrétion de phosphore ne représente en moyenne qu'environ 20% du phosphore ingéré. L'azote, excrété passivement à travers les branchies, et le phosphore, excrété par le rein (comme la plupart des ions divalents), sont rejetés à des taux qui varient essentiellement en fonction de la qualité de l'aliment, du stade d'élevage et de l'espèce de poisson [89].

3.1.3.2.1 Métabolisme et excrétion des composés azotés

Les poissons tirent une grande partie de leur énergie des protéines et les principaux produits d'excrétion sont des composés azotés : azote ammoniacal, urée, acides aminés, créatine, créatinine, acide urique et bases puriques [90]. Le lieu principal de l'excrétion azoté est la branchie dont la riche vascularisation favorise la diffusion des molécules de faible poids moléculaire telles que l'azote ammoniacal, l'urée, les amines et leurs dérivés. Par contre, l'excrétion des molécules plus complexes (acide urique) est assurée par la fonction rénale; cette excrétion urinaire, bien qu'existante, est faible. Dans les deux voies, l'ammoniaque (NH_3 et NH_4^+) est le principal produit excrété (80 à 85 % de l'azote total excrété) avec l'urée. L'élimination peut s'effectuer sous forme passive par diffusion du NH_3 sanguin et par extraction des acides aminés sanguins et néoformation de l'ammoniac, évacué ensuite à travers les couches lipidiques de la membrane [85].

Dans tous les organes, les premières étapes de la production d'ammoniaque sont, d'une façon générale, très voisines. Elles comportent des processus de désamination des acides aminés (par la désaminase spécifique à l'acide aminé

considéré), d'amides (glutamine, asparagine) et également de désamination de purines, pyrimidines, nucléotides et nucléosides. La production de NH_3 dans le muscle dépend de l'activité physique [85, 89, 90].

3.1.3.2.1.1 Les rejets azotés directs des poissons

Les sous-produits de métabolisme sont rejetés sous forme dissoute et particulaire. Chez les poissons, la proportion d'azote excrété avec les fèces est représentée par la fraction non digestible des protéines de l'aliment. Par ailleurs, De nombreuses études montrent que l'ammoniaque représente entre 50 et 90% de l'azote dissous total avec des variations liées aux espèces et aux conditions d'élevage. L'excrétion de cet azote dissous se compose de l'excrétion endogène, liée au catabolisme des protéines corporelles (appelé métabolisme de base) et de l'excrétion exogène, liée au catabolisme des protéines alimentaires [91].

3.1.3.2-2 Facteurs influençant l'excrétion azotée dissoute

L'excrétion ammoniacale varie en fonction de la quantité et de la qualité des protéines ingérées, le nombre de repas et la taille de l'individu. Le poids est un facteur influençant sensiblement l'excrétion azotée tant endogène que post alimentaire. Les quantités d'ammoniac et d'urée excrétées sont d'autant plus importantes que les poissons sont jeunes [85, 91].

Toute augmentation de la concentration ammoniacale ambiante peut influencer sur l'excrétion branchiale en réduisant le gradient de diffusion de la base libre NH_3 [85]. Par ailleurs, L'augmentation de la température provoque une augmentation de l'activité métabolique des poissons et induit par-delà même une augmentation de l'excrétion azotée de nombreuses espèces. D'autres paramètres comme l'état physiologique, le stress... entrent également en ligne de compte [85, 91].

3.1.3.2-3 Métabolisme et excrétion des composés phosphorés

La majeure partie du phosphore se trouve concentrée dans la charpente des individus (arêtes ou os), les écailles en comportent une part non négligeable. Le phosphore est très souvent associé au calcium, en particulier dans l'élaboration des éléments osseux. Le squelette des poissons téléostéens contient 85 à 90 % du phosphore total sous forme d'apatite de calcium.

Le phosphore est aussi présent dans toutes les cellules de l'organisme des vertébrés où il intervient dans la composition des acides nucléiques (ARN, ADN) et des membranes cellulaires. Il joue un rôle fondamental dans les métabolismes lipidique, protéique et glucidique. Le phosphore est accumulé en premier lieu dans les tissus mous (foie, rein, muscle...) avant d'être fixé dans les os [85, 91].

Les bilans de masse en phosphore effectués dans différents élevages ont pu montrer qu'il est essentiellement éliminé sous forme particulaire. Les taux d'excrétion par cette voie peuvent atteindre 60 à 80% du phosphore excrété total [91].

Par rapport à l'excrétion d'azote dissous, dont la production ammoniacale représente un risque d'auto toxicité pour les élevages, l'excrétion en phosphore dissous, moins toxique que l'ammoniaque pour les poissons, n'a pas fait l'objet d'un grand intérêt. De plus, l'excrétion de phosphore dissous ne représente qu'une faible part du phosphore total [91].

Peu de données sont disponibles sur les facteurs influençant sur le rythme d'excrétion du phosphore [85]. Malgré un manque de recherches et de connaissances sur l'excrétion phosphorée des poissons, il est fort probable que les facteurs influençant cette excrétion soient les mêmes que ceux influençant l'excrétion azotée [92].

3.2 Choix du matériel biologique test : Moule

La moule est un mollusque bivalve sessile fixé aux substrats solides dans les infranctuosités des rochers battus et éclairés de l'étage médiolittoral qui sont favorables à l'installation de moulières naturelles. Elle s'accroche en grappes et se

fixe grâce à sa capacité de s'écrêter un faisceau de filaments soyeux que l'on appelle « byssus », on la trouve dans les mers du monde entier quoi qu'elle préfère les eaux froides. Elle est capable de supporter une longue immersion grâce à une réserve d'eau entre les deux valves, elle se nourrit de diatomées de phytoplancton et de débris organiques. La moule utilise son appareil branchial comme un filtre qui joue le rôle d'un tamis, en effet elle filtre jusqu'à 100l eau/j.

De même, La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants présents dans son environnement, c'est la raison pour la quelle elle à été choisie comme espèce bio indicatrice dans un grand nombre de programme de surveillance de la qualité du milieu marin [93, 94, 95, 96, 97].

3.2.1 Avantage du modèle moule

En effet, ces bivalves présentent des caractéristiques qui en font d'eux de bons bioindicateurs en raison de [05] :

- Leur large répartition géographique allant des régions tempérées aux régions subarctiques ;
- Leur mode de vie sessile et euryhalin ;
- Leur aptitude d'accumuler des métaux présents dans l'environnement avec un facteur de concentration de l'ordre de 10^3 à 10^5 par rapport à l'eau environnante ;
- La stabilité de leur population ;
- Leur tolérance aux divers stress ;
- La possibilité de les transplanter ;
- Vecteur de contamination par leur consommation par l'homme.

3.2.2 Modèle biologique « la moule méditerranéenne : *Mytilus galloprovincialis* »

3.2.2.1 Systématique

Selon Lindner [98] et Kornprobst [99], la moule *Mytilus galloprovincialis* est classée comme suit:

Règne :	Animal
Sous règne :	Métazoaire:
Embranchement :	Mollusques
Classe :	<i>Bivalvia</i>
Sous-classe :	<i>Lamellibranchia</i>
Ordre :	<i>Mytiloidale</i>
Superfamille :	<i>Mytilacae</i>
Famille :	<i>Mytilidae</i>
Sous-famille :	<i>Mytilinae</i>
Genre :	<i>Mytilus</i>
Espèce :	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

Selon [Lindner \[100\]](#), *Mytilus galloprovincialis* est souvent considérée comme une sous-espèce de *M. edulis*.

3.2.2.2 Description de *Mytilus galloprovincialis*

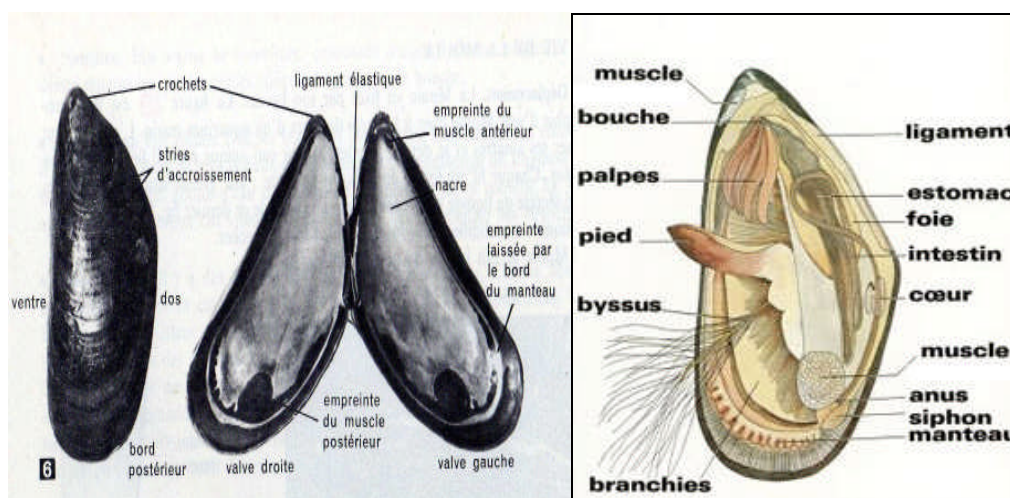
Les figure 3.2 et 3.3, ci-dessous, illustre la description de la moule *Mytilus galloprovincialis*.



Figure 3.2 : La moule *Mytilus galloprovincialis*.

Le corps de la moule est protégé par une coquille formée de deux valves égales (équivalve), qui s'ouvrent lorsque l'animal meurt, le corps, entièrement mou et non segmenté, est enveloppé dans un manteau que l'on peut décoller de la coquille, le manteau qu'est formé de deux lames, délimites une cavité palléale qu'est remplie d'eau de mer. La moule est aussi constituée de pied, de byssus, muscle adducteur postérieur et antérieur qui assurent le rapprochement des deux valves. La moule ne

possède pas de tête distincte, mais la bouche permet de reconnaître la partie antérieure de l'animal. Le cœur visible par transparence indique la région dorsale.



(A) (B)
Figure 3.3 : Corps et morphologie de la moule *Mytilus galloprovincialis* :
(A)- Face externe et interne de la coquille, (B)- Face ventrale.

La coquille qui est de nature calcaire (carbonate de calcium) est d'une couleur noirâtre avec des reflets bleutés, elle représente des courbes régulières : les stries d'accroissement qui sont les témoins des étapes successives de la croissance. Le corps est enveloppé par deux lobes du manteau qui secrète la coquille. Les lobes sont séparés l'un de l'autre et laissant sortir le pied ainsi que le byssus, ils délimitent une cavité remplie de l'eau de mer : c'est la cavité palléale. De cette dernière sorte le pied et la touffe de filaments du byssus eux même sortent de l'orifice de la glande du byssus. Dans la face ventrale se trouve la masse viscérale de la moule, de part et d'autre de cette dernière se disposent quatre lames fines et striés transversalement : ce sont les branchies qui baignent dans la cavité palléale.

3.2.2.3 Répartition géographique

L'espèce *M. galloprovincialis* se rencontre sur les côtes Atlantiques du sud de l'Irlande et la Cornouaille, sur les côtes Atlantiques de l'Europe et de l'Afrique du Nord, sur le littoral de la Méditerranée à l'exception du sud de la Méditerranée orientale et sur les côtes de l'Adriatique et de mer noire [101].

CHAPITRE 4

MATERIEL ET METHODES : STRATEGIE EXPERIMENTALE, DISPOSITIFS ET METHODES ANALYTIQUES

Dans le but d'utiliser des outils biologiques pour la gestion, l'exploitation et la surveillance des écosystèmes aquatiques (eaux continentales et eaux marines), deux modèles biologiques à savoir le tilapia *Oreochromis niloticus*, poisson d'eau douce, et la moule *Mytilus galloprovincialis*, espèce marine, ont été employés afin de mieux cerner les thématiques de recherches de l'écotoxicologie moderne en laboratoire et *in situ*, dont l'objectif principal est la contribution à la recherche de biomarqueurs comme réponse précoce susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de l'écosystème aquatique ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification.

4.1 Modèle Poissons

Dans le but d'utiliser le modèle poisson comme bioindicateur du niveau de pollution par les métaux traces, deux stratégies de tests d'écotoxicité (courtes durées et chronique) ont été réalisées aux niveaux des laboratoires de CNRDPA ; Bou-Ismaïl, dans des aquariums d'élevage.

Les Tilapias, employés comme modèle biologique, sont obtenus du service aquaculture département des ressources vivantes (CNRDPA). Ils ont été transférés au laboratoire pour faire l'objet de cette présente étude.

Une période de deux semaines d'adaptation des poissons avec les conditions expérimentales précède chaque test de contamination par les différents polluants métalliques utilisés.

L'ensemble des poissons est incubé dans des conditions environnementales identiques. L'emploi des pompes à air et des thermostats assure la saturation de l'eau des aquariums par de l'oxygène dissout et le maintient d'une température moyenne de 25°C. Les individus sont nourris trois fois par jour par un aliment type Aqua bio.

En effet, l'acclimatation est une étape cruciale dans la mise en place d'une expérimentation puisqu'elle doit couvrir une période suffisante pour que les organismes s'adaptent aux conditions de laboratoire. Il est généralement admis qu'un maintien au laboratoire durant une période minimale de deux semaines après réception des organismes est nécessaire à l'adaptation de ces derniers au nouvel environnement que constitue le dispositif expérimental. Nous sommes donc partis de cette valeur [04].

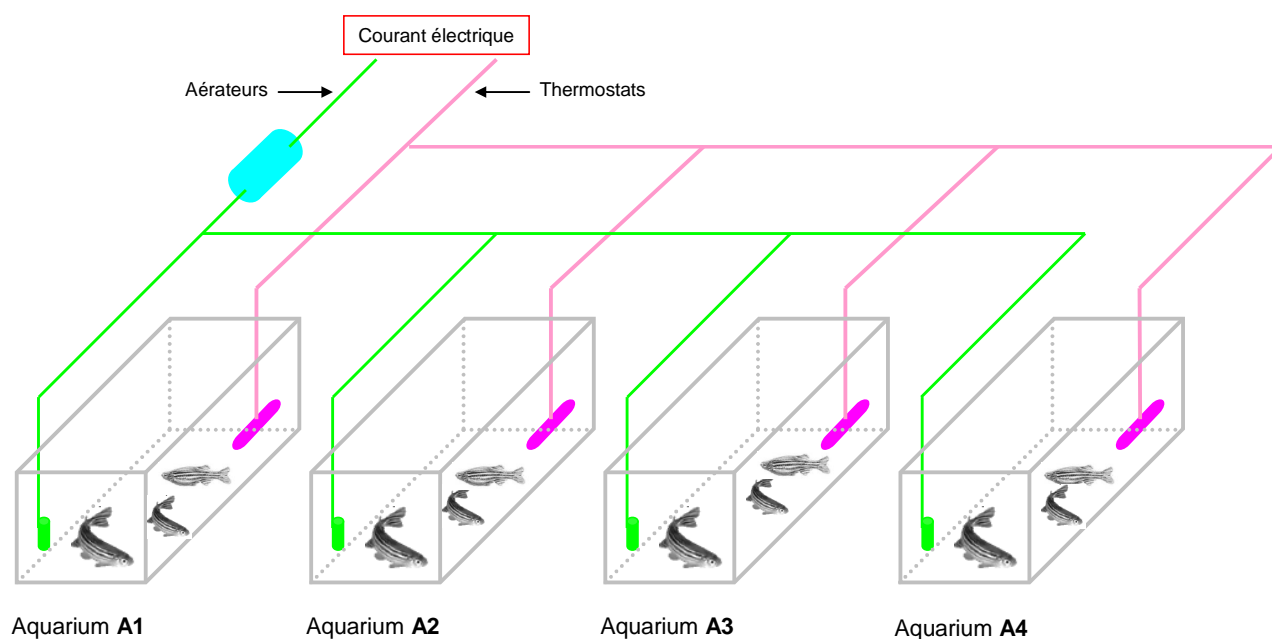


Figure 4.1 : Dispositif expérimental.

4.1.1 Tests d'écotoxicité chronique

Les tilapias au nombre de 60 individus males, de poids moyen initial (21.1 ± 3.1 g) et de taille moyenne initiale (10.85 ± 0.65 cm), ont été répartis dans des aquariums

rectangulaires « 70x35x40cm » dont chacun contient 15 individus. Après la deuxième semaine d'adaptation la moitié des individus est soumise à une concentration de 01mg/l de cuivre (Cu^{2+}) et les restes sont maintenus comme des témoins. L'ensemble des poissons est incubé dans des conditions environnementales identiques pour une période de 42 jours comme cycle de contamination et 21 jours comme cycle de décontamination (fig IV.2).

L'eau des aquariums est renouvelée deux fois par semaine pour minimiser les pertes en polluant et l'effet toxique des composés azotés.

Les mesures du poids de l'animal, par un ichtyomètre et de sa taille par une balance analytique, durant le cycle expérimental, servent à calculer la ration alimentaire à donner aux poissons et à étudier l'évolution de la croissance de ces derniers.

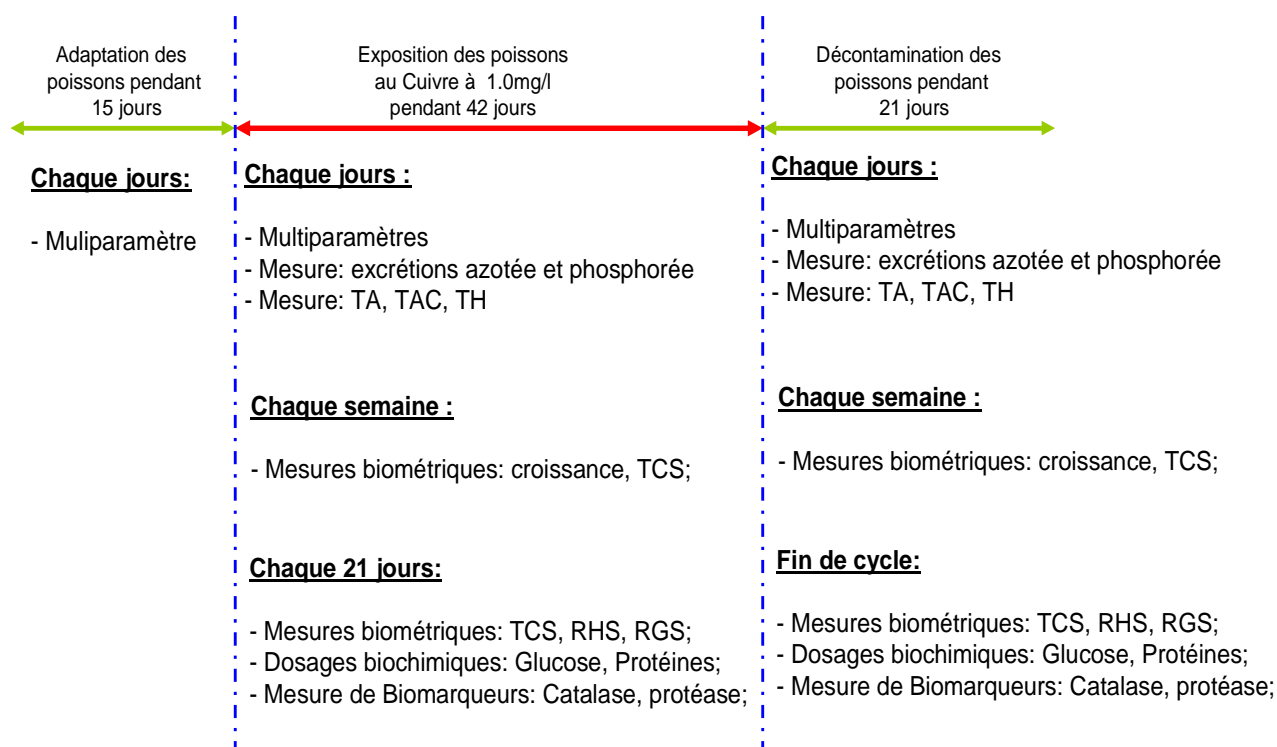


Figure 4.2 : Planning expérimental pour les périodes d'étude (test chronique).

4.1.2 Tests d'écotoxicité courtes durées

Les poissons sont par la suite de l'étape d'acclimatation répartis en groupes de 05 individus dans quatre aquariums rectangulaires «70x35x40cm ». Ainsi, les

poissons sont exposés pendant 4 jours à des concentrations de 0,5 ; 1,0 et 1,5mg/l de : Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} et le mélange polymétallique de tous ces derniers (Chaque polluant est testé à part). Chaque manipulation est automatiquement comparée à un aquarium témoin (0mg/l polluant métallique). Les trois concentrations choisies de chaque élément métallique ainsi que le mélange polymétallique ont été testées en vue d'établir des relations doses-réponses entre la pression chimique représentée par le métal et les réponses biologiques observées.

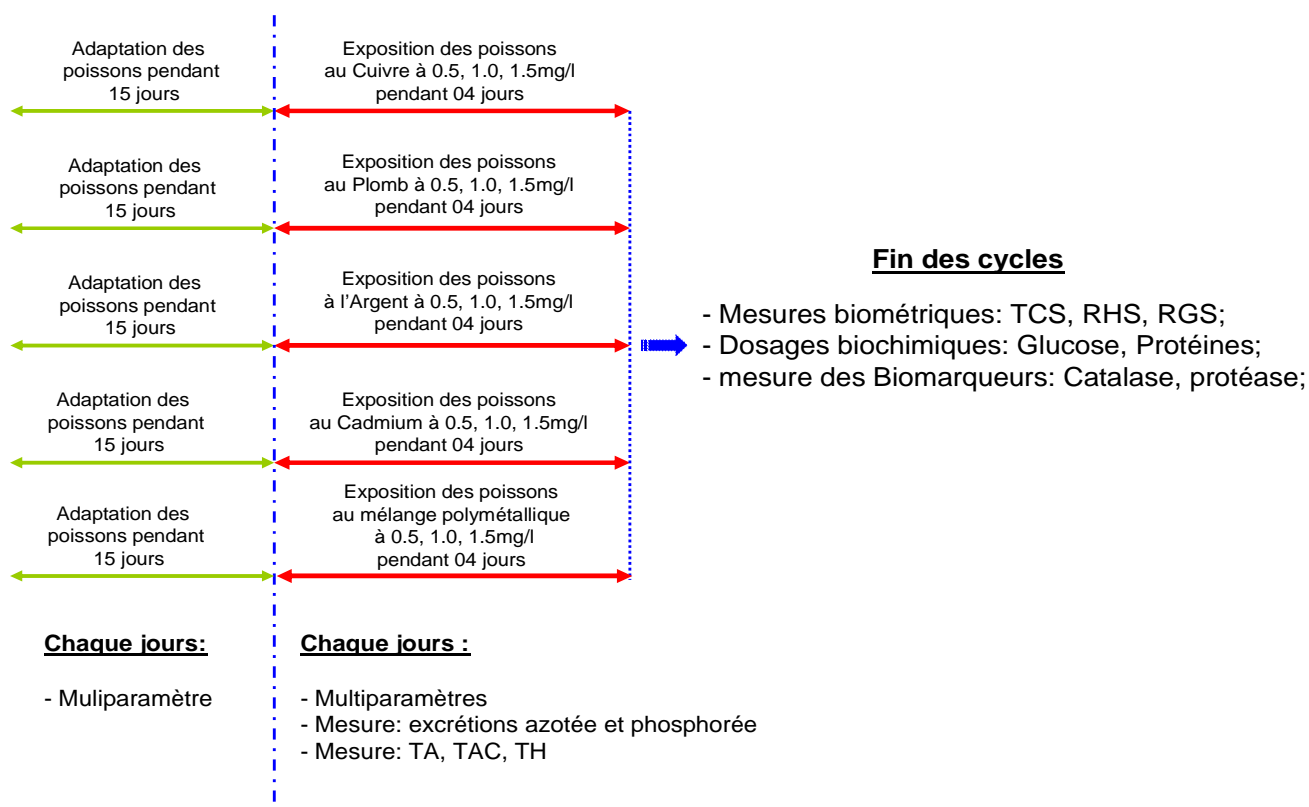


Figure 4.3 : Planning expérimental pour les périodes d'études (tests courte durée).

4.1.3 Analyses physico-chimiques et microbiologiques de l'eau d'élevage

L'eau douce destinée à l'élevage des poissons subissait un ensemble de mesures physicochimiques à savoir TA, TAC, TH et un contrôle bactériologique dans le but de s'assurer de sa qualité convenable à la survie des poissons. D'autre part il a fallu minimiser au maximum toute sorte de stress pouvant conduire à un effet additif au stress chimique causé par les contaminants métalliques.

Les différents modes opératoires avec un protocole détaillé de l'ensemble des tests physicochimiques et microbiologiques sont récapitulés dans l'annexe (B).

4.1.4 Analyse physico-chimique et microbiologique de l'aliment

Chez les poissons, la prise alimentaire, l'activité physiologique ainsi que celle des enzymes digestives contribuant à l'équilibre de la balance du métabolisme énergétique sont dépendantes de la quantité et de la qualité d'aliment disponible. Ce dernier étant donc un facteur déterminant de la réussite d'un élevage des individus. De fait, un contrôle physico-chimique et bactériologique est effectué sur l'aliment donné aux spécimens dans le but de s'assurer de sa valeur énergétique d'une part et de sa qualité hygiénique d'autre part. A noter qu'une mauvaise qualité (nutritionnelle ou hygiénique) de la nourriture peut conduire à un stress supplémentaire chez les poissons de nos tests.

Comme pour le cas de l'eau d'élevage, les protocoles expérimentaux sont détaillés dans l'annexe (B) également.

4.1.5 Suivi et mesure des paramètres au cours des cycles expérimentaux

4.1.5.1 Paramètres physicochimiques (Eau d'élevage)

La température, la conductivité, TDS, la salinité, l'oxygène dissout et le pH sont mesurés tous les jours avant et après chaque nutrition des individus au moyen d'un Multiparametre YSI model 556. «voir annexe (C)»

4.1.5.2 Suivi de l'excrétion azotée et phosphorée

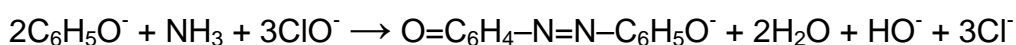
Environ 500 ml sont prélevées chaque jours à 08^h30 de chaque aquarium pour être par la suite filtrées en utilisant une rampe de filtration avec des filtres ordinaires.

Le filtrat ainsi récupéré est destiné au dosage du phosphore et des différentes formes d'azote dissous.

• Dosage de l'azote ammoniacal par la méthode au bleu d'indophénol [102]

❖ Principe

La méthode décrite mesure la totalité de l'azote ammoniacal, soit $\text{N-NH}_3 + \text{N-NH}_4^+$, symbolisé par $\text{N-NH}_{3,4}$. 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'indophénol absorbant à 630 nm.

❖ Mode opératoire

03ml du réactif (A), solution de phénol-nitroprussiate « voir annexe (C) », sont additionnés à 100ml du filtrat récupéré. Directement après homogénéisation, 03ml du réactif (B) solution alcaline d'hypochlorite « voir annexe (C) » sont ajoutés au mélange.

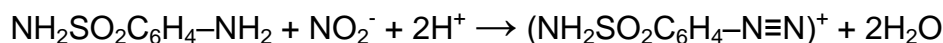
L'échantillon final homogénéisé est placé à l'obscurité pendant une nuit à température ambiante. Ainsi l'absorbance est mesurée à 630nm.

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

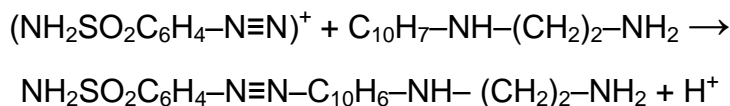
• Dosage de l'azote nitreux [102]

❖ 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 (C), solution de sulfanilamide « voir annexe (C) », est ajouté à 50ml de filtrat. Après homogénéisation, on laisse reposer 02 à 08 minutes et on ajoute 01ml de réactif (D) solution de n-naphtyl-éthylènediamine « voir annexe (C) » 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.

• Dosage de l'azote nitrique [102]

❖ Principe

La méthode retenue quasi universellement est celle fondée sur le dosage des ions NO_2^- obtenus par réduction quantitative (> 95%) des ions NO_3^- . On mesure donc en réalité la somme des concentrations des ions NO_2^- et NO_3^- . Par déduction de la concentration en nitrites, déterminée sans réduction, on obtient la concentration en nitrates.

La réduction est effectuée par passage de l'échantillon sur une colonne de cadmium traité au cuivre.

❖ Mode opératoire

02ml de la solution concentrée de chlorure d'ammonium « voir annexe (C) » est additionné à 100ml de filtrat, le tout est versé dans une colonne réductrice en cadmium traité par le cuivre. Les premiers 50ml sont rejetés et le reste est récupéré afin de le traité de la même façon que le cas des nitrites.

• Dosage du phosphore [102]

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

❖ Mode opératoire

10ml du mélange-réactif phosphore « voir annexe (C) », 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.

4.1.5.3 Paramètres biométriques

A la fin de chaque test court durée, l'ensemble des individus de chaque aquarium est enlevé et anesthésié 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.

Dans le test chronique 06 à 08 individus sont prélevés de chaque groupe de test (témoin et contaminé) après 21 jours, 42 jours et à la fin du cycle expérimental (63 jours). Les individus sont anesthésiés et en procède de la même manière, pour les calculs des rapports somatiques, que dans le cas des tests courtes durées.

❖ Rapport hépato somatique RHS

Il est donné par l'expression suivante [67, 103, 104, 105, 106] :

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

❖ Rapport gonado somatique RGS

Il est exprimé comme suit [09, 105, 107] :

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

❖ Taux de croissance spécifique TCS

Le taux de croissance spécifique correspond à la croissance pondérale moyenne quotidienne du poisson. Il est exprimé en % par jour

Il est donné par [67, 104, 106, 107, 108, 109] :

$$TCS = \left[\frac{\text{Ln}(P_2) - \text{Ln}(P_1)}{(t_2 - t_1)} \right] \times 100$$

Avec P_2 et P_1 poids moyen à t_2 et t_1 .

4.1.5.4 Paramètres bioénergétiques

❖ Gain en poids journalier GPJ

Le gain en poids journalier (gramme poisson/jours), peut être calculé par la relation suivante [110] :

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

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 [110] :

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

❖ Ration quotidienne de maintenance R_{mt}

Elle est donnée par la relation suivante [110] :

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

❖ Contenu calorique C

Il est donné par l'expression suivante [111] :

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

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

❖ Énergie liée à la respiration R

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

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

D'après D. Lemos *et al* [112], 1mg (O_2) 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 D. Lemos *et al* [112], 1mg/l N-NH₃ correspond à une valeur énergétique de 24,87J.

4.1.6 Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses des biomarqueurs

Les dosages biochimiques relatifs aux suivis de biomarqueurs Catalase (enzyme de défense antioxydante) et Protéase (enzyme digestive), ainsi que le dosage des protéines et du glucose nécessitent que les tissus biologiques (foie, branchies et intestin) fassent l'objet préalable d'une homogénéisation et d'un fractionnement subcellulaire (fig 4.4). L'ensemble de ces procédures se déroulent

dans des tampons adaptés. Le tampon dans lequel on homogénéisera devra avoir les propriétés physicochimiques permettant de maintenir la stabilité des molécules ou organites qu'on désire étudier. On devra apporter une attention particulière à sa composition et à son pH surtout.

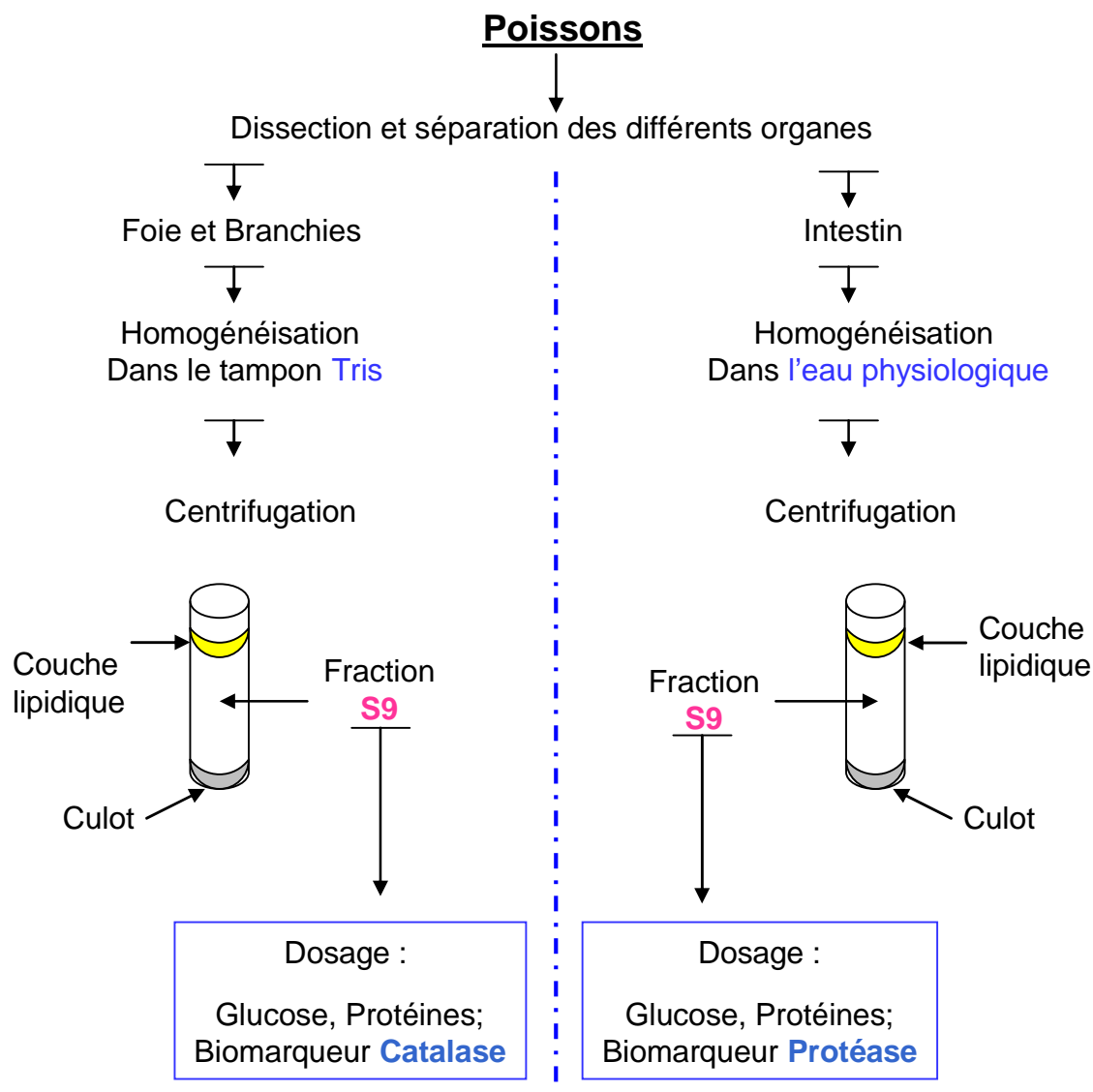


Figure 4.4 : Procédures expérimentales (dosages biochimiques).

❖ Homogénéisation des tissus Foie et Branchies

Les tissus sont homogénéisés à raison de (1/10 P/V) dans le tampon tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane) (20mM ; pH7,8) en utilisant un mixeur déchiqueteur.

La centrifugation de l'homogénat est faite à 10 000g pendant 10min à 10°C. Le surnageant ainsi obtenu (Fraction S9) est utilisé pour doser le glucose, les protéines et comme source d'enzyme pour le dosage de la catalase.

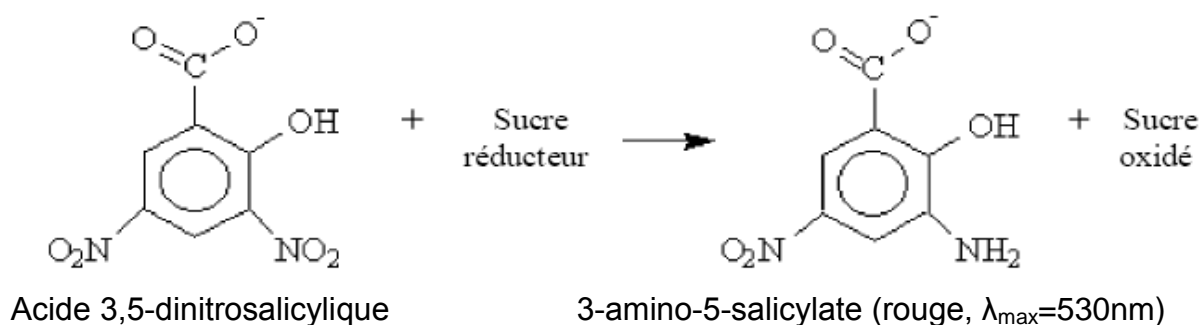
❖ Homogénéisation du tissu intestin

L'intestin est homogénéisé à raison de 40% avec de l'eau physiologique (NaCl à 0.9% P/V). L'homogénat est centrifugé à 10 000g à 10°C pendant 20min. Le surnageant ainsi obtenu (Fraction S9) servira au dosage du glucose, des protéines et de source d'enzyme pour le dosage de la protéase.

4.1.6.1 Dosage du Glucose par la méthode DNS

❖ Principe

Les sucres réducteurs (en raison de leurs groupements carbonyle libres C=O) réagissent avec le DNS (acide di-nitrosalicylique) en le réduisant en acide 3-amino-5-nitrosalicylate selon la réaction suivante :



La préparation du DNS ou réactif dinitrosalicylique est donnée en annexe (C).

❖ Mode opératoire

Après avoir dilué les échantillons de la fraction **S9** pour être dans un intervalle de mesure cohérent avec la gamme étalon, on mélange dans des tubes à essais 03 mL de chaque échantillon et 02 mL de DNS (dans le blanc l'eau distillée remplace **S9**). On homogénéise avant d'incuber les tubes au bain-marie pendant exactement 05 minutes à 100°C. Les tubes sont par la suite refroidis dans un bain d'eau froide et

additionnés de 15 mL d'eau distillée. La densité optique des mélanges réactionnels trempés est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 530 nm. Les différentes concentrations des échantillons sont déterminées à partir de la gamme étalon.

4.1.6.2 Dosages des protéines par la méthode de Lowry [113]

❖ Principe

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des techniques spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines.

La méthode développée par [Lowry et al \[113\]](#) combine une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. Cette méthode a été tellement utilisée que l'article original de Lowry est un des articles scientifiques les plus cités au monde.

❖ Mode opératoire

Dans des tubes à essais, les prises d'échantillons de la fraction **S9** (surnageant) sont diluées au 1/5-1/8-1/10 et complétées à 1 ml. Le tube de blanc contient 01ml d'eau distillée.

05ml de réactif Lowry « voir annexe (C) » sont ajoutés à chaque tube. On homogénéise et on attend 10min.

Par la suite, 0,5ml de réactif *Folin-Ciocalteu* dilué extemporanément au 1/2 est additionné au mélange (il est important d'agiter juste après l'addition de ce dernier). L'ensemble est mis au repos à l'obscurité au moins 30min. Ainsi la lecture de l'absorbance est faite à 660nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) étalon mère à 7,6G%. Les étalons filles sont ainsi obtenus par dilution de la solution mère.

4.1.6.3 Dosages de la Catalase par mode Cinétique (dans le foie et les branchies)

❖ Principe

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzyme active dans une préparation. L'unité d'activité enzymatique (U) est définie en terme de quantité de substrat disparaissant par unité de temps ou de quantité de produit apparaissant par unité de temps.

L'approche cinétique consiste à suivre en continu la quantité du composé voulu. La méthode typique consiste donc à mélanger les réactifs et la préparation enzymatique dans une cuvette de spectrophotomètre puis à suivre la variation temporelle du paramètre mesuré (Absorbance).

Dans notre pratique l'activité catalase est déterminée selon la méthode de Lartillot décrite par [Gülüzar et al \[71\]](#).

❖ Mode opératoire

Dans notre pratique, 2.5ml du substrat (100µl solution de H₂O₂ à 30% ; 2.4ml tampon phosphate 75mM à pH7) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique.

50µl de la fraction **S9** (source d'enzyme) sont ajoutés au mélange, ainsi on déclenche le mode cinétique du spectrophotomètre et on suit la décomposition de peroxyde d'hydrogène dans un intervalle de temps de 60s.

4.1.6.4 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 substrats (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/\[114\]](#).

02ml de la solution de caséine (01% P/V dans le Tris-HCl pH7.2) utilisée comme substrat est incubée avec 02ml de surnageant (source d'enzyme **S9**), préalablement dilué à différentes rations, à une température de 50°C pendant 01heure.

La réaction est stoppée en ajoutant 01ml du TCA à 10% (Acide trichloroacétique). On laisse reposer pendant 15 min et on effectuera une deuxième centrifugation à 6000g pendant 15min. La lecture de l'absorbance est faite à 280nm.

Dans le blanc l'eau physiologique remplace les 02ml du **S9**.

4.1.7 Dosage du cuivre dans le cas de test chronique

Les filtrats des aquariums de contamination récupérés chaque jours ont servi également au dosage du cuivre dissout dans l'eau et cela par une méthode colorimétrique après complexation des ions Cu^{2+} par la dithizone.

Par ailleurs la chaire des poissons enlevés après 21jours, 42jours et à la fin du cycle de décontamination a servi à sa part au dosage du métal accumulé par les individus exposé via l'eau au cuivre.

4.1.7.1 Dosage du cuivre dans l'eau des aquariums [115, 116]

❖ Principe

La méthode consiste à préparer une solution mère de cuivre de concentration 10 mg/l, à partir de laquelle nous préparons par dilution successive une série de solutions filles de concentrations connues. On procède alors à la complexation du cuivre (filtrat des aquariums et solutions filles), par une solution de dithizone dans le

chloroforme. Le complexe ainsi obtenu de couleur violette est soluble dans le double tartrate de sodium et de potassium.

❖ Mode opératoire

On dispose d'une série d'ampoules à décanter de 100 ml, contenant respectivement : 10 ml de solution de cuivre, 20 ml de NaOH (2,5M), 05 ml de solution de tartrate de sodium et de potassium 10% massique (10 g de ce composé sont complétés à 100g avec de l'eau distillée), 20 ml de solution de dithizone (200 mg de dithizone dans 1000 ml de chloroforme).

Après une agitation vigoureuse (en prenant soin d'ouvrir les bouchons de temps en temps pour permettre à la pression de s'équilibrer), le mélange est laissé décanter jusqu'à la séparation des deux phases. La phase aqueuse est recueillie. Celles-ci sont par la suite analysées par spectrophotométrie UV-visible, $\lambda=450\text{nm}$. Cette valeur est obtenue par balayage préalable entre 200 et 800 nm.

4.1.7.2 Dosage du cuivre dans la chaire des poissons [72, 106, 117, 118]

❖ Principe

L'analyse des métaux dans les échantillons biologiques exige quant à elle une étape préalable de mise en solution des matrices solides. Les échantillons biologiques sont généralement minéralisés par digestion acide, les acides forts et l'eau oxygénée assurant, dans des mélanges et en proportions variables, la minéralisation et la mise en solution.

L'attaque acide employée sur nos échantillons a été réalisée à l'aide d'acide nitrique. L'acide nitrique représente en effet l'oxydant de base, utilisé dans pratiquement tous les procédés de décomposition de la matière organique. Il réagit aisément avec les composés aliphatiques et aromatiques, donnant naissance à des réactions d'oxydation, d'estérification et de nitrification. Adaptées à l'analyse de routine, les attaques fortes sont faciles à appliquer mais leur action est souvent incomplète (en raison de la non-dissolution des résidus silicatés). Ceci n'affectant

pas le résultat des analyses menées, ce protocole a donc été jugé comme étant entièrement satisfaisant.

A la suite de l'attaque acide, une seconde étape de minéralisation doit être réalisée, faisant intervenir alors du peroxyde d'hydrogène. L'addition de peroxyde d'hydrogène assure la digestion des derniers résidus.

❖ Mode opératoire

Les échantillons (organismes entiers déchiquetés) sont passés au four à 100°C jusqu'à ce qu'ils atteignent un poids constant puis ils sont réduits en poudre à l'aide d'un mixeur. 0,5g des échantillons en poudre est alors transféré dans les tubes d'un digesteur à micro-onde pour une digestion en deux étapes. Dans un premier temps, 07ml d'acide nitrique est ajouté à l' pour une digestion de 10 minutes à 1000 watts. Ensuite, on ajoute 01ml de peroxyde d'hydrogène pour une digestion de 20 minutes à 1000 watts. Les résidus digérés sont alors dilués avec 50ml d'eau ultra pure, puis filtrés sur papier filtre (Whatmann GF/C). Les échantillons sont par la suite analysés par spectroscopie d'absorption atomique.

4.2 Model Moule *Mytilus galloprovincialis*

Différents travaux de recherche [119, 120] ont démontré que la transplantation des moules de sites non contaminés à des zones polluées représente une bonne stratégie pour la détermination des effets du stress environnemental au niveau des zones côtières et estuariennes. A cet effet, une expérimentation de biosurveillance active a été menée au niveau de la wilaya de Tipaza à travers un mouillage, pendant les mois de juin et juillet 2008, de filets de moules (*Mytilus galloprovincialis*) provenant d'un site non contaminé (Fouka marine) puis transplantés au niveau de trois ports de pêche (port de Khemisti, port de Bouharoune et le port de Gouraya « voir annexe (D) ») dans des structures appelées « stations artificielles de moules ». Les ports sélectionnés pour l'étude de la biosurveillance active sont caractérisés par un fort gradient de pollution urbaine, notamment les ports de Khemisti et de Bouharoun.

4.2.1 Procédure de transplantation

❖ Sites d'échantillonnage

Afin de réaliser notre programme de biosurveillance active, notre campagne d'échantillonnage a ciblé, en premier lieu, la collecte de moules *Mytilus galloprovincialis* au niveau d'un site de référence (Fouka marine), puis leur transplantation dans les trois ports de pêche.

❖ Collecte des moules *Mytilus galloprovincialis*

Les moules proviennent d'une moulière indigène évoluant dans un milieu ouvert. Ainsi, les moules transplantées auront toutes les chances de se trouver dans un milieu plus contaminé que celui de départ.

Les moules, ainsi récoltées, sont transportées dans une glacière étanche et hermétique remplie d'eau de mer du milieu où elles vivaient.

❖ Transplantation des moules

Les moules sont mises dans des filets en plastique de maille 20mm et de dimension 60cm×33cm et réparties en quatre lots de 100 individus dans des poches en laine. Les filets sont rigidifiés par un tube PVC de diamètre 30 mm fendus dans leur largeur et enfilés sur la partie supérieure.

Les stations artificielles ont été transplantées sur trois sites contaminés [Port de Khemisti, Port de Bouharoune et Port de Gouraya] de 08juin à 08juillet, date à laquelle la seconde transplantation d'un site contaminé à un site propre (dans les environs de Gouraya ouest) a été réalisée pour un suivi de décontamination de deux semaines. Le schéma expérimental est décrit dans la figure IV.5 :

❖ Récupérations des moules

Les prélèvements des moules ont été réalisés chaque 10 jours d'immersion. Le taux de mortalité est évalué tout en triant les moules vivantes des moules mortes qui sont écartées des filets.

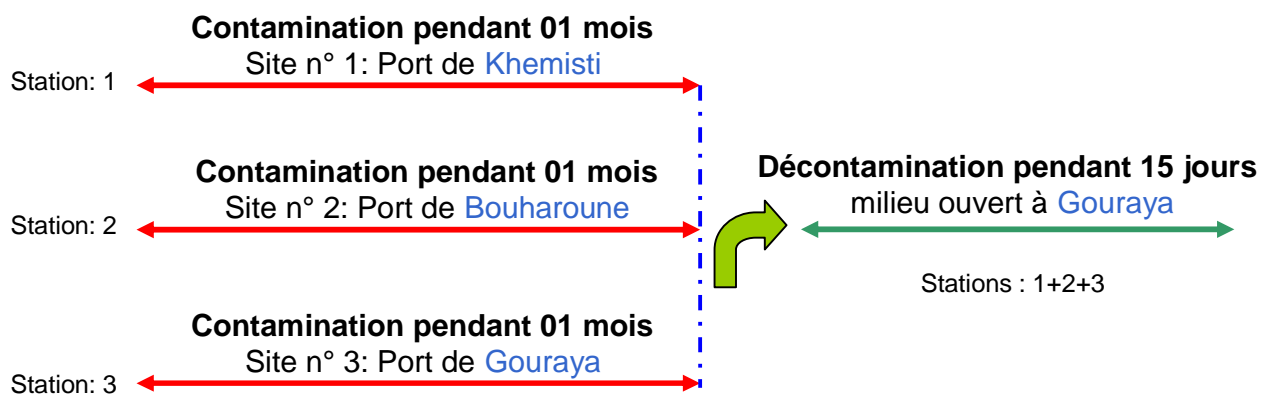


Figure 4.5 : Planning expérimental pour les périodes de contamination, décontamination sur les différents sites d'études.

4.2.2 Campagnes d'échantillonnage et stratégie expérimentale

Les différentes campagnes d'échantillonnage (fréquence de visite, mesures *in situ* et analyses au laboratoire) vers les différents sites sont illustrées dans la figure 4.6 :

4.2.2.1 Suivi temporel des paramètres physicochimiques

❖ Le multiparamètre

Le suivi de la température, conductivité, TDS, salinité, oxygène dissout, potentiel rédox et le pH s'effectuait *in situ* pour chaque campagne au moyen d'un Multiparametre YSI model 556 « voir annexe (C) ».

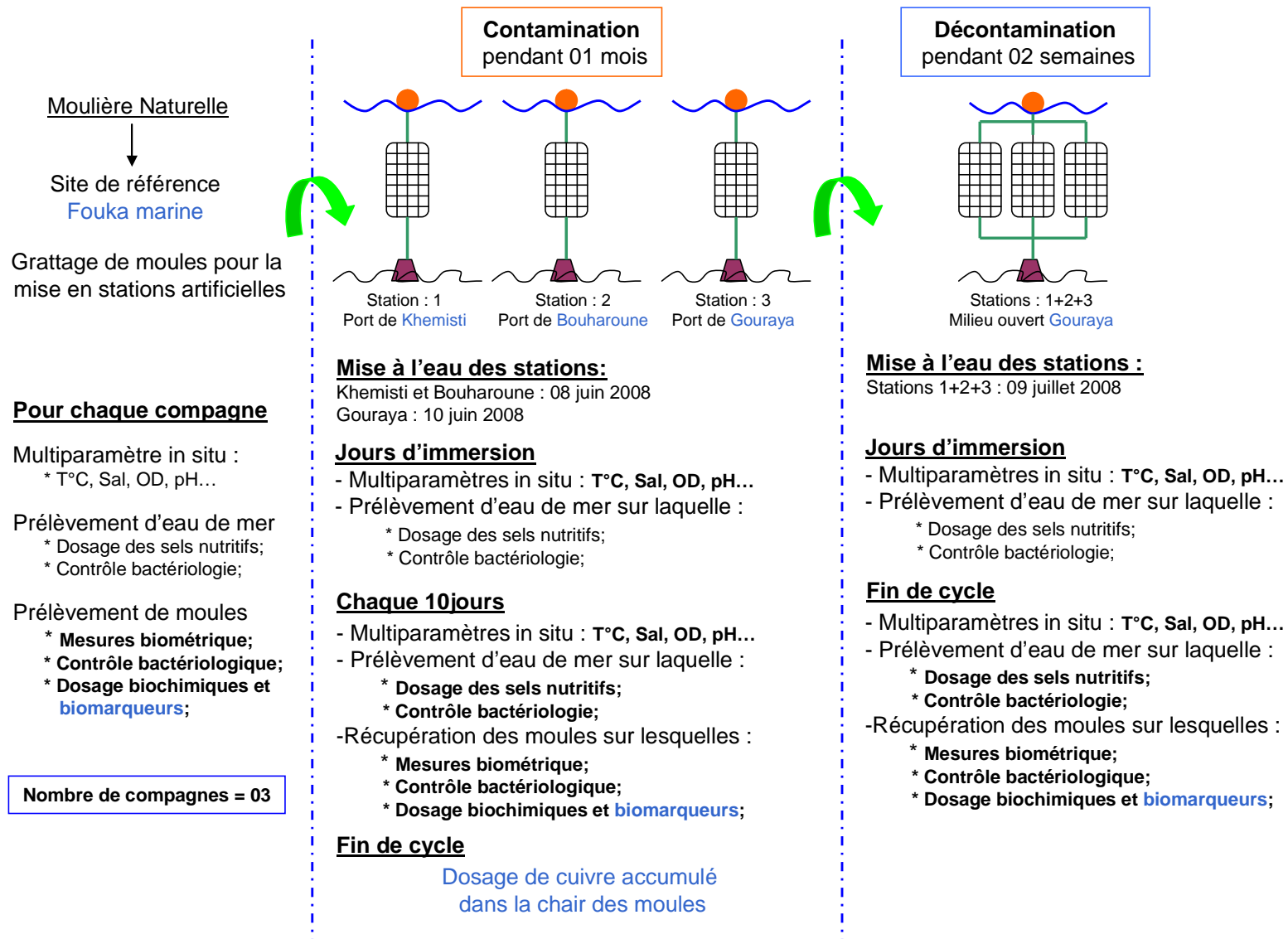


Figure 4.6 : campagnes d'échantillonnage (fréquence de visite, mesures *in situ* et analyses au laboratoire).

4.2.2.2 Prélèvement d'eau de mer

Pour avoir l'échantillonnage le plus représentatif possible, les points de prélèvement d'eau de mer ont été fixés par rapport à leurs positions autour des différents sites de prélèvement (03 prélèvements par site).

Les prélèvements de l'eau de mer ont été réalisés aux niveaux des différents sites sur une profondeur de 0,5 m.

Les échantillons sont recueillis dans des flacons en polyéthylène de 500 ml de volume pour assurer les analyses physico-chimiques (sels nutritifs).

Le choix du flaconnage est important pour l'analyse des éléments nutritifs. Toutefois pour simplifier, on peut être amené à échantillonner l'eau de mer dans un flacon unique en plastique pour l'analyse des sels nutritifs; cette solution étant satisfaisante [102]. On rince le flacon deux à trois fois avec de l'eau à analyser (environ un dixième du volume à chaque fois). Le flacon est ensuite rempli au maximum.

Les échantillons seront placés au froid et à l'abri de la lumière dans une glacière pour être acheminés aux laboratoires et ceci dans les meilleurs délais.

4.2.2.3 Récupération des moules

Les prélèvements des moules (un pochon pour chaque compagnie) ont été réalisés chaque 10 jours d'immersion et à la fin du cycle de décontamination. Les moules, ainsi récoltées, sont transportées dans une glacière étanche et hermétique remplie d'eau de mer du milieu où elles vivaient pour être acheminés aux laboratoires et ceci dans les meilleurs délais. Une fois au laboratoire, les moules sont lavées et brossées, le taux de mortalité est évalué tout en triant les moules vivantes des moules mortes qui sont écartées du lot. Ainsi, les moules vivantes ont servi aux mesures biométriques (longueur, largeur, hauteur, indice de condition) et aux dosages biochimiques (glucose, protéines, biomarqueurs).

4.2.3 Procédures des analyses (traitement au laboratoire)

4.2.3.1 Dosage des sels nutritifs

Le dosage d'éléments nutritifs nitrites, nitrates, Azote ammoniacal et le phosphore peut nous aider à déterminer sur le plan qualité les tendances de la pollution existantes au niveau des sites de transplantation.

Les échantillons d'eau de mer sont tout d'abord filtrés. Au moins 100 ml d'eau de mer sont passés sur le filtre et rejetés avant de recueillir l'échantillon filtré. Le filtrat ainsi récupéré servira au dosage des sels nutritifs dont le principe de dosage et la méthode correspondante sont détaillés au-dessus (même procédure appliquée sur l'eau d'élevage).

4.2.3.2 Mesures biométriques

Une mensuration de la taille (longueur, largeur et hauteur), avec un pied à coulisse donnant une mesure au 1/10ème de millimètre, de 60 à 100 individus en moyenne suivie d'une pesée du poids de la masse viscérale totale à frais sont effectuées pour le calcul de l'indice de condition [08].

$$IC(\%) = \frac{\text{Poids de la masse viscérale + liquide palléal}}{\text{Poids total de la moule}} \times 100$$

4.2.3.3 Dosages biochimiques

La chair de 20 à 30 individus récupérée après dissection a servi aux différents dosages biochimiques à savoir le glucose, les protéines et les biomarqueurs **Catalase et Protéase**.

Les principes de dosage ainsi que les méthodes correspondantes sont décrits au-dessus (même procédure appliquée sur la chair des poissons).

4.2.3.4 Dosage du cuivre dans la chair des moules

A la fin des mesures biométriques, la chair des moules recueillie a été conservée au congélateur à -18°C pour une application ultérieure servant au dosage des métaux traces.

Vu les difficultés rencontrées lors du dosage des éléments traces, on s'est limité au dosage du cuivre accumulé par les moules et cela à la fin du cycle de contamination uniquement.

La méthode appliquée au dosage du cuivre est la spectroscopie d'absorption atomique (four graphite), après minéralisation et mise en solution des différents échantillons par le protocole décrit auparavant (même procédure appliquée sur la chair des poissons).

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSION

MODELE POISSON

5.1 Modèle poisson

5.1.1 Test d'écotoxicité chronique

Cette étude avait pour objectif d'examiner l'effet du cuivre sur la croissance et les activités métaboliques traduisant l'état de santé du poisson « *Tilapia, Oréochromis niloticus* » démontrés par les résultats expérimentaux.

5.1.1.1 Résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques 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 individus 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 microbiologique de l'aliment et de l'eau d'élevage était une étape cruciale.

Les valeurs moyennes de TA(°F), TAC(°F) et TH(°F) de l'eau utilisée dans l'élevage des poissons sont respectivement : 0 ; 23,6 et 15,6. Les valeurs moyennes de %H, %MM, %MO et pH de l'aliment sont respectivement : 8,38 ; 4,78 ; 86,84 et 7,52. 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, des glucides ...

Les résultats de contrôle microbiologique de l'eau d'élevage et de l'aliment sont regroupés dans l'annexe (E).

L'eau destinée à l'élevage des Tilapias, présenta une bonne qualité microbiologique dont les résultats obtenus révèlent l'absence totale d'une contamination fécale pouvant infecter le poisson.

L'objectif du contrôle microbiologique de l'eau d'élevage était de s'assurer que cette dernière ne présentant aucun stress pathogénique pouvant induire une maladie ou un mauvais état de santé des poissons.

Le tilapia « *Oréochromis niloticus* » est un poisson sauvage reconnu par sa résistance aux pathogènes [121,122, 123]. 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 microbiologique, effectué sur l'aliment, 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 microbiologique de l'aliment, on en conclut que ce dernier ne présente pas un risque d'altération de l'état de santé des individus.

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 de l'eau des aquariums, à raison de deux fois par semaine, 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.

Comme conclusion des tests microbiologiques, les stress pouvant exercer un pathogène ne sont pas probables à exister, l'unique stress altérant les tilapias est bien l'agent polluant métallique.

5.1.1.2 Paramètres physicochimiques (eau d'élevage)

Les résultats expérimentaux relevés quotidiennement sont illustrés par les figures (fig 5.1, 5.2, 5.3, 5.4), ci-dessous. Le tableau récapitulatif des valeurs moyennes est donné en annexe (E).

Plusieurs travaux réalisés récemment ont étudié l'effet de la température et le pH sur la croissance, l'activité métabolique, l'accumulation des polluants et les réponses des biomarqueurs chez le tilapia « *Oréochromis niloticus* ».

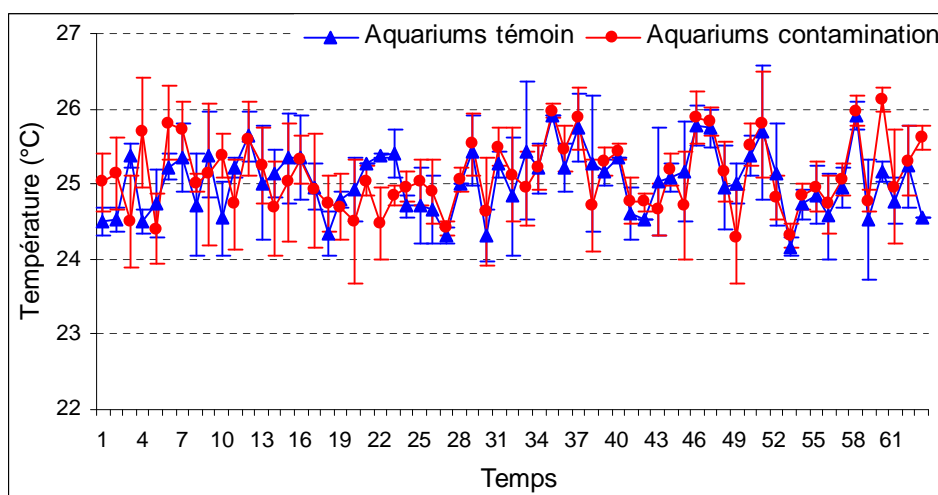


Figure 5.1 : Evolution de la température durant la journée et pendant tout le cycle expérimental.

D'après la figure (5.1), traduisant l'évolution de la température durant la journée et pendant tout le cycle expérimental, on constate que la variation des températures est presque identique pour les deux groupes de test.

D'après le modèle de [Martina Bocci \[124\]](#), 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 [\[56, 71, 78, 114, 125\]](#). 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.

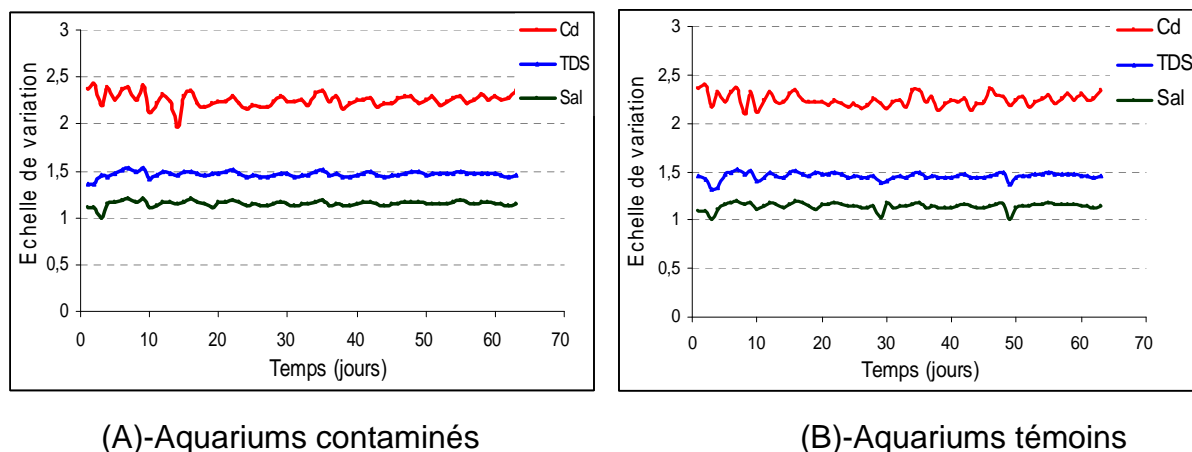


Figure 5.2: Evolution de la conductivité (Cond), TDS et la salinité (Sal) durant la journée et pendant tout le cycle expérimental.

Le poisson tilapia est reconnu par sa résistance à des fortes salinités [\[84\]](#). Les valeurs moyennes de salinités mesurées ($1,1 \pm 0,01\%$) (fig 5.2) sont faibles

identiques et constants dans le temps pour les deux groupes de test, ce qui ne présente aucun effet stressant affectant les poissons.

Les TDS sont fonction de plusieurs paramètres (T°C, pH, ions, sal...). Dans notre étude les valeurs enregistrées (fig 5.2) dans les deux groupes d'individus sont identiques dont la moyenne est de $1,3 \pm 0,02 \text{g/l}$.

Concernant la conductivité (fig 5.2), l'introduction du polluants dans les aquariums de contamination n'a augmenté cette dernière que de très peu (0.9%) par rapport aux aquariums témoins.

L'évolution journalière des valeurs du pH mesurés (fig 5.3) reste toujours dans l'intervalle de tolérance des spécimens entre 7,4 et 7,8 (l'optimum de pH se situ entre 6.5 et 8.5) durant tout le cycle expérimental. Ainsi le pH de l'eau d'élevage ne présentant aucun effet stressant pouvant perturber l'état de santé des individus.

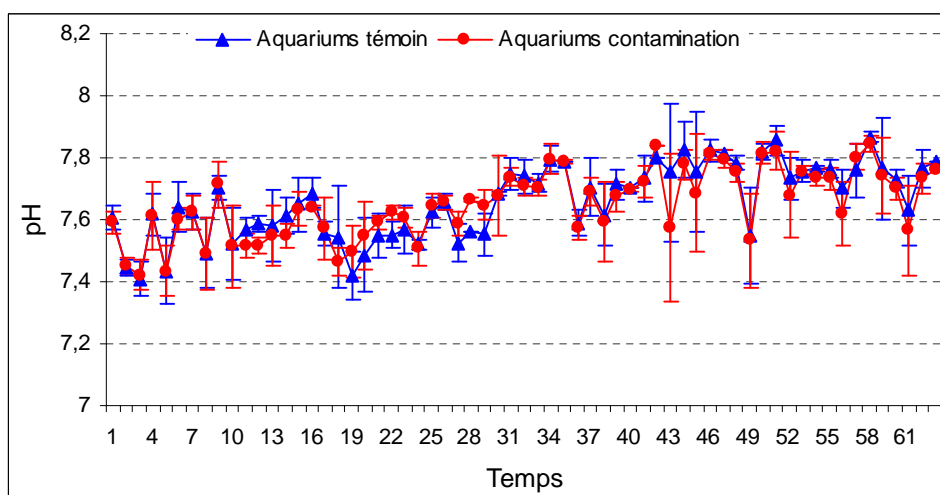


Figure 5.3 : Evolution du pH durant la journée et pendant tout le cycle expérimental.

Cependant, on constate d'après la figure (5.3) une légère augmentation du pH après les 30 jours d'incubation par rapport aux valeurs initialement mesurées. Cette augmentation peut être expliquée probablement par la diminution de la charge (exprimée en gramme de poisson/litre), un prélèvement des individus est procédé au 21^{ème} jours. Par ailleurs, l'augmentation de l'oxygène dissout pourra conduire a diminution de la solubilité du gaz carbonique (CO_2 , issus de l'activité métabolique surtout).

Du point de vue concentration en oxygène dissous, le tilapia *nilotica* exige une concentration de 4 à 5 mg/l. Les valeurs journalières de l'oxygène dissout mesurées (fig 5.4) durant le cycle expérimental (entre 4 et 6mg/l) répondaient aux exigences des spécimens.

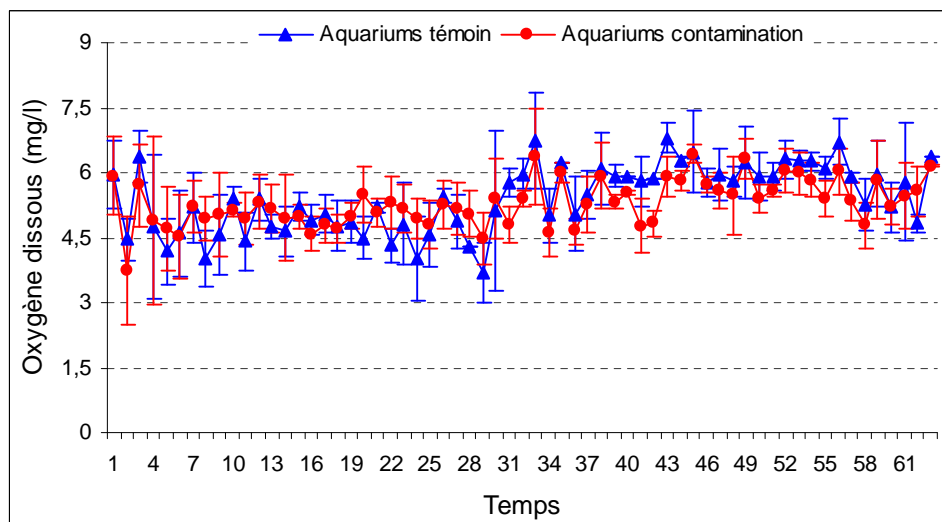


Figure 5.4 : Evolution de l'oxygène dissous durant la journée et pendant tout le cycle expérimental.

Cependant et durant le cycle de contamination (0 à 42 jours) la mesure de la différence entre le taux d'oxygène dissous avant et après chaque repas chez les deux groupes de tests a mis en évidence une nette différence. L'écart mesuré chez les spécimens témoins (2,13mg/l) était toujours supérieur à celui enregistré chez les individus exposés au polluant (1,95mg/l).

Le long du cycle de contamination et juste après un apport d'aliment les poissons témoins viennent rapidement s'alimenter et l'ingestion sera complète en quelques minutes ce qui traduit la forte consommation d'oxygène comparativement aux individus soumis au polluant dont l'activité dynamique est faible et l'ingestion de l'aliment est incomplète (la consommation de l'oxygène est proportionnelle à l'ingéré).

Tout être vivant peut être considéré comme un système énergétique ouvert, c'est-à-dire qu'il échange de la matière et de l'énergie avec son environnement. Au

cours de processus biochimiques propres à chaque espèce, l'énergie absorbée est progressivement transformée en énergie utile qui est dissipée sous forme de chaleur ou de travail chimique, osmotique et mécanique. Au sens large, la respiration est l'ensemble des mécanismes physico-chimiques et biochimiques qui fournissent à l'être vivant l'énergie nécessaire à son métabolisme. De manière classique, on distingue la fraction de l'énergie totale allouée à la croissance somatique et au métabolisme général, de celle allouée à la croissance gonadique et à la reproduction [86].

L'environnement, à travers ses effets sur la physiologie notamment, fixe les conditions et les limites des processus énergétiques [126]. Dans certaines conditions environnementales stressantes, l'approvisionnement maximal de tous les organes ne peut être assuré. Conséquences : mauvaise croissance, mauvais état de santé [02, 08] ce qui est le cas dans notre étude où on a enregistré un retard de croissance avec une diminution de la condition chez les poissons contaminés. (Voir ci-après)

Par ailleurs et durant le cycle de décontamination, les spécimens antérieurement exposés au polluant métallique ont montré une bonne activité dynamique traduite par une consommation de l'aliment et de l'oxygène de façon identique à celle des individus témoins, ce qui traduit la curabilité de l'état de santé des poissons contaminés précédemment (les effets sont donc réversibles).

5.1.1.3 Etude de l'effet des polluants sur l'excrétion Azotée

Les résultats obtenus sont graphiquement indiqués dans la figure 5.5.

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... entrent en ligne de compte mais aucune donnée bibliographique n'y a trait [85, 91].

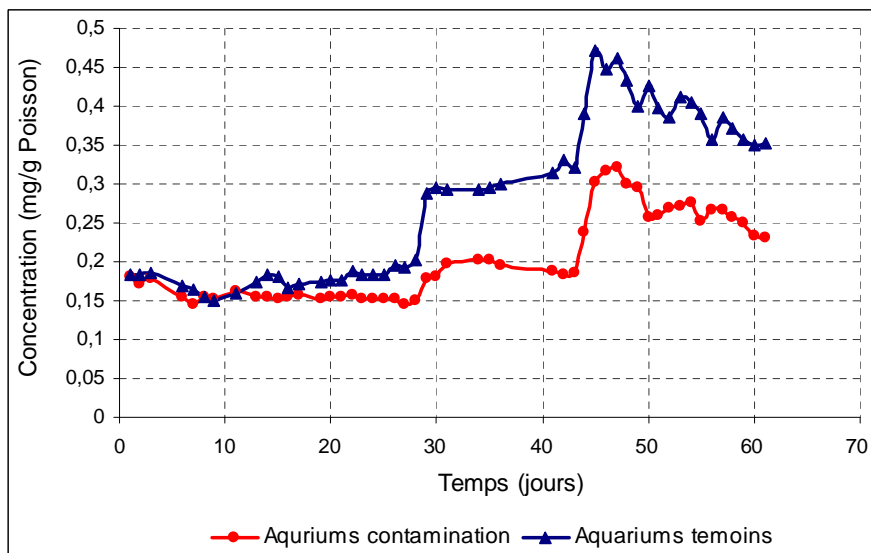


Figure 5.5 : Evolution de l'excrétion azotée durant le cycle expérimental

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 où la concentration atteint ces valeurs maximales (1,2 à 1,4mg/l), par la suite une diminution d'excrétion est observée. Entre 0.6 et 0,2mg/l les composés azotés deviennent toxiques au tilapia pour des courtes durées d'exposition [108] 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 (1,25mg/l) proches de celles enregistrées chez les spécimens témoins.

Par ailleurs, l'étude de l'effet du cuivre à une concentration de 0,1mg/l sur les excrétions des tilapias (fig 5.5) n'est apparu pratiquement qu'après la 2^{ème} semaine d'incubation où on mesura une légère différence des taux d'excrétions jusqu'au 21^{ème} jour d'exposition au polluant. A cette date, un 1^{er} prélèvement de 8 individus de chaque groupe de test est réalisé ce qui conduisit à une diminution de la charge totale (exprimée en gramme de poissons / litre d'eau) dans les aquariums d'élevage.

Ainsi, après la 3^{ème} semaine les individus témoins ont montré des taux d'excrétion nettement supérieurs à ceux mesurés chez les spécimens exposés au polluant métallique (Cu²⁺).

Suite au 2^{ème} prélèvement des poissons effectué à la fin du cycle de contamination (42 jours), une augmentation des taux d'excrétions azotées est enregistrée également chez les deux groupes de test. Par ailleurs, après 72h du début du cycle de décontamination, les poissons antérieurement contaminés ont montré une augmentation importante des taux d'excrétion par rapports à ceux mesurés durant le cycle de contamination. Cependant, les taux mesurés chez le groupe témoin sont toujours supérieurs. Du point de vue réversibilité des effets, il est probable que les spécimens décontaminés ont repris progressivement leur état de santé.

Il est à noter qu'après la 1^{ère} semaine du cycle de décontamination, une diminution remarquable des taux d'excrétion est enregistrée chez les deux groupes de test.

5.1.1.4 Etude de l'effet du polluant sur les paramètres bioénergétiques

Les différents résultats sont regroupés dans les tableaux (5.1) et (5.2) ci-dessous.

Tableau 5.1 : Valeurs moyennes des paramètres bioénergétiques GPJ, R_{mx} et R_{mt}

Temps (jours)		1	8	25	39	46	54	60	67	75
GPJ	Témoins	0,420	0,435	0,493	0,505	0,545	0,566	0,595	0,628	0,683
	Contaminés	0,421	0,435	0,473	0,505	0,510	0,534	0,536	0,565	0,582
R _{mx}	Témoins	1,577	1,653	1,946	2,008	2,219	2,330	2,486	2,663	2,974
	Contaminés	1,587	1,655	1,844	2,007	2,036	2,160	2,171	2,323	2,417
R _{mt}	Témoins	0,198	0,206	0,235	0,241	0,262	0,273	0,288	0,305	0,334
	Contaminés	0,199	0,206	0,225	0,241	0,244	0,256	0,257	0,272	0,281

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 au métabolisme énergétique et à la bioénergétique [02, 08, 127]. 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 deux 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 métallique (Cu^{2+}). Ces derniers ont montré de faibles gains en poids et cela jusqu'à la fin du cycle expérimental entier.

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 5.1) dont les valeurs mesurées pendant le 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 [08]. Selon Hansen *et al* [128] l'inhibition de la croissance est principalement due à la réduction de la conversion de l'énergie alimentaire en biomasse.

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 la reproduction [02, 03, 05, 08, 129]. L'analyse énergétique peut révéler un déséquilibre de cette balance associée à l'exposition à des toxiques [08]. En effet, 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 5.1) 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

autre besoins énergétiques le plus souvent ceux alloués à la croissance puis ceux alloués à la reproduction [02, 08]. 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 [65, 66, 78, 127, 130] confirment encore l'augmentation des taux métaboliques dans des organismes exposés à des stress chimiques variés générant les différents biomarqueurs de défenses.

Par ailleurs, le calcul des rapports des différentes formes d'énergie exprimées par le contenu calorifique de l'individu (C), l'énergie liée à la respiration (R) et l'énergie liée à l'excrétion (U) (Tab 5.2) mit en évidence un déficit chez les individus exposés au xénobiotique (Cu^{2+}).

Tableau 5.2 : Valeurs moyennes des rapports des différentes formes d'énergie : Contenu calorifique(C), Energie liée à la respiration(R) et Energie liée à l'excrétion (U)

Temps	1	8	25	39	46	54	60	67	75
$C_{\text{contaminés}}/C_{\text{témoins}}$	1,003	1,000	0,967	0,999	0,948	0,954	0,920	0,919	0,880
$R_{\text{contaminés}}/R_{\text{témoins}}$	1,006	1,001	0,942	0,999	0,909	0,920	0,862	0,861	0,796
$U_{\text{contaminés}}/U_{\text{témoins}}$	–	–	0,687	0,835	0,777	0,665	0,768	0,778	–

En général, une tendance identique des valeurs mesurées chez les deux groupes de test est observée pendant la période d'adaptation. Etant donné que les deux groupes de test sont soumis aux mêmes conditions expérimentales, les différentes mesures à savoir le GPJ, R_{mx} , R_{mt} et les rapports énergétiques relevées le long du cycle de contamination seraient donc le résultat direct de l'effet du polluant métallique 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 détoxification resta probablement insuffisante pour que les poissons puissent reprendre leur état d'équilibre énergétique.

Selon [Amiard et al \[08\]](#), 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. Quelque 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 [\[02, 08, 127\]](#). Une connaissance approfondie des modèles biologiques employés est donc prérequis.

De fait, ces facteurs constituent les 1^{ers} 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.

5.1.1.5 Etude 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 [\[08, 09, 67, 103\]](#). 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 [\[104, 105, 106, 107, 109, 127\]](#).

L'étude de la croissance des organismes tests, révèle une nette différence entre les tilapias témoins et les tilapias exposées au cuivre (fig 5.6). Ces différences de croissance dans un groupe de poissons ayant un même poids initial peuvent s'expliquer par le comportement face à l'aliment et/ou la génétique [131] et au stress du à l'exposition au polluant.

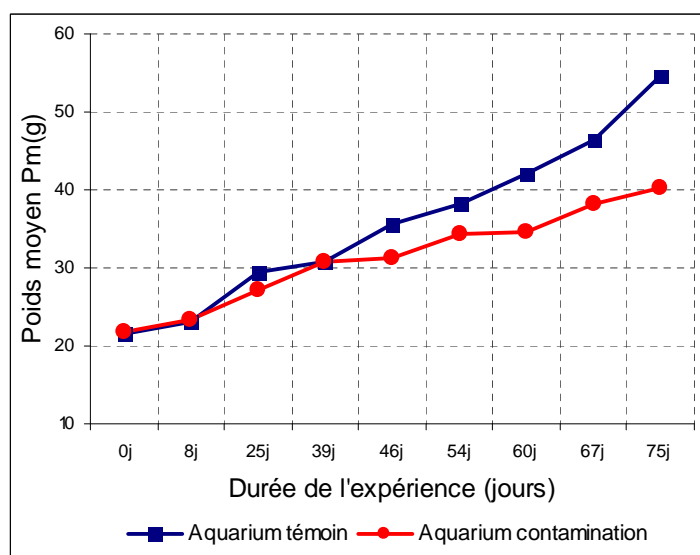


Figure 5.6 : Evolution des poids moyens (Pm) des tilapias durant la période d'étude

De plus l'influence du cuivre est significative au regard de la diminution du taux de croissance spécifique (TCS) (fig 5.7).

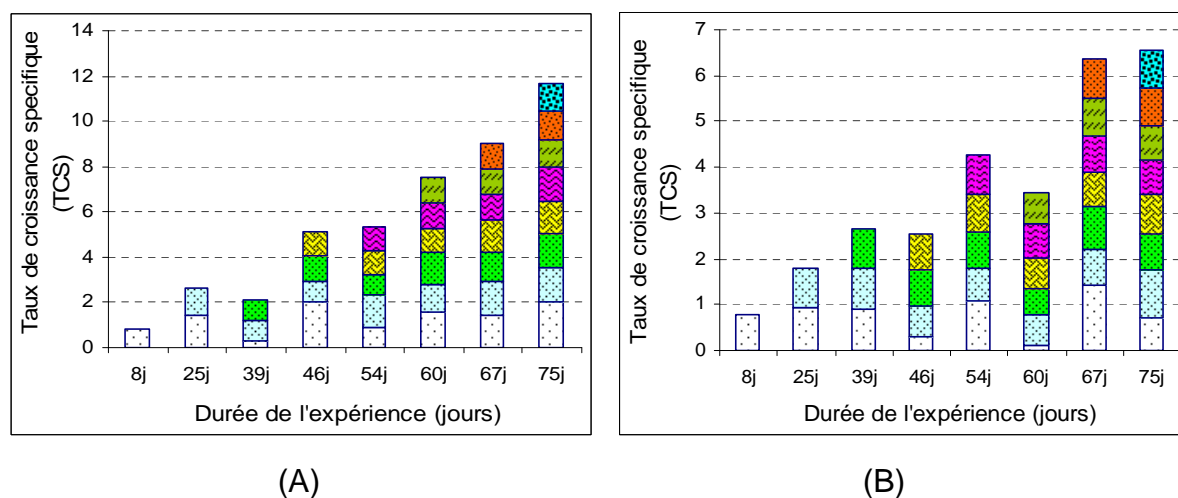


Figure 5.7 : Variation du taux de croissance spécifique (TCS) durant la période d'étude (A : poissons témoins ; B : poissons contaminés)

En effet une diminution de la condition peut être due au déséquilibre de la balance énergétique associée à l'exposition au xénobiotique Cu^{2+} , 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, \[08\]](#), 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 énergétique liée à la mise en place de mécanismes de compensation physiologique [\[02\]](#). 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 [\[65, 78, 132, 133\]](#). [Benjamin et Al \[106\]](#), ont constaté aussi des retards de croissance chez des tilapias exposés au cuivre *via* la nourriture. De même, [Ann Houck et al \[109\]](#), ont mesuré des TCS très faibles chez des espèces *Orthodon microlepidotus* exposées au méthylmercure (MeHg) comparativement aux spécimens maintenus comme témoins. De par ailleurs [Marchand et Al \[134\]](#), 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 (5.8) représente les courbes allométriques (relation tailles-poids) des tilapias étudiés.

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 $P_m = a \cdot L_m^b$ [\[135, 136\]](#). 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 témoins. Le cas où b est supérieure à 3 implique que la variation en longueur est très faible contre le poids des individus conduisant à un retard de croissance des organismes,

ce qui est révélé chez les poissons exposés au xénobiotique Cu^{2+} dans notre expérimentation.

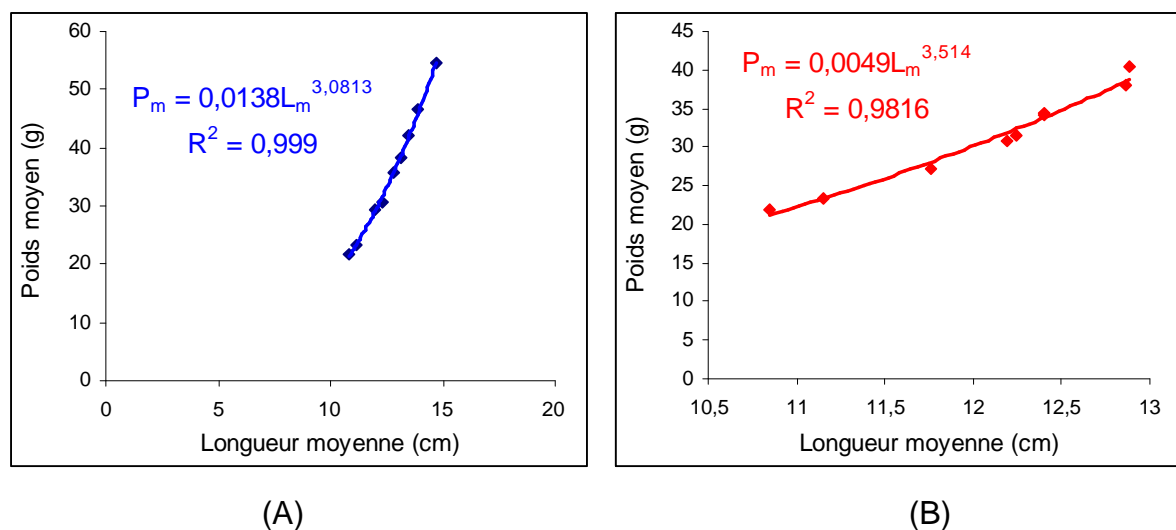


Figure 5.8 : Relation taille (L) - Poids (P) des tilapias :
(A) : groupe témoins, (B) : groupe contaminés.

Il faut noter toutefois que les facteurs de condition (ex TCS...) ne se justifient que si dans la relation décrite ci-dessus, b est voisin de 3 [103] (Kosmala), ce qui est le cas dans notre étude.

La figure (5.9) montre l'effet du cuivre sur les rapports somatiques RHS et RGS.

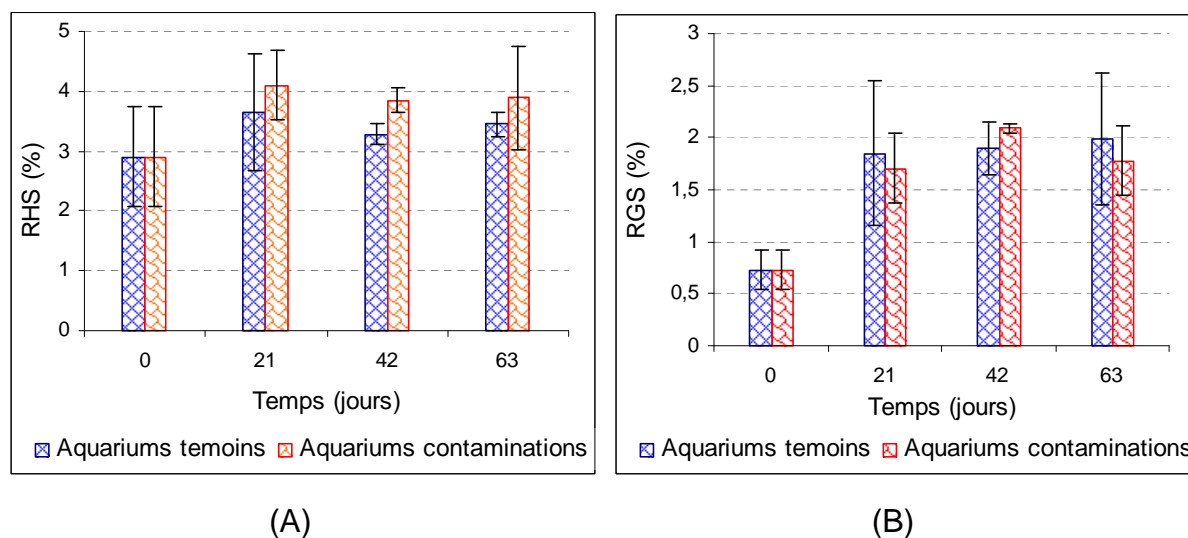


Figure 5.9 : Etude de l'effet du cuivre sur les rapports somatiques
(A) : Rapport hépatosomatique, (B) : Rapport gonadosomatique)

Le Rapport hépathosomatique est souvent corrélé avec le degré de pollution. Tant que les poissons sont capables de s'alimenter, cet indice augmente en même temps que l'activité des systèmes de détoxification [77, 127]. Dans notre étude les valeurs du RHS mesurées chez les spécimens contaminés sont significativement supérieures à celles mesurées chez les individus témoins.

Kosmala [103] dans son étude a constaté les mêmes observations sur des chevaines (poisson d'eau douce) issus de zones polluées. Certains auteurs cités par Kosmala [103] et Figueiredo *et al* [77], ont noté également une augmentation de la taille du foie des poissons exposés aux différents polluants. Selon Sloof *et al* (1983) [137], Figueiredo *et al* [77], l'augmentation du foie des poissons pourrait être associée à la stimulation d'activités enzymatiques hépatiques. Ainsi le rapport RHS peut rendre compte d'un stress apporté par des micropolluants, le foie étant l'organe majoritairement impliqué dans la détoxification des xenobiotiques [77, 78, 103, 127]. Son utilisation est ainsi intéressante en accompagnement de la mesure des activités enzymatiques (ex CAT).

En général l'étude du rapport gonadosomatique montre une diminution plus ou moins significative chez les poissons contaminés, sauf au 42^{ème} jours où on mesurait une augmentation du RGS. Pieterse [09] dans son étude observa une diminution du RGS de *Oreochromis mossambicus*, exposé au cuivre par rapport aux individus témoins.

Comme mentionné au-dessus, un déséquilibre de la balance énergétique suite à l'exposition des poissons à la pollution peut conduire à une atteinte du statut reproducteur des organismes.

Jessica *et al* [105], 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.

Les paramètres biométriques (TCS,RHS,RGS...) 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 [77, 103, 127].

5.1.1.5 Modélisation des effets fondés sur l'atteinte de l'énergie

Dans le cadre de modèles d'effet à fondement énergétique, il s'agit d'abord, pour obtenir une certaine pertinence toxicologique, de s'intéresser aux relations entre l'accumulation d'un composé et ses effets. Généralement on utilise un modèle toxicocinétique simple, dit modèle linéaire à un compartiment, réaliste du point de vue biologique [05, 08, 129].

$$\frac{dC_i}{dt} = k_{abs} \cdot C_{e(t)} - k_{el} \cdot C_{i(t)}$$

Où C_i est la concentration interne du composé, C_e sa concentration en solution, k_{abs} et k_{el} respectivement, taux d'absorption et d'élimination par l'organisme.

Les modèles à fondement énergétique supposent l'existence d'une concentration seuil sans effet (CSE). Une fois l'organisme incapable de supporter la quantité de toxique accumulé, il y a proportionnalité entre l'effet observé et l'excès de toxique, et nous appellerons taux de toxicité le facteur de proportionnalité k_i entre effet et dépassement du seuil : Effet = $k_i (C_i - CSE)$ [08].

L'effet est une perturbation des paramètres de la gestion de l'énergie par les organismes, représentée par la théorie DEB (*Dynamic energy budget*) [05, 08, 129]. Cette théorie cherche à représenter mathématiquement l'utilisation de l'énergie provenant de l'assimilation de nourriture entre quatre grandes fonctions physiologiques : survie, maintenance, croissance et reproduction. Le mode d'action physiologique du toxique correspond au paramètre affecté (ex sur la croissance) [08].

Selon Ducrot [129], le modèle du retard de croissance basé sur l'atteinte de l'énergie peut être décrit comme suit :

$$\frac{dl}{dt} = \gamma = \frac{f \cdot B}{3i \cdot \alpha} \quad (01)$$

avec :

- γ taux de croissance journalier ;
- f la vitesse d'assimilation de la nourriture ;
- B la fraction assimilable de la nourriture ;
- i la constante d'isomorphie ;
- α le coût énergétique de fabrication d'une unité de biomasse.

Les paramètres f ou α sont affectés de façon proportionnelle à la différence entre la concentration interne $C_{i(t)}$ et la concentration interne sans effet pour la croissance (CSE_c), une fois que ce seuil est dépassé :

$$\alpha_{ce} = \alpha_0 [1 + b(C_{i(t)} - CSE_c)] \quad (02)$$

$$f_{ce} = f_0 [1 - b(C_{i(t)} - CSE_c)] \quad (03)$$

- α_{ce} et f_{ce} le coût énergétique de croissance et la vitesse d'assimilation de la nourriture pour une concentration externe en toxique C_e ;
- α_0 et f_0 le coût énergétique de la croissance et la vitesse d'assimilation de la nourriture chez les témoins ;
- b est le taux de toxicité de la substance testée.

A partir des équations (01) et (02), il propose un modèle d'augmentation des coûts de croissance en présence de toxique :

$$\frac{dl}{dt} = \frac{f_o \cdot B}{3i \cdot \alpha_o \cdot [1 + b \cdot (C_{i(t)} - CSE_c)]} \quad (04)$$

L'équation (04) se simplifie de l'équation (1) :

$$\frac{dl}{dt} = \frac{\gamma_o}{1 + b \cdot (C_{i(t)} - CSE_c)} \quad (05)$$

Avec γ_o le taux de croissance journalier chez les témoins.

A partir des équations (03) et (01), il propose un model de diminution de l'assimilation en présence de toxique :

$$\frac{dl}{dt} = \frac{B.f_0.[1 - b.(C_{i(t)} - CSE_c)]}{3i.\alpha_0} \quad (06)$$

L'équation se simplifie alors de l'équation (1) :

$$\frac{dl}{dt} = \gamma_0.[1 - b.(C_{i(t)} - CSE_c)] \quad (07)$$

5.1.1.6 Résultats des dosages biochimiques

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau (5.3).

Tableau 5.3 : Valeurs moyennes des taux du glucose et des protéines dans le foie et les branchies des poissons tilapias

			Temps (jours)			
Organes	Eléments	Groupes	0j	21j	42j	63j
Foie	Glucose	témoins	23,90 ± 01,73	16,44 ± 03,53	17,56 ± 04,25	07,96 ± 01,26
		contaminés	23,90 ± 01,73	23,04 ± 06,06	15,97 ± 06,60	13,52 ± 03,13
	Protéines	témoins	95,91 ± 22,79	112,41 ± 19,53	114,17 ± 22,59	101,53 ± 17,87
		contaminés	95,91 ± 22,79	72,87 ± 06,80	107,62 ± 19,62	95,88 ± 17,73
Branchies	Glucose	témoins	04,26 ± 00,80	07,22 ± 02,06	08,35 ± 0,94	12,69 ± 01,86
		contaminés	04,26 ± 00,80	02,97 ± 01,41	09,37 ± 1,02	06,18 ± 01,19
	Protéines	témoins	73,08 ± 14,21	99,63 ± 13,47	107,78 ± 16,76	113,48 ± 31,99
		contaminés	73,08 ± 14,21	79,52 ± 10,44	86,99 ± 8,57	127,23 ± 00,37

De nombreux stress (physiques et/ou chimiques) peuvent entraîner la mobilisation des réserves énergétiques (glycogène, lipides, protéines) [08, 127]. D'une manière générale, la réponse est vers une diminution des réserves énergétiques suite à l'exposition en laboratoire où *in situ* à différents types de contaminants. Cette réponse est mesurable après quelque heures ou jours d'exposition. Cependant, la mobilisation de l'un ou l'autre des constituants de réserves est fonction du type de contaminant [08].

La comparaison des concentrations du glucose (Tab 5.3) entre les deux groupes de test ne semble pas significative ni dans le foie ni dans les branchies. Cependant, la tendance de la comparaison est une diminution des réserves en protéines chez les spécimens exposés au xénobiotique (Cu^{2+}) et cela dans le foie et les branchies.

[Almeida et al \[65\]](#), dans leur étude d'effet du cadmium (0,35 ; 0,75; 1,5 et 3mg/l) sur le poisson tilapia, n'observèrent aucune différence entre les individus témoins et ceux exposés aux polluant aux différentes concentrations. En parallèle ils constatèrent que les concentrations 0,35 et 3 mg/l conduisirent à une augmentation des teneurs du glucose au niveau du foie des poissons alors que les concentrations de 0,75 et 1,5 ne présentèrent aucun effet sur les spécimens contaminés. Le même auteur dans une autre étude [\[130\]](#) de l'effet du cadmium toujours sur le poisson tilapia, n'observât aucune différence significative des réserves en protéines entre les groupes témoins et contaminés.

Outre les variations liées à l'exposition à des toxiques, la variabilité des concentrations en réserves énergétiques des organismes est fonction de nombreux facteurs biotiques et abiotiques [\[02, 08, 127\]](#). Il n'est donc pas étonnant que l'utilisation des réserves énergétiques en tant que biomarqueur strict de pollution soit toujours discutée [\[08\]](#).

5.1.1.7 Résultats du dosage de la catalase

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) aux niveaux du foie et des branchies des poissons tilapias sont respectivement représentés dans les figures (5.10) et (5.11).

En général, une augmentation de l'activité CAT est observée chez les individus exposés au cuivre (Cu^{2+}). Comparativement aux individus témoins, ces derniers n'ont montré aucun changement significatif de leur activité CAT et cela le long du cycle expérimental. (fig 5.10, 5.11). Par ailleurs, une corrélation positive est

faite entre la concentration du polluant accumulé par les poisson (Tab 5.4) et le niveau d'induction de l'activité enzymatique CAT.

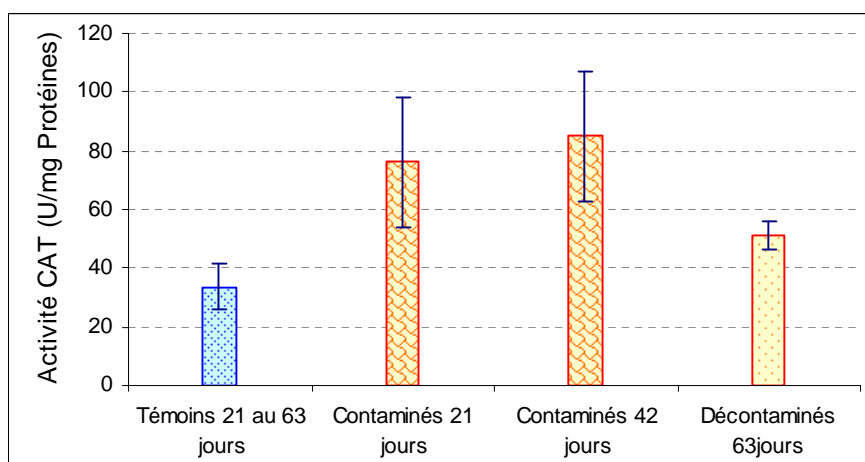


Figure 5.10 : Etude de l'effet du cuivre sur l'activité de la catalase dans le foie des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*.

L'étude de l'activité CAT, dans le foie des poissons (fig 5.10), montre que cette dernière est accélérée par le xénobiotique (Cu^{2+}) présent dans le milieu, et cela en fonction du temps d'exposition et de la concentration bioaccumulée du polluant (Tab5.4). Ainsi les activités mesurées aux 21^{eme} et 42^{eme} jours atteignirent ($76,18 \pm 22,09 \text{ U/mg Prot}$) et ($84,92 \pm 22,46 \text{ U/mg Prot}$) respectivement.

Tbleau 5.4 : Concentration du cuivre accumulé par les spécimens *O. niloticus*.

Temps (jours)	21j	42j	63j
[Cu] bioaccumulée ($\mu\text{g/g}$)	3,781388	4,116084	3,235568

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 xénobioiques [08, 77, 127, 138]. De plus les polluants chimiques sont d'importants producteurs de ROS [71, 77, 78]. 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 [71, 78, 139]. La catalase CAT (enzyme

antioxydante) est une hémoprotéine présente au niveau des peroxysomes qui participent à la défense contre les dérivés de l'oxygène.

La CAT catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau selon ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) [08, 70, 71, 77, 78,]. Donc l'induction de l'activité CAT est le signe de l'exposition des poissons au stress oxydatif causé par le cuivre Cu^{2+}

Chez le tilapia *Oreochromis niloticus*, Guluzar *et al* [78], dans leur étude, observèrent une stimulation de l'activité CAT sous l'effet du cadmium (Cd^{2+}) à différentes concentrations. Par ailleurs, Peixoto *et al* [138], constatèrent également une augmentation de l'induction de la catalase en fonction du temps et sous l'effet du polluant oxyfluorfen. Ainsi, l'intérêt majeur de la catalase en tant que biomarqueur réside dans le caractère aspécifique de sa réponse, ce qui constitue un avantage dans le contexte de la contamination multiple des écosystèmes aquatiques [02, 127].

Une baisse d'induction de l'activité CAT est mesurée à la fin du cycle de décontamination (fig 5.10), l'activité relevée est 51,16 U/mg Prot, ce qui traduit la curabilité de l'état de santé des poissons et la réversibilité du mécanisme physiologique dont on mesura également une diminution de la bioaccumulation (Tab 5.4) suite à l'action des différents processus d'excrétion et de décontamination des polluants. Selon plusieurs auteurs, les biomarqueurs de défense comme la CAT contribuent au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Cette dernière dépend de la relation dose, durée/effet [02, 71, 76, 78].

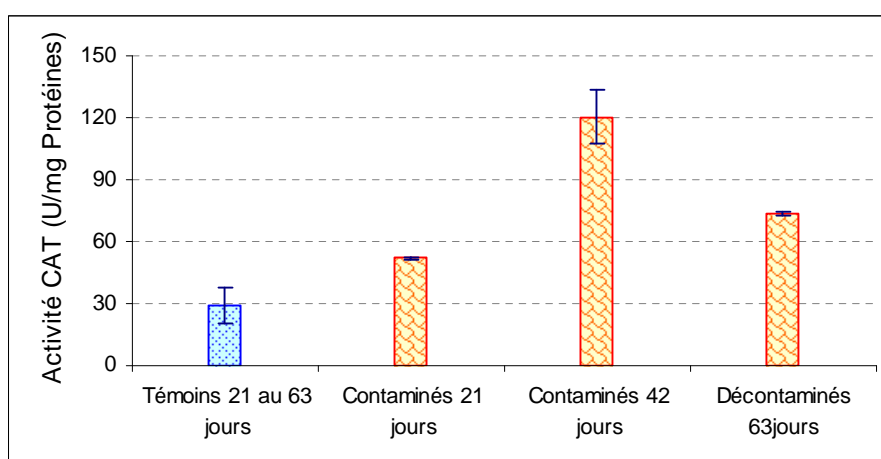


Figure 5.11 : Etude de l'effet du cuivre sur l'activité de la catalase dans les branchies des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*.

La plus importante induction de l'activité CAT ($120,33 \pm 12,92$ U/mg Protéines) est mesurée au niveau des branchies des poissons contaminés (fig 5.11) après 42 jours d'exposition.

[Guluzar et al \[71\]](#), dans leur études de l'effet des métaux traces Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} sur l'activité CAT au niveau des branchies des tilapias ont relevé également de fortes inductions de l'enzyme antioxydante sous l'effet du cuivre a 0,5 ;01 et 1,5mg/l.

Les branchies des poissons sont considérées comme des organes critiques lors d'exposition au cuivre. En effet elles constituent la plus grande partie de la surface de contact totale des poissons et sont, ainsi, le lieu principal d'échange d'eau et d'ions entre le sang et l'environnement [\[71, 74, 140\]](#). La fixation du cuivre (Cu^{2+}) présent dans les eaux au niveau des branchies des organismes aquatiques est la cause de dysfonctionnement des fonctions métaboliques, respiratoires et ionorégulatrices [\[44, 72, 74\]](#). Le cuivre est de plus connu pour provoquer de graves dommages au niveau de la structure lamellaire des branchies. Selon [Di Giulio et al \[141\]](#), la catalase nous renseigne sur le degré d'altération de la cellule. [Benjamin et al \[106\]](#), dans leur étude histologique de branchies des individus tilapias exposés au cuivre via la nourriture, n'observèrent aucune altération de ces dernières. Or dans notre étude les poissons sont exposés au cuivre via l'eau. [Sandra et al \[74\]](#), dans leur étude, indique, qu'en association avec l'accumulation du cuivre (Cu^{2+}) au niveau des branchies des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*, plusieurs changements histopathologiques se produisaient au niveau de l'épithélium branchial avec des changement systématiques des paramètres physiologiques (Na^+/K^+ -ATPase...). Des altérations des cellules à chlorure, chargées de l'osmorégulation, ainsi que des cellules pavimenteuses, des hyperplasies et des fusions lamellaires des lamelles secondaires ont été observées par [Arellano et al \[142\]](#) sur une espèce marine. [Mazon et al \[143\]](#) ont obtenus des résultats similaires en exposant une espèce de poisson tropical vivant dans les eaux douces aux différentes concentration du cuivre toujours.

Une légère diminution de l'induction de l'activité CAT ($73,41 \pm 0,71$ U/mg Protéines) est mesurée à la fin du cycle de décontamination. Ainsi le degré

d'activation de l'enzyme peut être considéré comme signe d'exposition des poissons à une contamination passée par le cuivre (Cu^{2+}). De fait, l'étude de l'atteinte des différentes cibles par les xénobiotiques s'avère très importante dans un diagnostic complet de l'état de santé des espèces bioindicatrices, ce qui est souvent l'objectif des recherches en ecotoxicologie afin d'éviter les fausses réponses d'un biomarqueur donné [04, 71, 65, 76].

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'approches de biomonitoring des écosystèmes aquatique [71, 78, 138, 139, 144].

5.1.1.7 Résultats du dosage de la protéase

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (5.12).

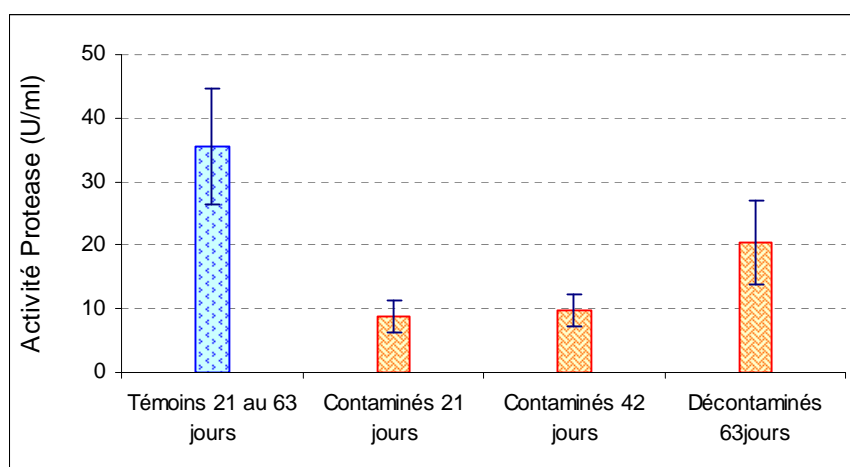


Figure 5.12 : Etude de l'effet du cuivre sur l'activité de la protéase dans l'intestin des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*.

Le dosage de l'activité protéase dans l'intestin des poissons (fig 5.12), mit en évidence une diminution d'activité de l'enzyme digestive chez les individus exposés au xénobiotique (Cu^{2+}) atteignant des activités inférieures à 10U/ml le long de cycle de contamination.

Par ailleurs, une reprise d'activité protéase est mesurée après la période de décontamination, cependant l'activité atteinte ($20,33 \pm 6,59$ U/ml) était toujours inférieur à celles mesurée chez les individus témoins ($35,56 \pm 09,03$ U/ml).

Ranilson *et al* [114], 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*.

Par ailleurs, une synthèse des résultats expérimentaux regroupés par Amiard *et al* [08], donne des exemples d'inhibition de différentes enzymes digestives de différents organismes aquatiques exposés aux polluants métalliques et organiques y compris la contamination mixte.

Le foie et le pancréas des vertébrés jouent un rôle très important dans la digestion des aliments, en synthétisant et en sécrétant les enzymes digestives [08, 77, 133]. Cependant, ces organes sont aussi la cible des contaminants chimiques qui y sont transportés pour leur détoxification. De ce fait, ils constituent les principaux sites d'accumulation des contaminants, et en particulier des contaminants métalliques, chez les animaux aquatiques [08, 77, 78]. Selon Lagadic *et al* [02] ; Van der Oost *et al* [11], les variations d'activités enzymatiques sont souvent une des premières réponses au stress, elles représentent donc des points utiles dans la confirmation des effets toxiques avant que ces derniers ne soient perceptibles à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (cellulaire, tissulaire, physiologique).

Dans notre étude et durant le cycle de contamination, l'ingestion de la nourriture par les poissons stressés était souvent incomplète. Selon Amiard *et al* [08], l'acquisition de la nourriture nécessite la mise en œuvre de comportements complexes qui peuvent être affectés par les anomalies engendrées par les polluants au niveau du système nerveux et des organes de locomotion. La diminution de la prise alimentaire peut également résulter soit d'une perturbation physiologique, soit d'un comportement d'évitement ; l'organisme étant chémosensible à la présence de contaminants dans sa nourriture. D'après Wilding *et al* [145], lorsque l'exposition cesse, le taux d'alimentation redevient immédiatement normal chez les individus précédemment contaminés, montrant qu'il s'agissait uniquement d'un phénomène

d'évitement alors que l'inhibition persiste dans le cas d'une perturbation physiologique. Dans notre cas l'activité atteinte à la fin du cycle de décontamination (fig 5.12) est probablement le résultat d'une perturbation physiologique et ne semble pas être liée au comportement d'évitement.

Le suivi de l'impact potentiel des contaminants sur l'activités 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. La mesure de ces variations d'activités enzymatiques a ainsi été proposée par plusieurs auteurs comme biomarqueur d'exposition [08].

Dans une perspective de synthèse des résultats des mesures biochimiques des biomarqueurs catalase et protéase, on peut dire que l'augmentation des dépenses énergétiques allouées à la défense traduite par l'induction de l'enzyme antioxydante CAT ainsi que la perturbation de l'enzyme digestive protéase ainsi discutée sont à l'origine de l'atteinte de la biométrie et du métabolisme bioénergétique traités au-dessus (p) suite à l'exposition au xénobiotique (Cu^{2+}). De fait, une forte pertinence est accordée à ces deux biomarqueurs comme un signal précoce de la dégradation de l'état de santé des organismes indicateurs ce qui donne aux gestionnaires de l'environnement une information sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer la qualité des écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des milieux avant que les effets soient perceptibles à des niveaux supérieurs aboutissant en phase finale à une dégradation de la qualité écologique d'un écosystèmes dans sa totalité.

De ce fait, les variables biologiques sont un complément indispensable au sein d'un programme de surveillance et d'alerte.

5.1.1.8 Etude de la spéciation du cuivre

La spéciation joue un rôle fondamental dans les interactions entre les ions métalliques et les organismes vivant [146, 147]. Différentes recherches

expérimentales ont montré que les organismes aquatiques sont essentiellement affectés par les concentration des ions métalliques libres en solution [40, 41, 42, 43]. Cependant, la concentration des ions métalliques libres chute fortement en présence des complexants que soit des ligands minéraux (HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^- ...) ou organiques [40, 44, 53, 146].

Vu les teneurs de l'alcalinité et de la dureté dans notre étude et la simplicité de notre dispositif expérimental, la complexation des ions de cuivre avec les ligands minéraux semble être la voie majoritaire. Ainsi pour un cas simplifié de la spéciation inorganique du Cu^{2+} , les espèces susceptibles d'être formées d'après *Laura et al* [40], (en présence des ligands OH^- , CO_3^{2-}) sont : Cu^{2+} , CuOH^+ , $\text{Cu}(\text{OH})_2$, $\text{Cu}(\text{OH})_3^-$, $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$, CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$, H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^- , H^+ .

Par ailleurs, et selon *Sylva R,N* [148], les espèces chimiques du cuivre les plus probablement présents en solution dans un intervalle de pH compris entre 7 et 8 sont bien : Cu^{2+} , $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$, CuOH^+ , CuCO_3 dont les constantes de stabilité des complexes formés sont regroupées dans l'annexe (E). La détermination graphique (se servant du diagramme de spéciation du cuivre « voir annexe (E) ») de la concentration des différentes espèces chimique est donnée dans le tableau (5.5).

Tableau 5.5 : les espèces chimiques du cuivre les plus probablement présents en solution pour $7 < \text{pH} < 8$.

Espèces	Cu^{2+}	$\text{Cu}(\text{OH})_2^{2+}$	CuOH^+	CuCO_3
%Espèces	20,7317	13,4146	23,7804	35,3658

D'après les résultats obtenus, on conclut que la fraction la plus biodisponible du cuivre (Cu^{2+}) pour les poissons ne représente que 20,73% de la concentration totale du métal présent en solution, ce qui conduit à une diminution de la toxicité du xénobiotiques vis-à-vis des spécimens contaminés sachant que les autres formes complexées sont moins toxiques. Ainsi, le complexe majoritaire est le carbonate de cuivre CuCO_3 (ce dernier ne se précipite pas) [148]. De même, dans les eaux naturelles ayant un pH supérieur à 6, la précipitation des complexes $\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$,

$\text{Cu}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{OH})_2$ conduira à une diminution de la toxicité du cuivre pour les poissons mais pas pour les organismes benthiques [146, 148].

Selon *Laura et al* [40], la complexation des ions métalliques avec les composés issus de l'activité métabolique des organismes aquatiques (azote ammoniacal, nitrite...) joue également un rôle dans la détermination de la spéciation des espèces chimiques. Cependant les constantes de stabilité sont très mal connues ce qui rend l'étude de la complexation très difficile à mettre en évidence. Mais le résultat certain est que la fraction biodisponible du métal va diminuer.

Cependant, la détermination des effets synergiques ou bien antagonistes entre les différentes espèces chimiques se trouvant en une seule matrice est très importante dans le but d'étudier les effets vis-à-vis des organismes aquatiques.

Une voie encore importante de la diminution des formes biodisponibles des éléments traces est l'adsorption [40, 44, 53]. Dans notre système expérimental l'adsorption du cuivre sur les parois des aquariums peut conduire à une diminution non négligeable de la concentration totale en solution en contribuant ainsi à la réduction de la fraction libre (Cu^{2+}) de l'élément métallique.

De plus la formation de complexes à la surface des particules organiques fécales (ces particules présentent différents types de groupes fonctionnels complexant à leurs surfaces [40]) et sur les particules solides du refus alimentaire conduit à son tour à la fixation des ions Cu^{2+} en diminuant encore la biodisponibilité de ces derniers vis-à-vis des poissons contaminés.

Pour ces raisons et d'autres, on a adopté une fréquence de régénération de deux fois par semaine de la concentration totale de cuivre dans le but de minimiser les pertes en polluant.

L'étude de la spéciation paraît donc très importante dans la détermination du degré de contamination des écosystèmes aquatiques et la mise en évidence de la concentration biodisponible altérant les organismes contaminés. Cette étude trouve encore une grande importance dans le cas où on étudie les systèmes de façon intégrale (dans leur globalité) en faisant intervenir les différentes interactions entre

les différents compartiments et matrices constituant l'écosystème aquatique à savoir l'eau, le sédiment et le biote. Néanmoins l'étude est très complexe et fait appel à des moyens analytiques très perfectionnés et à des techniques informatiques très développées. Actuellement il existe des logiciels très spécialisés dans l'étude de la spéciation des éléments traces.

5.1.1.9 Résultats du dosage de cuivre en solution

Au début on a tenté de doser le cuivre libre en solution en plus de la concentration totale de l'élément, mais le dysfonctionnement du polarographe de L'INSFP-Blida ainsi que la difficulté rencontrée lors de l'accès au CNR-Alger nous ont empêché de compléter notre étude de la meilleure façon. De ce fait, on s'est limité au dosage du cuivre total par la méthode de complexation à la dithizone dans le cas de l'eau et au dosage par absorption atomique du cuivre total accumulé par les poissons le long du cycle expérimental.

Les résultats relatifs au dosage du cuivre par complexometrie sont illustrés par le graphe ci-dessous (fig 5.13) ;

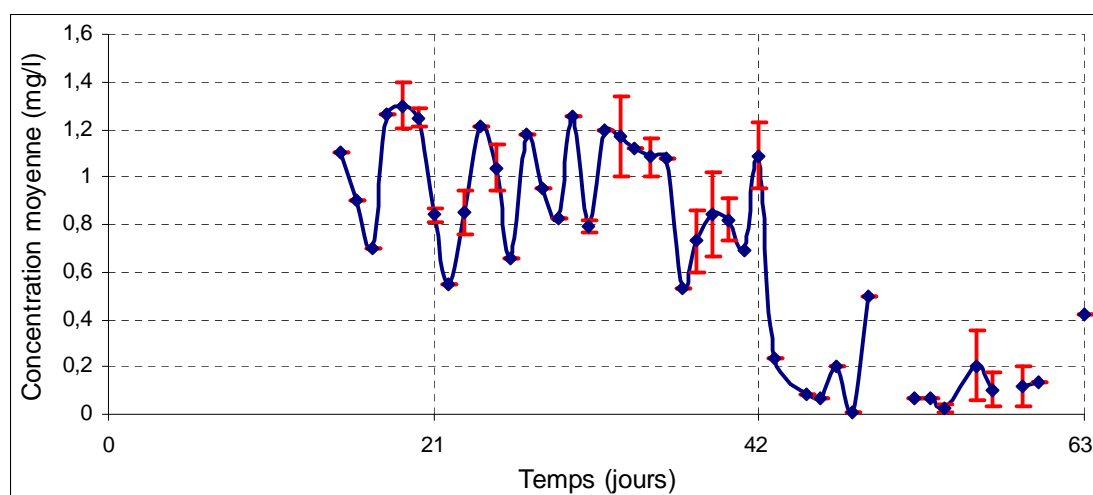


Figure 5.13 : Evolution de la concentration moyenne en cuivre total dans l'eau des aquariums de contamination.

D'après la figure (5.13), on constate que la concentration moyenne du cuivre totale pendant le cycle de contamination est d'environ 0,964mg/l, ce qui traduit la conservation de la concentration du polluant métallique.

Néanmoins, les teneurs en polluant supérieures à 1mg/l restent difficiles à interpréter et les causes sont ignorées. A moins qu'il s'agit d'une erreur de manipulation ou de traitement des échantillons.

Par ailleurs, et durant le cycle de décontamination, des teneurs en cuivre inférieures à 0,2mg/l sont relevées. En absence de contaminant dans le milieu, les processus inverses à l'accumulation interviennent rapidement, surtout dans le cas où l'atteinte de la cible biologique n'était pas aigue, et cela dans le but d'augmenter l'efficacité d'excréter les éléments traces concentrés au sein de l'organisme. Selon [Alain geffard \[18\]](#), l'élimination des métaux peut être démontrée en déplaçant des organismes d'un milieu contaminé vers un milieu propre.

Chez les poissons les métaux accumulés peuvent être perdus à travers le tractus alimentaire sous forme de fèces. L'égestion par les fèces est le processus dominant pour la décontamination métallique chez les organismes aquatiques [\[05\]](#). Ainsi dans notre expérience, les spécimens décontaminés ont montré une reprise de l'ensemble des activités physiologiques traduites par la consommation intégrale de l'aliment, la bonne respiration, la baisse de l'induction de l'activité catalase et l'augmentation de l'activité protéase. En fait une curabilité de l'état de santé des spécimens est le résultat de l'efficacité attendue des différents processus de décontamination et d'élimination du xenobiotique accumulé traduit par une diminution de la quantité du polluant bioaccumulé (Tab 5.4).

A l'exception, deux pics de concentration supérieure à 0,4 mg/l ont été relevés le 49^{eme} et le dernier jour, ce qui est encore difficile à interpréter. Il est connu que la cinétique de détoxification est plus lente que la cinétique d'accumulation [\[04, 05\]](#), cela ne peut donc justifier les taux mesurés.

5.1.2 Test d'écotoxicité courte durée

L'objectif des tests courtes durés était d'étudier la cinétique de réponse des différents biomarqueurs discutés auparavant dans le test chronique. Cependant, cette fois ci, les réponses ont été relevées sous l'effet des métaux traces : Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} et le mélange polymétallique de tous ces derniers, à des concentrations de 0,5 ; 1 et 1,5mg/l.

Pour les même objectifs décrits dans le test d'écotoxicité chronique, l'assurance des conditions expérimentales optimales (à savoir : qualité de l'eau et de l'aliment, $T^{\circ}\text{C}$, pH, oxygène dissous...) était toujours l'étape cruciale avant de commencer les différents tests d'écotoxicité.

Les résultats expérimentaux relevés quotidiennement sont regroupés dans des tableaux dans l'annexe (E).

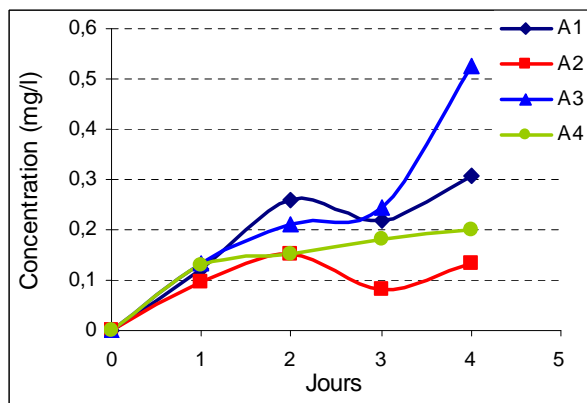
Comme conclusion des différents tests et mesures effectués, les stress pouvant exercer une eau ou un aliment de mauvaise qualité ne sont pas probables à exister. De fait, les différentes mesures obtenues des différents biomarqueurs peuvent être corrélées directement à l'effet des polluants métalliques (Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+}).

5.1.2.1 Etude de l'effet des polluants sur l'excrétion Azotée et Phosphorée

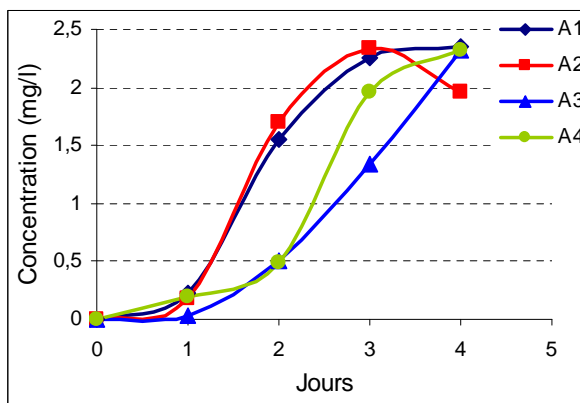
A/- L'excrétion Azotée

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (5.14).

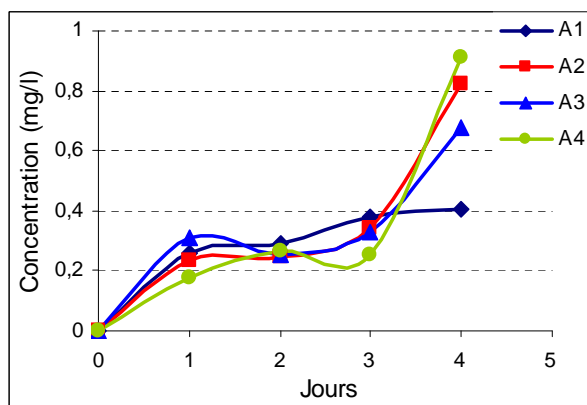
Comme le montre la figure (5.14) ci-dessous, la production des composés azotés présente une évolution quasi identique dans les aquariums à tilapias. De plus l'effet de chaque concentration sur l'activité métabolique est difficilement distinctif.



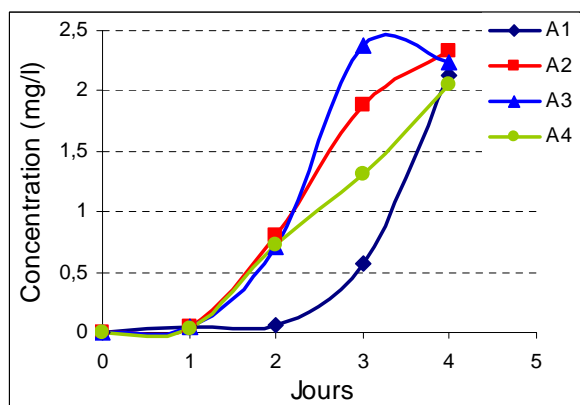
(A) : Etude de l'effet du cuivre sur les teneurs en azote amoniacal



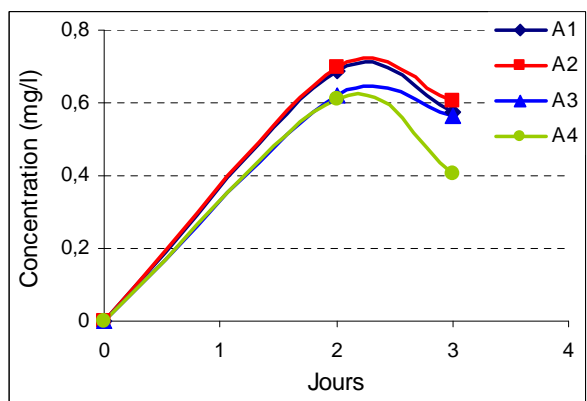
(B) : Etude de l'effet du cuivre sur les teneurs en nitrite



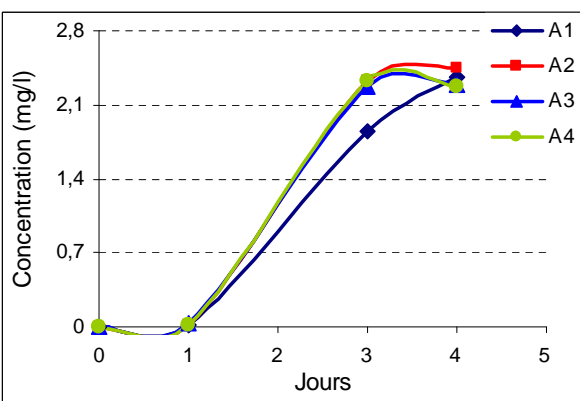
(C) : Etude de l'effet de l'argent sur les teneurs en azote ammoniacale



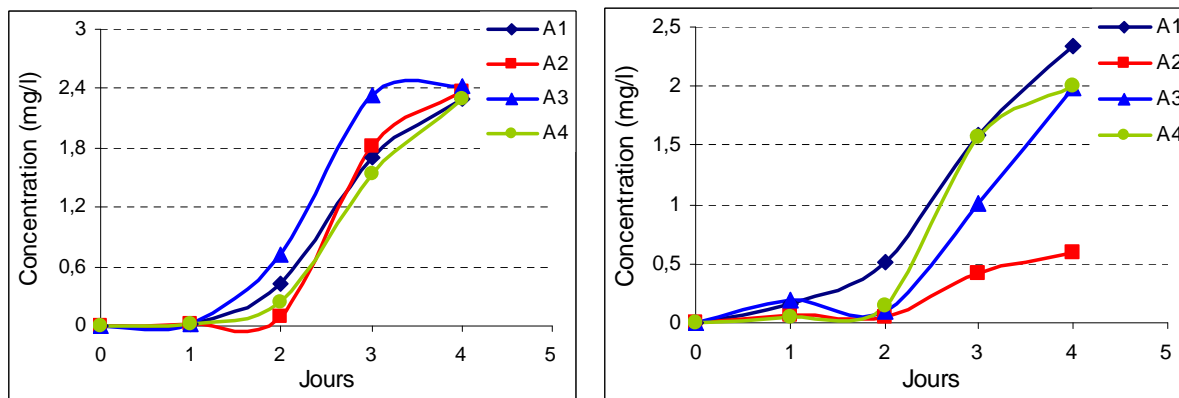
(D) : Etude de l'effet de l'argent sur les teneurs en nitrite



(E) : Etude de l'effet du plomb sur les teneurs en azote ammoniacale



(F) : Etude de l'effet du plomb sur les teneurs en nitrite



(G) : Etude de l'effet du cadmium sur les teneurs en nitrite

(K) : Etude de l'effet du mélange polymétallique sur les teneurs en nitrite

Figure 5.14 : Etude de l'effet des éléments métalliques (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur l'excrétion azotée (fig A, B, C, D, E, F, G, K).

A1: Aquarium témoins 0,0mg/l ; A2: Aquarium contamination 0,5mg/l ;
A3: Aquarium contamination 1mg/l ; A4: Aquarium contamination 1,5mg/l.

Comme pour le cas du test chronique, l'ingestion d'aliment chez les individus témoins est souvent intégrale contrairement aux individus contaminés où l'aliment reste en surface puis se sédimente au fond des aquariums (refus alimentaire) ce qui conduit probablement à un enrichissement du milieu en composés azotés.

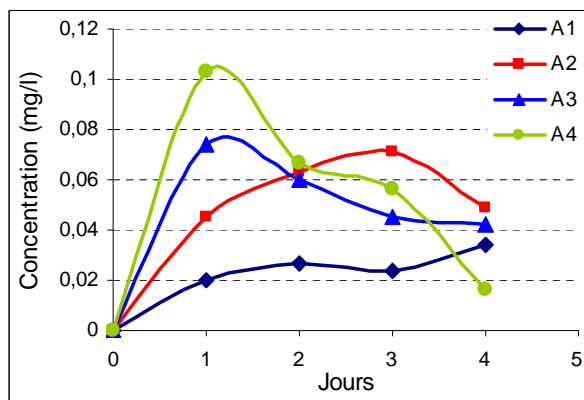
Nonobstant, les teneurs obtenues lors du dosage des composés azotés dans les aquariums témoins, sont le résultat direct de l'activité métabolique des poissons.

Aussi, dans le test chronique, l'effet du cuivre à une concentration de 01mg/l sur les excréments azotés des tilapias n'est apparu pratiquement qu'après la 2^{ème} semaine d'incubation.

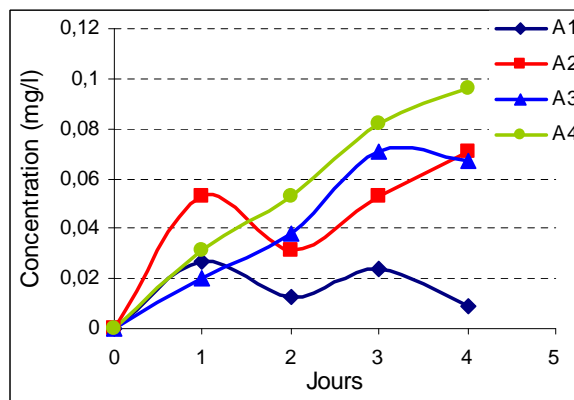
Ainsi, de point de vue cinétique de réponse, l'excrétion azotée ne semble pas très pertinente. Cependant, pour des durées d'exposition longues cette mesure s'avère très intéressante en traduisant l'atteinte du métabolisme bioénergétique des spécimens contaminés.

B/- L'excrétion Phosphoré

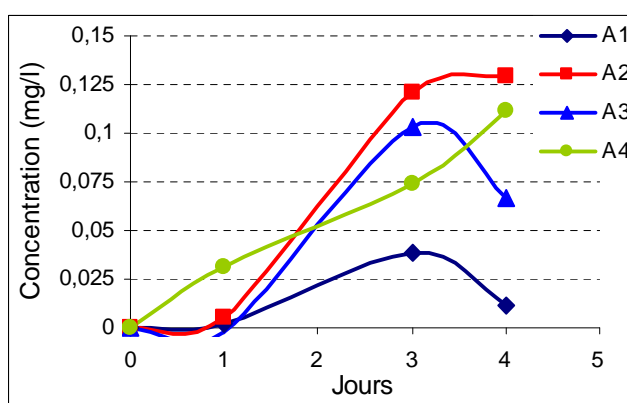
Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (5.15).



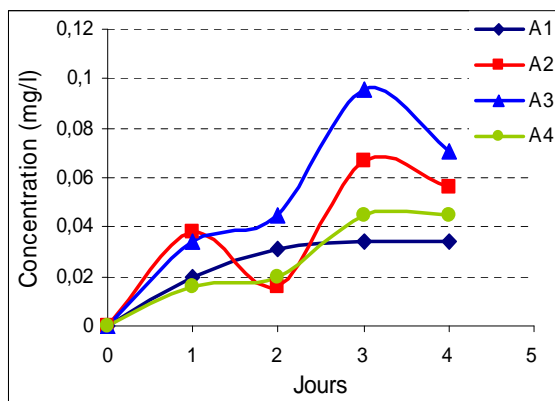
(A) : Etude de l'effet du cuivre sur l'excrétion phosphoré



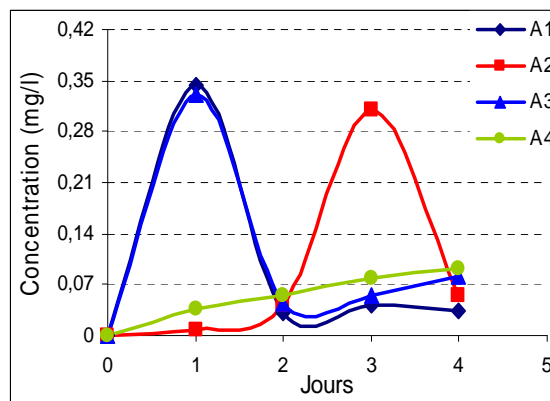
(B) : Etude de l'effet de l'argent sur l'excrétion phosphoré



(C) : Etude de l'effet du plomb sur l'excrétion phosphoré



(D) : Etude de l'effet du cadmium sur l'excrétion phosphoré



(E) : Etude de l'effet du mélange sur l'excrétion phosphoré

Figure 5.15 : Etude de l'effet des éléments métalliques (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur l'excrétion phosphorée (fig A, B, C, D, E).

A1: Aquarium témoins 0,0mg/l ; A2: Aquarium contamination 0,5mg/l ;
A3: Aquarium contamination 1mg/l ; A4: Aquarium contamination 1,5mg/l.

L'excrétion du phosphore dissous s'effectue sous forme d'orthophosphates par des processus actifs liés essentiellement à l'activité rénale [91], 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 mêmes que ceux influençant l'excrétion azotée [91].

Les différentes mesures effectuées dans chaque test de notre étude ont montré que l'excrétion phosphorée est très faible par rapport à l'excrétion azotée.

Sous l'effet du cuivre, les teneurs en phosphore mesurées après les 24h d'exposition montrent que l'excrétion augmente avec la concentration du xénobiotique. Après 48h d'exposition les valeurs se trouvant presque identiques (à 0,07mg/l) et toujours supérieures à celles enregistrées chez les individus témoins.

Dans le cas de contamination avec l'argent, ce dernier conduisit également à une augmentation du taux d'excrétion du phosphore. Sous l'effet d'une concentration de 1,5mg/l d'Ag⁺, la cinétique était toujours croissante en atteignant un maximum de (0,095mg/l) au 4^{ème} jour d'exposition. Sous l'effet des concentrations de 0,5 et 1,0mg/l la cinétique était variable (croissante et décroissante) et les teneurs en phosphore se situaient à (0,07mg/l) après les 96h.

Les teneurs en phosphore enregistrées dans les aquariums contaminés par le plomb sont aussi supérieures à celles mesurées dans l'aquarium témoin. Les concentrations de 0,5 et 1,5mg/l du Pb²⁺ conduisirent à des teneurs maximales de 0,13 et 0,07mg/l respectivement après les 96h d'exposition alors que la teneur maximale de l'effet d'une concentration de 1,0mg/l du Pb²⁺ est de 0,11mg/l, relevée le 3^{ème} jour.

La cinétique d'excrétion phosphorée, dans le cas d'exposition des tilapias au cadmium, était variable et la distinction des teneurs n'est observée qu'après le 3^{ème} jour pour dire que les individus stressés excrètent plus de phosphore que les individus témoins.

L'interprétation des résultats relatifs au test de l'effet du mélange des différents polluants employés semble d'être difficilement discutables.

Le suivi de l'excrétion phosphorée s'avère donc très intéressant, du point de vue cinétique de réponse, cependant les faibles teneurs mesurées et le manque de données sur les facteurs influençant cet élément nous empêche de le choisir comme facteur de diagnostic dans l'approche biologique.

5.1.2.2 Résultats des mesures biométriques

Les valeurs du taux de croissance spécifique sont illustrées dans la figure (5.16) ci-dessous.

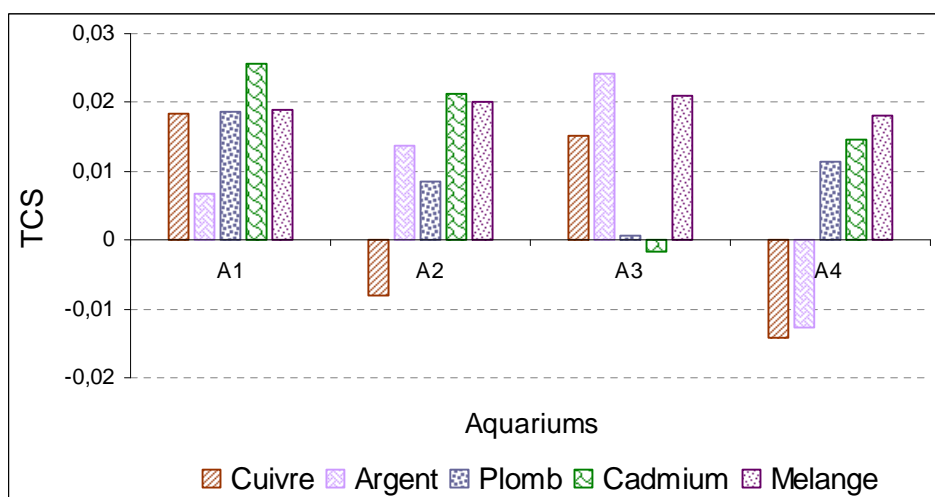


Figure 5.16 : Etude de l'effet des éléments traces (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur les taux de croissance spécifiques TCS.

A1: Aquarium témoins 0,0mg/l ; A2: Aquarium contamination 0,5mg/l ;
A3: Aquarium contamination 1mg/l ; A4: Aquarium contamination 1,5mg/l.

En général, les valeurs du taux de croissance (TCS), exploitées dans la figure (5.16) ci-dessus, montrent que le gain en poids chez les individus témoins est supérieur à celui mesuré chez les individus soumis aux différents polluants. Toutefois, dans le test de l'argent (Ag^+) à des concentrations de 0,5 et 1,0mg/l les

individus contaminés ont montré des taux supérieurs à ceux mesurés chez les spécimens témoins. Sous l'effet du mélange polymétallique les valeurs du TCS étaient presque identiques pour les quatre groupes de test. Par ailleurs, sous l'effet du cuivre à 0,5 et 1,5mg/l, l'argent à 1,5mg/l et le cadmium à 1,0mg/l une perte de poids est enregistrée (TCS<0).

Aucune corrélation n'a été établie entre le facteur TCS et le degré de contamination dans l'ensemble des tests appliqués. Vu la variabilité des taux de croissance relevés chez les individus témoins dans l'ensemble des tests d'écotoxicité, la durée d'exposition de 96 heures ne semble pas donc suffisante pour révéler des effets clairs sur l'atteinte de la croissance des spécimens contaminés.

Les résultats des rapports hépatosomatique RHS obtenus sont graphiquement indiqués dans la figure (5.17).

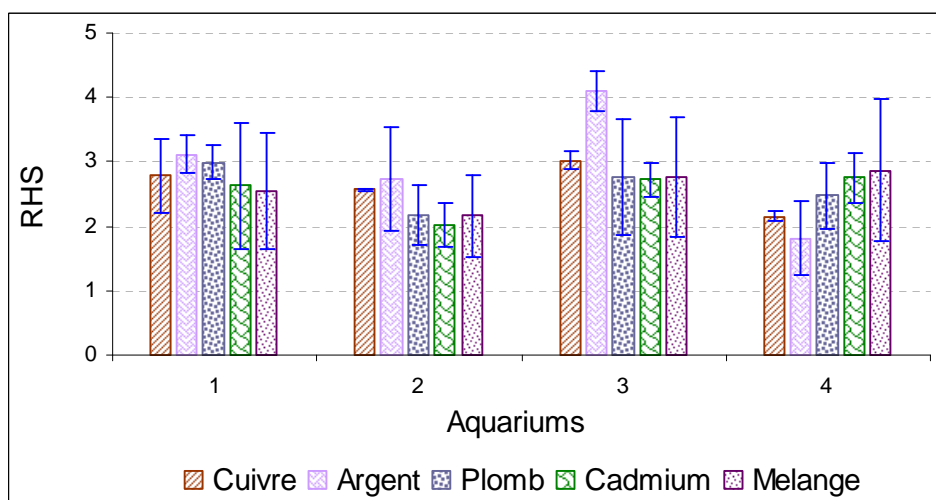


Figure 5.17 : Etude de l'effet des éléments traces (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur les rapports hépatosomatique RHS.

A1: Aquarium témoins 0,0mg/l ; A2: Aquarium contamination 0,5mg/l ;
A3: Aquarium contamination 1mg/l ; A4: Aquarium contamination 1,5mg/l.

Aucun changement significatif n'est relevé dans la mesure du RHS en fonction du polluant et de la concentration d'exposition. Hormis le cas de l'argent (Ag^+) à 01mg/l où une augmentation remarquable du RHS est enregistrée.

Les résultats des rapports gonadosomatique RGS obtenus sont représentés dans la figures (5.18).

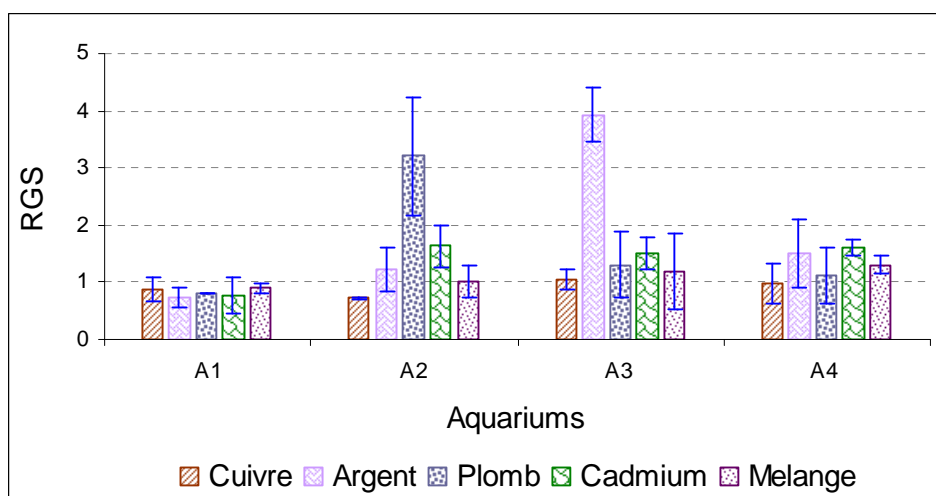


Figure 5.18 : Etude de l'effet des éléments traces (Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+}) sur les rapports gonadosomatique RGS.

A1: Aquarium témoins 0,0mg/l ; A2: Aquarium contamination 0,5mg/l ;
A3: Aquarium contamination 1mg/l ; A4: Aquarium contamination 1,5mg/l.

Les valeurs du rapport gonadosomatique RGS (fig 5.18) déterminées sous l'effet des différentes concentrations du cuivre (Cu^{2+}) ainsi que du mélange polymétallique, ne semblent pas être modifiées. Par ailleurs, le cadmium (Cd^{2+}) conduit à des augmentations plus au moins modérées du RGS (fig 5.18).

Ainsi, la plus importante augmentation du RGS est relevée sous l'effet de l'argent (Ag^+) à 1,5mg/l suivie par celle mesurée sous l'effet du plomb (Pb^{2+}) à 0,5mg/l. Cependant, sous l'effet de l'argent (Ag^+) à 0,5 et 1,5 mg/l ainsi que le plomb (Pb^{2+}) à 1 et 1,5mg/l, les augmentations du RGS sont plus au moins faibles.

Selon [Amiard et al \[08\]](#), les indices biométriques testés en nature sur plus d'un cycle annuel, révèlent clairement une différence intersites de la condition des organismes particulièrement dégradée chez ceux issus de site contaminé. De fait, ces facteurs (TCS, RHS, RGS) constituent donc des paramètres à prendre en considération, et ceci plus particulièrement dans le cadre des programmes de biosurveillance de longues durées.

5.1.2.3 Résultats des dosages biochimiques du glucose et des protéines

Les différents résultats relatifs aux dosages du glucose et des protéines aux niveaux du foie et des branchies des poissons sont regroupés dans le tableau (5.6) ci-dessous.

Il est à noter que la discussion des valeurs des réserves énergétiques est faite en tenant compte des différentes valeurs mesurées chez les groupes témoins des différents tests d'écotoxicité.

Tableau 5.6 : Valeurs moyennes des taux du glucose et des protéines dans le foie et les branchies des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*.

		Foie				Branchies			
Tests	Groupes	Aq-1	Aq-2	Aq-3	Aq-4	Aq-1	Aq-2	Aq-3	Aq-4
Résultats du test de (Cu ²⁺)	Glucose	26,53 ±01,78	23,18 ±01,50	24,92 ±02,25	25,03 ±01,83	03,51 ±00,83	02,41 ±00,15	03,16 ±00,39	03,07 ±01,12
	Protéines	139,08 ±21,64	126,49 ±16,89	100,19 ±19,39	98,43 ±13,40	45,83 ±08,51	61,97 ±02,19	44,03 ±00,78	46,55 ±00,11
Résultats du test de (Ag ⁺)	Glucose	23,56 ±05,39	13,53 ±00,007	10,02 ±00,94	12,25 ±03,00	03,90 ±00,61	04,85 ±00,58	21,28 ±06,75	18,70 ±04,77
	Protéines	81,48 ±07,59	71,00 ±06,50	67,64 ±07,17	93,57 ±14,30	86,09 ±17,06	68,80 ±09,19	70,28 ±06,11	76,67 ±08,61
Résultats du test de (Pb ²⁺)	Glucose	24,92 ±01,03	29,79 ±01,39	21,43 ±01,02	20,08 ±00,59	03,62 ±00,16	02,48 ±00,24	02,08 ±00,30	01,50 ±00,30
	Protéines	83,71 ±09,83	110,24 ±19,02	47,5 ±00,64	48,87 ±00,62	74,84 ±10,62	78,57 ±08,84	51,46 ±06,87	71,69 ±07,19
Résultats du test de (Cd ²⁺)	Glucose	23,13 ±00,72	25,36 ±00,29	24,53 ±00,13	18,38 ±00,43	04,64 ±00,60	01,79 ±00,58	04,34 ±00,99	03,89 ±00,22
	Protéines	98,64 ±18,77	87,67 ±04,65	98,41 ±14,37	88,98 ±08,05	82,22 ±12,31	81,92 ±14,00	95,84 ±16,66	92,13 ±19,26
Résultats test de mélange	Glucose	21,36 ±00,05	22,66 ±00,28	23,31 ±00,27	18,38 ±01,21	05,66 ±01,60	04,48 ±01,53	03,94 ±01,43	05,72 ±01,45
	Protéines	76,67 ±11,29	75,28 ±08,05	79,82 ±10,27	76,81 ±16,06	76,44 ±10,69	83,41 ±15,95	69,52 ±09,09	78,27 ±13,95

- Au niveau du foie

Ainsi, au niveau du foie des poissons et sous l'effet du cuivre (Cu^{2+}), aucun effet de la concentration n'est révélé sur l'atteinte des réserves énergétiques.

Une diminution des taux de glucose est mesurée sous l'effet des différentes concentrations de l'argent (Ag^+) sans que les réserves en protéines ne soient perturbées.

La concentration 0,5mg/l du plomb (Pb^{2+}) conduisait à une augmentation des réserves énergétiques alors que les concentrations de 1 et 1,5 mg/l avaient des effets négatifs sur les taux des protéines et du glucose puisqu'on mesurait une diminution de ces derniers.

Le cadmium (Cd^{2+}) et le mélange polymétallique n'ont montré aucun effet significatif sur les taux en glucose et protéines, alors qu'une légère diminution du glucose est révélée sous l'effet de la concentration 1,5mg/l.

- Au niveau des branchies

Une diminution des taux du glucose est enregistrée sous l'effet des différentes concentrations du cuivre (Cu^{2+}). Alors que la concentration 0,5mg/l conduisit à une augmentation des taux des protéines, les concentrations 1 et 1,5 n'avaient pas d'effets sur les taux des protéines.

Par ailleurs, sous l'effet du plomb (Pb^{2+}), du cadmium (Cd^{2+}) et du mélange polymétallique, la tendance générale allait vers une diminution du taux du glucose sans que les taux des protéines ne soient perturbés.

En effet, dans notre étude d'écotoxicité de courte durée, la tendance générale de l'atteinte des réserves énergétiques était une diminution des taux du glucose avec une constance des réserves en protéines.

Ainsi, les réserves en protéines sont moins sensibles que celles exprimées en glucose. De fait, la cinétique de réponse des réserves en glucose est très pertinente que celles relative aux protéines.

5.1.2.4 Résultats des dosages biochimiques des biomarqueurs

A/- Résultats du dosage de l'activité de la Catalase

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) aux niveaux du foie et des branchies des poissons tilapias sont respectivement représentés dans les figures (5.19) et (5.20).

- Au niveau du foie

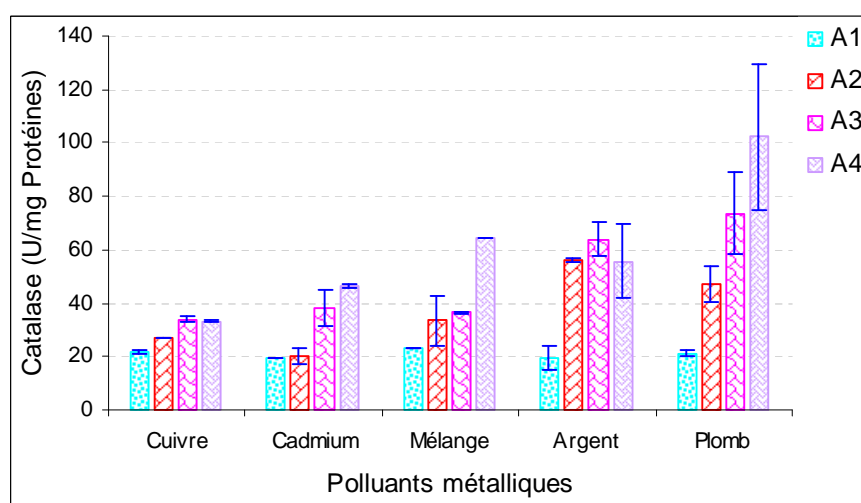


Figure 5.19 : Etude de l'effet de la concentration en métal sur l'activité de la catalase dans le foie des tilapias *Oreochromis niloticus*.

A1: Aquarium témoins 0,0mg/l ; A2: Aquarium contamination 0,5mg/l ;
A3: Aquarium contamination 1mg/l ; A4: Aquarium contamination 1,5mg/l.

L'objectif principal de l'étude de la réponse enzymatique CAT aux stress oxydatifs causés par les différents métaux testés était de qualifier la catalase comme biomarqueur sensible traduisant l'état de santé des poissons afin de les utiliser comme bioindicateurs d'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques, et cela dans un contexte expérimental de la biosurveillance récemment très employée et adoptée par de nombreux organismes de recherches.

De ce fait, l'étude de l'activité de la catalase dans le foie montre que cette dernière est accélérée par les différents polluants employés.

Sous l'effet des différentes concentrations du cuivre (Cu^{2+}), l'augmentation de l'activité enzymatique n'était pas importante. [Guluzer et al \[71\]](#), dans leurs études ont constaté la même observation chez le poisson tilapia toujours.

Chez les poissons les enzymes antioxydants sont induites ou inhibées par le cuivre Cu^{2+} et cela en fonction de la dose testée, de l'espèce et surtout de la durée d'exposition. Chez le poisson zebra, exposé à une concentration de 0.14mg/l CuSO_4 , une claire induction de la catalase est observée à la deuxième semaine []. Ainsi, dans notre étude d'écotoxicité chronique, une forte induction de l'activité catalase a été mesurée après 21 jours d'exposition au xénobiotique (Cu^{2+}).

La concentration 0,5mg/l du cadmium (Cd^{2+}) n'avait aucun effet vis-à-vis de l'induction de l'activité CAT. Cependant, sous l'effet des concentrations 1 et 1,5mg/l, l'induction était proportionnelle à la concentration d'exposition et les activités atteignirent ($38,15 \pm 6,89$ U/mg Prot) et ($46,57 \pm 0,65$ U/mg Prot) respectivement.

Les inductions de l'activité CAT relevées sous l'effet du mélange polymétallique se sont trouvées proportionnelles aux concentrations employées dont on mesurait des augmentations d'activité de ($33,56 \pm 9,32$ U/mg Prot), ($36,36 \pm 0,2$ U/mg Prot) et ($64,26 \pm 0,2$ U/mg Prot) respectivement.

A concentrations égales (0,5mg/l), l'argent (Ag^+) s'est révélé plus inducteur de l'augmentation de l'activité CAT que les autres xénobiotiques testés. Cependant, l'activité CAT se montrait indépendante des concentrations employées de l'argent (Ag^+).

Par ailleurs, l'augmentation de la catalase était proportionnelle à la concentration utilisée du plomb Pb^{2+} . Ce dernier causait le plus grand stress conduisant à une induction maximale de 129.33 U/mg Prot de l'activité catalase. Le plomb étant classé parmi les métaux les plus toxiques pour les organismes aquatiques [06].

Ainsi, le classement du degré d'induction de l'activité CAT peut être illustrée comme suit : (les crochets signifie sous l'effet)

$CAT[Pb^{2+} \text{ à } 1,5mg/l] > CAT[Pb^{2+} \text{ à } 1mg/l] > CAT[Ag^+ \text{ à } 0,5mg/l] = CAT[Ag^+ \text{ à } 1mg/l] = CAT[Ag^+ \text{ à } 1,5mg/l] = CAT[M^{n+} \text{ à } 1,5mg/l] > CAT[Pb^{2+} \text{ à } 0,5mg/l] = CAT[Cd^{2+} \text{ à } 1,5mg/l] = CAT[Cd^{2+} \text{ à } 1mg/l] = CAT[M^{n+} \text{ à } 0,5mg/l] = CAT[M^{n+} \text{ à } 1mg/l] \geq CAT[Cu^{2+}]$

- Au niveau des branchies

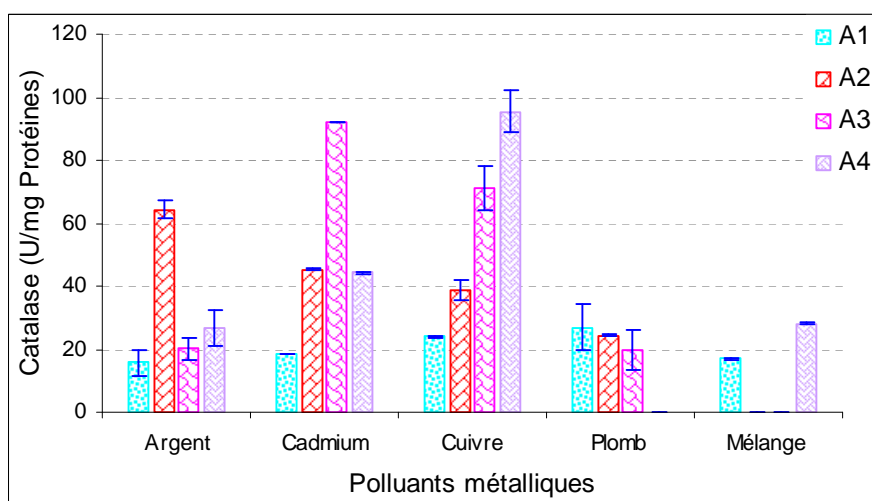


Figure 5.20 : Etude de l'effet de la concentration en métal sur l'activité de la catalase dans les branchies des tilapias *Oreochromis niloticus*.

A1: Aquarium témoins 0,0mg/l ; A2: Aquarium contamination 0,5mg/l ;
A3: Aquarium contamination 1mg/l ; A4: Aquarium contamination 1,5mg/l.

La concentration 0,5mg/l de l'argent (Ag^+) s'est révélée cette fois également la plus inductrice de l'activité CAT, aux niveaux des branchies, que les deux autres concentrations de 1 et 1,5mg/l. ces dernières n'ont montré aucun effet significatif sur l'activité CAT. Ces mêmes observations ont été relevées par [Guluzar et al \[71\]](#) dans leurs études sur le tilapia *Oreochromis niloticus*.

Une forte induction de l'enzyme antioxydante CAT est mesurée sous l'effet du cadmium (Cd^{2+}) à 1mg/l aux niveaux des branchies des poissons. L'activité atteinte étant $(92,14 \pm 0,2 \text{ U/mg Prot})$ (fig 5.20). Par ailleurs, les concentrations 0,5 et 1,5mg/l

ont causés des effets identiques et les inductions atteintes de l'activité CAT sont de (45,25 U/mg Prot) et (44,3 U/mg Prot) respectivement. Notons que [Guluzar et al \[71\]](#), dans leurs études n'ont enregistré aucun effet du cadmium sur l'activité CAT mesurée aux niveaux des branchies des poissons tilapias.

Une proportionnalité s'est révélée entre le degré d'activation de l'enzyme CAT et la concentration du xénobiotique Cu^{2+} . De même, une accélération de l'induction de l'enzyme CAT est traduite par les écarts d'activités mesurés sous l'effet des différentes concentrations (fig 5.20).

Comme nous l'avons discuté dans le cas du test chronique, le cuivre est connu pour avoir provoquer de graves dommages au niveau de la structure lamellaire des branchies [\[74, 72, 142, 143\]](#). Selon [Di Giulio et al \[141\]](#), la catalase nous renseigne sur le degré d'altération de la cellule.

Par ailleurs, la plus forte induction de la catalase est mesurée sous l'effet du cuivre (Cu^{2+}) à 1,5mg/l suivie par celle mesurée sous l'effet du cadmium (Cd^{2+}) à 1mg/l puis par celles mesurées sous l'effet du cuivre (Cu^{2+}) à 1mg/l et l'argent (Ag^+) à 0,5 mg/l.

Des valeurs nulles (absences de réponses) de l'activité catalase sont relevées dans le test du Pb^{2+} à 1,5mg/l et du mélange polymétallique à des concentrations de 0,5 et 1,0mg/l. Les mesures effectuées étaient reproductibles ce qui nous a permis de dire que l'enzyme est probablement inhibée.

Le tableau (5.7) ci-dessous illustre le degré de réponse de la CAT sous l'effet des différents xénobiotiques testés.

En général différentes réponses de l'activité CAT ont été relevées dans cette présente étude. Ainsi, l'induction enzymatique s'est trouvée dépendante de la nature du polluant testé. Par ailleurs, certains xénobiotiques ont montré des atteintes de cibles préférentielles comme se fut le cas du cuivre au niveau des branchies par exemple. Toutefois, il est difficile d'établir une corrélation entre le degré de contamination et la réponse mesurée de la CAT, comme c'est le cas du test de l'argent par exemple.

Tableau 5.7: degré de réponse de la CAT aux effets des éléments traces métalliques

		Polluant métallique				
Concentration	Organe	Cu ²⁺	Ag ⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	M ⁿ⁺
0,5mg/l	Foie	±	++	+	Ins	±
	Branchies	+	+++	?	+	Inh
1mg/l	Foie	±	+	++	±	±
	Branchies	++	Ins	?	+++	Inh
1,5mg/l	Foie	±	+	+++	+	±
	Branchies	+++	Ins	Inh	+	?

Pour compléter cette discussion, il est recommandé d'étudier la spéciation de chaque élément à part ainsi qu'en mélange afin de révéler les effets de synergie et d'antagonismes entre les différents éléments métalliques.

En milieu aquatique, de nombreuses études ont montré que les systèmes de défenses antioxydants sont des biomarqueurs capables de révéler précocement les effets des xénobiotiques exerçant leur toxicité *via* un stress oxydant [11].

Vu les caractéristiques et la sensibilité de réponse de l'enzyme CAT, une forte pertinence cinétique est donc conférée à cette dernière. Considérant la facilité du dosage de l'enzyme, plusieurs auteurs qualifient la catalase comme biomarqueur sensible et pratique dans le biomonitoring des écosystèmes aquatiques [71, 78, 138, 139, 144].

B/- Résultats du dosage de l'activité de la Protéase au niveau de l'intestin

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (5.21).

En général, l'activité protéase ne semble pas perturbée suite à l'exposition des poissons aux différents polluants à différentes concentrations pour une durée de 96h.

Cependant une légère augmentation est mesurée sous l'effet du cadmium (Cd^{2+}) à 1mg/l et le sous l'effet du mélange polymétallique à 1,5mg/l.

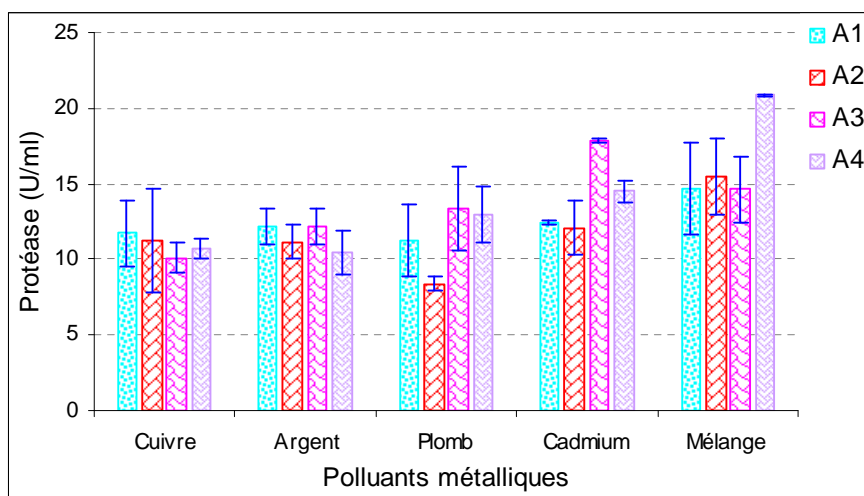


Figure 5.21 : Etude de l'effet de la concentration en métal sur l'activité protéase dans l'intestin des tilapias *Oreochromis niloticus*.

A1: Aquarium témoins 0,0mg/l ; A2: Aquarium contamination 0,5mg/l ;
A3: Aquarium contamination 1mg/l ; A4: Aquarium contamination 1,5mg/l.

Ainsi donc, de point de vue cinétique de réponse, la protéase ne semble pas être pertinente au même rang que la catalase.

Selon [Amiard et al \[08\]](#), les biomarqueurs de défense permettent aux organismes aquatiques de faire face à la présence de différentes classes de contaminants chimiques dans leurs milieux dans le but de permettre aux spécimens d'exercer leurs différentes activités physiologiques de base (nutrition, respiration) et de limiter la pénétration des xénobiotiques dans l'organisme en minimisant ainsi l'atteinte des organes cibles.

De fait, il est probable que l'atteinte de l'enzyme digestive (protéase) soit ralentie. Par ailleurs, l'atteinte des enzymes digestives par les polluants *via* l'eau est moins importante que celle *via* la nourriture [].

Différentes études ont précisé le caractère précoce de la réponse des enzymes digestives par rapport à l'apparition d'effets au niveau individuel

(croissance...) ou communautaire (diversité biologique) ce qui confère une forte pertinence écologique aux enzymes digestives employées comme biomarqueurs d'exposition [08].

En conclusion, les systèmes de défenses antioxydants (ex CAT) sont des bio marqueurs capables d'établir un diagnostic individuel des effets des dommages dus au stress oxydant et constituent des signaux d'alarmes précoces d'éventuels dommages au niveau de l'écosystème. Cependant pour les utiliser comme éléments prédictifs des effets aux niveaux des populations et des communautés, il est nécessaire d'établir le lien entre les défenses antioxydantes et les indicateurs de l'état de santé des individus (croissance, réserves énergétiques, fonctions métaboliques...).

En effet, une très forte pertinence est accordée à l'intégration des deux biomarqueurs CAT et protéase pour définir leur capacité à prédire d'éventuels effets au niveau populationnel. Par ailleurs, les différentes mesures réalisées dans cette présente étude à savoir : biomarqueurs (CAT et protéase), paramètres biométriques (TCS, RHS, RGS...), bioénergétiques (y compris les réserves), et écophysiologicals construira donc une excellente référence pour un diagnostic complet de l'état des écosystèmes dans le cas d'un programme de biosurveillance en milieu naturel.

CHAPITRE V
RESULTATS ET DISCUSSION
MODELE MOULE

5.2 Modèle moule

5.2.1 Paramètres hydrologiques

Les eaux marines possèdent un ensemble de caractères physico-chimiques relativement stables dont les principaux sont la température, la salinité, l'oxygène dissous et le pH. Ces facteurs deviennent des marqueurs importants de l'influence anthropique dans le cas des mélanges des eaux de mer avec les eaux des rejets urbains.

Les différents résultats des mesures *in situ* de la température (T°C), Salinité (Sal psu), Oxygène dissous (DO₂ mg/l) et le pH sont regroupés dans le tableau (5.8) ci-dessous.

Tableau 5.8 : Caractéristiques physico-chimiques des sites d'échantillonnages

Sites	T (°C)	Sal (psu)	DO ₂ (mg/l)	pH
Fouka marine	20,00±1,66	36,84±0,08	08,50±	07,62±0,08
Port Gouraya	21,33±2,92	36,49±0,28	05,90±1,68	07,68±0,09
Port Bouharoune	22,09±1,72	36,51±0,35	05,40±1,08	07,55±0,24
Port Khemisti	22,31±1,85	36,55±0,24	04,41±1,26	07,58±0,24

Il est connu que les différentes activités biologiques (croissance, bioaccumulation et détoxification des polluants chimiques, réponses enzymatiques

des biomarqueurs...), mesurées chez les bivalves, sont étroitement influencées par les facteurs abiotiques du milieu environnant [69, 95, 97, 119, 149, 150, 151, 152].

A partir des résultats obtenus, nous remarquons que les variations de températures dans les différentes localités sont presque identiques et les valeurs mesurées sont dans la limite des valeurs saisonnières. De fait, les températures mesurées dans les sites de contamination des moules (port de khemisti, Bouharoune et Gouraya) ne présente pas un stress naturel pouvant perturber le métabolisme et l'activité physiologique des spécimens transplantés.

Nous remarquons que les valeurs de la salinité sont stables pendant la durée d'étude pour les différents sites. Ainsi, la salinité relevée dans les sites de contamination n'a aucun effet sur les réponses biologiques des moules traduites par les biomarqueurs.

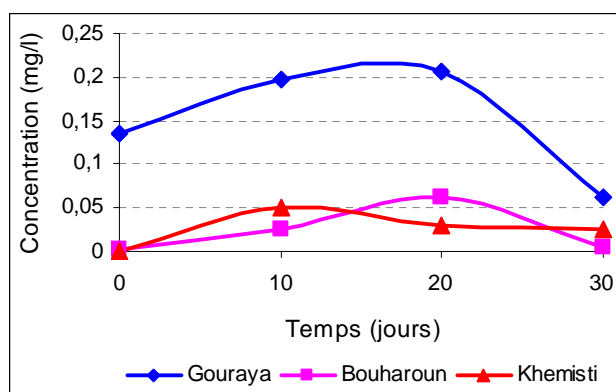
En revanche, Les variations de l'oxygène dissous dans les différents sites ne présentent pas les mêmes allures ; les teneurs oscillent entre un min de $4,41 \pm 1,26$ mg/l à la station de Khemisti et un max de $5,82 \pm 1,68$ mg/l à la station de Gouraya.

La désoxygénation est due probablement à une augmentation du degré de pollution, sachant que la dégradation des matières organiques conduit directement à une consommation importante de l'oxygène qui est le majeur oxydant de cette dernière [].

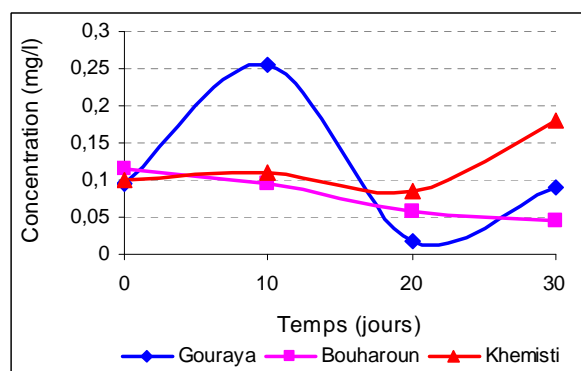
Dans l'évaluation du degré d'une pollution donnée, la mesure directe du taux d'oxygène dissous peut nous renseigner sur l'eutrophisation des écosystèmes aquatiques. L'eutrophisation peut conduire à l'asphyxie des eaux [40]. L'oxygène dissous est donc un indice sensible et pratique dans une première évaluation d'un diagnostic environnemental. De fait, la plus faible teneur de l'oxygène dissous dans le port de Khemisti est le résultat probable de l'eutrophisation de ce dernier.

Le pH peut constituer un indice de pollution. Cependant, les valeurs du pH obtenues dans les sites d'étude montrent des variations peu remarquables. La comparaison de valeurs entre les différentes localités exclues l'effet gênant ou stressant du pH sur les individus transplantés.

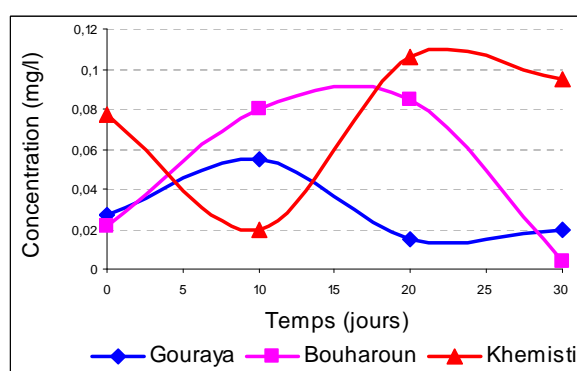
Les résultats relatifs aux mesures des sels nutritifs (phosphore, azote ammoniacal, nitrites) dans les sites de contaminations sont illustrés par la figure (5.22) ci-dessous.



(A) : Phosphore



(B) : Azote ammoniacal



(C) : Nitrites

Figure 5.22 : Variation des teneurs en sels nutritifs dans les sites de contamination

En général, des variations irrégulières de la concentration des composés azotés sont enregistrées dans les différents sites de contamination. Cependant, les concentrations en phosphore étaient supérieures dans le port de gouraya comparativement aux deux autres ports (fig 5.22A).

Le phosphore est introduit dans les eaux à partir de l'agriculture et des foyers domestiques [40]. Les teneurs supérieures à 0,5mg/l doivent constituer un indice de pollution [153]. De ce fait, les fortes concentrations que nous avons mesurées semblent être liées aux rejets domestiques contenant de fortes concentrations en détergents et produits de nettoyage.

Le tableau (5.9) regroupe les teneurs en sels nutritifs mesurées aux niveaux du site de référence (Fouka marine) et de décontamination (Gouraya).

Tableau 5.9 : Valeurs moyennes des sels nutritifs mesurés dans le site de référence et de décontamination

	[N-NO ₂ ⁻] (mg/l)	[N-NH _{3,4}] (mg/l)	[P-PO ₄ ³⁻] (mg/l)
Site de référence	0,004	0,006	0,019
Site de décontamination	0,001	0,006	0,001

Dans les sites de référence et de décontamination, les concentrations mesurées en sels nutritifs sont faibles et stables durant la période d'étude (tab 5.9).

5.2.2 Résultats des dosages biochimiques des biomarqueurs

Plusieurs auteurs qualifient la transplantation des moules, d'un site de référence non/ou peu pollué vers des sites plus pollués, comme technique et stratégie très prometteuse et très pertinente dans le but d'évaluer le degré de contamination des écosystèmes marins [69, 95, 119, 120, 150,]. En complément des analyses chimiques de la bioaccumulation, la mesure de biomarqueurs permet de disposer d'informations sur la nature et le niveau de la contamination chimique mais aussi sur la santé des organismes vivants et des populations des écosystèmes aquatiques [69, 119, 120, 151, 154].

A/- Résultats du dosage de la catalase

Les résultats relatifs au dosage de la catalase (CAT) chez les moules (*Mytilus galloprovincialis*) transplantées sont représentés dans la figures (5.23) ci-dessous.

Les réponses enzymatiques des moules présentées dans la figure (5.23) varient en fonction de la durée d'exposition et de la zone d'étude. En général, une

augmentation de l'activité CAT est observée chez les individus transplantés dans les trois sites portuaires.

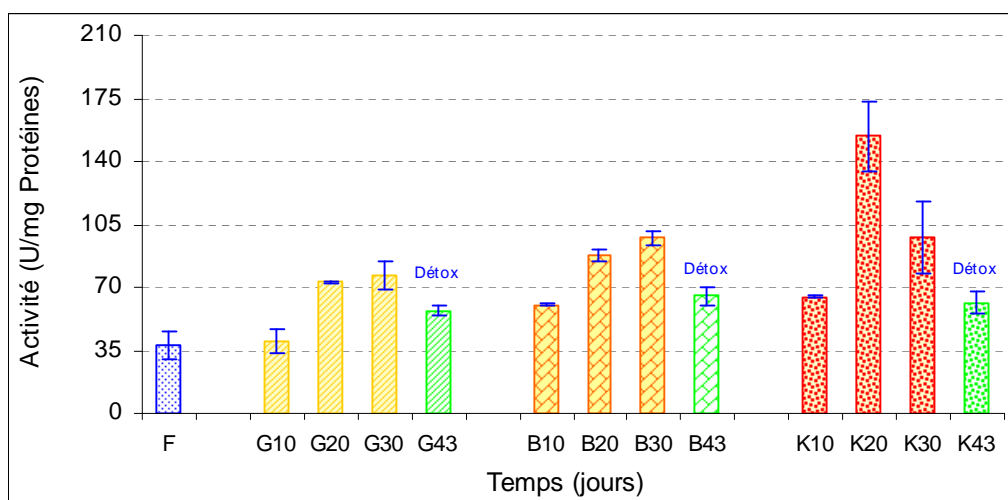


Figure 5.23 : Variation de l'activité catalase durant la période d'étude

F : Site de référence, G : Port de Gouraya, B : Port de Bouharoune, K : Port de Khmisti

Chez les moules transplantées au niveau du port de Gouraya, l'induction de l'activité CAT n'est observée qu'après le 20^{ème} jour (G20) d'exposition atteignant (73,209 U/mg Prot). Cette même activité pratiquement (76,568 U/mg Prot) est maintenue jusqu'au 30^{ème} jour (G30) fin du cycle de contamination.

Par ailleurs une augmentation continue de l'activité CAT est mesurée chez les spécimens transplantés au niveau du port de Bouharoune. Les inductions atteintes sont : 60,536 ; 87,948 et 97,494 U/mg Prot respectivement après 10jours (B10), 20jours (B20) et 30jours (B30) d'exposition.

Cependant la plus grande induction de l'activité CAT (154,037U/mg Protéines) est relevée chez les moules transplantées au niveau du port de Khemisti aux 20^{ème} jours (K20). Les activités ainsi atteintes aux 10^{ème} jours et à la fin du cycle de contamination sont : 65 et 97.943 U/mg Protéines respectivement.

Le classement de l'activité CAT peut être illustré comme suit :

Activité : CAT(K10) > CAT(B10) > CAT(G10).

CAT(K20) > CAT(B20) > CAT(G20).

CAT(K30) > CAT(B30) > CAT(G30).

Comme première supposition, cet ordre de classement peut être justifié par le degré de la pollution des trois localités de test. En effet, l'étude des effets biologiques de polluants sur nos espèces sentinelles (*Mytilus galloprovincialis*) était une approche fondamentale nécessaire pour évaluer les effets des perturbations d'origines anthropiques.

La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants. Elle peut concentrer les éléments traces à des concentrations supérieures à celles rencontrées dans son environnement [69, 94, 95, 120, 151]. Pendant tout processus physiologique d'échange avec le milieu environnant, les molécules exogènes pénètrent à travers les barrières biologiques séparant l'environnement interne de l'organisme du milieu externe [05]. L'accumulation des substances chimiques dans les organismes est à l'origine du stress oxydant [151].

En effet, par leurs propriétés redox, de nombreux xénobiotiques tels que les hydrocarbures, les métaux, les quinones ou encore certains pesticides sont connus pour exercer leurs effets délétères par le biais de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [69, 151, 155]. La réactivité des ROS peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes (oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines, les lipides et perturbation généralisée de la balance redox) chez les invertébrés [04, 69, 151, 155]. En effet, les organismes aquatiques ont développé des systèmes antioxydants leur permettant de faire face à la production de ROS [04, 08, 69, 120, 150, 151]. Comme nous l'avons discuté auparavant (modèle poisson), l'enzyme de défense antioxydante CAT est connue pour être induite afin de faire face au stress oxydant. Mesurée chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'activité catalase peut nous renseigner sur le niveau de la pollution [120, 151] et le degré d'altération de la cellule [141, 155].

D'après A Box *et al* [120], la mesure de même biomarqueur simultanément dans différentes localités donne une information sur le degré de la pollution de ces dernières et fournit une meilleure compréhension sur les mécanismes du mode d'action des polluants de l'environnement sur les organismes transplantés. En fait, A Box *et al* [120], ont constaté que le degré d'induction de l'activité enzymatique CAT était plus important chez les moules (*Mytilus galloprovincialis*) transplantées dans les

estuaires les plus impactés par les rejets urbains que chez les spécimens transplantés dans des estuaires peu touchés par l'activité anthropogénique pour qui ils mesuraient une moindre induction de l'enzyme antioxydante CAT. Cependant, ils prirent le degré de l'impact anthropique en fonction des activités humaines atteignant les différentes localités étudiées sans mesurer la concentration des polluants. De même Akcha *et al* [155], ont établi une forte corrélation entre le degré de la pollution et l'induction de la réponse catalase suite à l'exposition des moules *Mytilus galloprovincialis* aux différentes concentrations de Benzo[a]Pyrene (B[a]P).

Tableau 5.10 : Concentration du cuivre accumulé par les spécimens transplantés (*Mytilus galloprovincialis*).

Moules transplantées	Gouraya	Bouharoune	Khemisti
[Cu] bioaccumulée (µg/g sec)	0,7559	1,0064	2,1076

Dans notre étude, nous avons dosé la concentration du cuivre dans la chaire des moules afin d'avoir une idée d'une part, sur la concentration bioaccumulée par les spécimens de chaque groupe de test et d'autre part sur le degré de pollution métallique dans les différentes localités de transplantation. Les résultats relatifs à cette fin sont regroupés dans le tableau (5.10) ci-dessus.

Comme le montre le tableau (5.10), la concentration maximale bioaccumulée par les moules est enregistrée chez les individus transplantés dans le port de Khemisti suivie par celle mesurée chez les spécimens transplantés dans le port de Bouharoune puis par celle relevée chez organismes transplantés dans le port de Gouraya.

Ainsi, les augmentations de l'activité CAT (fig 5.23) mesurées chez nos spécimens transplantés sont le résultat direct de la présence des polluants dans les sites portuaires et les inductions ainsi relevées peuvent être corrélées directement aux degrés de pollution des trois localités d'études.

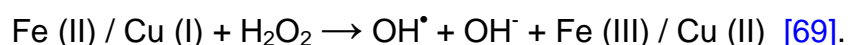
Des trois sites portuaires de la présente étude, le port de Khemisti est le plus petit. Les rejets atteignant ce dernier sont d'origine domestique, industriels (deux

activités sont implantées à proximité) et ceux liés aux activités de la pêche, ce qui conduit à une concentration importante de la pollution *in situ*. La forte activité de commerce et de pêche au niveau du port de Bouharoune est à l'origine de la pollution de ce dernier. Par ailleurs la principale source de pollution au niveau du port de Gouraya sont les rejets ménagers puisque l'activité de la pêche est moins importante qu'au niveau du port de Bouharoune.

Donc et suite aux explications ci-dessus données, le degré de la pollution des trois sites d'études peut être classé comme suit : Port Khemisti > Port Bouharoune > Port Gouraya.

L'examen d'une période de détoxification pour les trois groupes de tests dans un site dépourvu de la pollution en dehors des ports a conduit à une diminution de l'induction de l'activité CAT (fig 5.23). Les activités se situèrent finalement à des valeurs presque identiques 56,755 U/mg Prot (G43) ; 65,026 U/mg Prot (B43) et 61,644 U/mg Prot (K43), mais toujours supérieures à celle mesurée chez les individus du site de référence (37,71 U/mg Prot (F)). Ainsi, il est facile de mettre en évidence l'existence d'une relation directe entre le niveau de la pollution et le degré de stimulation de l'enzyme antioxydante CAT. Par ailleurs, la baisse d'induction de l'activité CAT peut être considérée comme signe de réversibilité de l'état de santé des spécimens. Les biomarqueurs de défense comme la CAT contribuent au maintien de l'homéostasie de l'organisme [69, 120, 150, 151].

L'importance majeure de la CAT réside dans son rôle d'élimination du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ [120, 151, 154, 155]. L'excès de ce dernier se diffuse dans la cellule causant un dommage oxydant [151] (17R). Le H₂O₂ peut modifier la physiologie cellulaire suite à la formation du radical OH[•] par la réaction Fenton [69, 151]. Le radical OH[•] étant le plus réactif et le plus toxique des espèces ROS pour la cellule [151].



Au niveau cellulaire, le dommage se traduit par l'altération et plus particulièrement l'oxydation des composants tels que l'ADN, les protéines et les lipides et par une

perturbation généralisée de la balance redox (ratios GSH/GSSG et NADH/NAD⁺) [04, 69, 151, 155].

Parallèlement à la mesure de l'activité CAT, [A Box et al \[120\]](#) ont mesuré la concentration du malondialhyde MDA (marqueur d'oxydation de la membrane phospholipidique) chez des moules (*Mytilus galloprovincialis*) transplantées dans différents estuaires caractérisés par un gradient de pollution différent. Cependant ils n'ont observé aucun changement significatif du MDA avec augmentation de l'induction de l'activité catalase CAT justifiant ainsi le rôle protecteur de la CAT contre l'oxydation des constituants de la membrane cellulaire. Selon les mêmes auteurs, l'activité glutathion peroxydase (GPO_x) s'est montrée inchangeable (la GPO_x décompose le H₂O₂ tout comme la CAT) concluant donc l'importance majeure de la réponse CAT au stress oxydant. D'après [Amiard et al \[08\]](#), à cause du stress les organismes mettent en place une stratégie énergétique favorisant les enzymes faiblement consommatrices d'énergie : en effet, la catalase ne requiert ni cofacteur, ni énergie pour son activité, tandis que la glutathion peroxydase consomme du glutathion réduit et du NADPH.

Par ailleurs, et d'après [Thomais et al \[151\]](#), plusieurs scientifiques considèrent la CAT comme biomarqueur, sensible et important du stress oxydant, meilleur que la SOD, révélant des effets biologiques dans le statut redox des organismes marins.

IL est reconnu que la réponse biologique des organismes peu être affectée non seulement par des polluants chimiques, mais aussi par un certain nombre de stressants naturels tels que la température, la salinité, l'oxygène dissous, la disponibilité des aliments ainsi que le cycle de reproduction [69, 97, 119, 150, 151]

[Stefania et al \[119\]](#), dans leur étude ont relevé des fluctuations saisonnière significatives dans la réponse des enzymes antioxydantes CAT, SOD, GPO_x mesurées chez les spécimens *Mytilus galloprovincialis* employés comme espèces sentinelles dans un programme de biomonitoring de l'impact des plateformes offshore dans la mer adriatique. Pour mettre en évidence la différence entre les effets de la pollution et ceux des saisons, des mesures simultanées sont effectuées à la fois dans les sites contaminés et dans le site de référence pris comme témoin.

Cette même stratégie a été adoptée dans notre programme de biosurveillance mené dans la présente étude.

En effet, la diminution de la température conduit généralement à une augmentation du stress oxydant. Ainsi, [Borkovie et al \[156\]](#) ont montré que des bivalves *Mytilus galloprovincialis* prélevés en hiver et au printemps dans des zones polluées par des eaux usées avaient des activités SOD et GPO_x plus élevées en hiver, suggérant un réarrangement des composants cellulaires métaboliques afin de compenser les fluctuations environnementales et réduire les effets de la charge polluante.

Suite aux résultats d'un programme de biosurveillance de trois années des eaux côtières du golfe Saronikos du Grèce [Thomais et al \[151\]](#), conclurent que l'activité SOD était maximale au printemps et que la CAT était maximale en hiver et au printemps. [Raffaella et al \[97\]](#), confirment à leur tour que les activités CAT, GST et GPO_x présentent de faibles niveaux en été.

Dans notre étude, l'immersion des stations artificielles a été réalisée pendant la période de repos sexuel dans les mois de juin et juillet dans le but de minimiser les effets de la fluctuation des températures et du cycle de reproduction sur les signaux des biomarqueurs. En effet la température varia légèrement. Ainsi les inductions atteintes de l'activité CAT sont donc le résultat direct de l'effet du degré de pollution des sites d'études.

La salinité, proportion des sels minéraux dissous dans l'eau de mer, peut influencer le phénomène de bioaccumulation et diminuer la concentration d'oxygène lorsqu'elle augmente considérablement. Dans notre étude la salinité s'est montrée stable durant la période de test et les valeurs mesurées restèrent dans l'intervalle des salinités optimales pour l'espèce *Mytilus galloprovincialis* (La salinité optimale est de l'ordre de 32-37psu). Ainsi, la salinité n'avait aucun effet stressant ni sur nos spécimens transplantés dans les différentes localités ni sur les réponses de l'enzyme de défense CAT. De plus la CAT est peu sensible à la salinité. [Damien et al \[150\]](#), dans leur étude de l'effet de la salinité (allant de 20 à 35) en fonction de la température (20 et 25C) sur les réponses enzymatique des mollusques en stade

larvaire n'ont relevé aucun changement dans l'activité CAT tandis que les activités AchE et GST tendirent à diminuer.

Les teneurs en oxygène dissous, qui sont la résultante des facteurs physiques, chimiques et biologiques (photosynthèse, respiration, réaction d'oxydo-réduction,...) et qui gouvernent la majorité des processus chimiques et biologiques oscillent entre un minimum de 4,41mg /l (station de Khemisti) et un maximum de 5,90mg/l à la station de Gouraya (Tab 5.8). La plus faible teneur de l'oxygène dissous dans le port de Khemisti est le résultat probable de l'eutrophisation de ce dernier nécessitant un dragage. Le niveau de la vase est au maximum toléré.

Dellali *et al* [157], ont signalé qu'une diminution de la teneur en oxygène est à l'origine d'une augmentation de l'activité de la catalase chez la moule de la lagune de Bizerte (Tunisie).

B/- Résultats du dosage de la protéase

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 5.24.

En général, une diminution de l'activité protéase est constatée chez les trois groupes de tests (G: Gouraya, B: Bouharoune, K: Khemisti) comparativement aux activités mesurées chez les spécimens témoins du site de référence (F: Fouka marine)

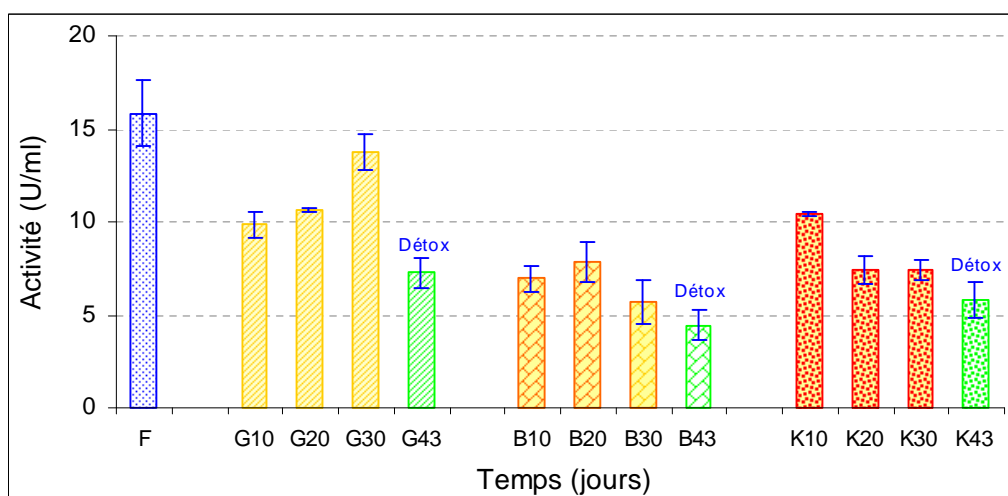


Figure 5.24 : Variation de l'activité protéase durant la période d'étude

F : Site de référence, G : Port de Gouraya, B : Port de Bouharoune, K : Port de Khemisti.

Une reprise de l'activité protéase est mesurée au 30^{ème} jour d'immersion chez les moules transplantées dans le port de gouraya. L'activité atteinte (13,757 U/ml) était proche de celle des individus témoins du site de référence (F).

Une diminution continue de l'activité protéase est enregistrée chez les spécimens transplantés dans le port de khemisti après 10 et 20 jours d'exposition. Au 30^{ème} jour l'activité protéase s'est révélée identique à celle mesurée au 20^{ème} jour.

La plus faible activité protéase est cependant mesurée chez les moules transplantées dans le port de Bouharoune après 30 jours d'immersion.

La moule est un bivalve filtreur accumulateur des micropolluants. Elle peut concentrer les éléments traces à des concentrations supérieures à celles rencontrées dans son environnement [69, 94, 95, 120, 15]. L'exposition des spécimens aux substances chimiques peut être à l'origine d'atteintes des enzymes digestive.

Des effets négatifs des polluants chimiques ont été observés chez différentes espèces d'invertébrés. Les activités amylase et sucrase ont été réduites chez la moule *Perna viridis* exposée aux polluants métalliques [158]. Chez la moules (*Mytilus galloprovincialis*) prélevées le long d'un gradient de contamination, les activités d'enzymes digestives ont montré des taux plus faibles de l' α -amylase chez les individus présentant les teneurs en cadmium les plus élevées [159].

Dans notre étude, l'atteinte de l'enzyme digestive (protéase) est donc le résultat direct de l'effet des différents polluants présent dans les différentes localités de tests.

Durant le cycle de décontamination, l'activité protéase était toujours en diminution et aucune reprise d'activité n'a été relevée chez les trois groupes de tests. Pendant le cycle de contamination les moules ont été exposées à une variété de contaminants métalliques et organiques. Les rejets domestiques sont connus comme étant un vecteur d'enrichissement des milieux par des ressources alimentaires pour nos spécimens. Donc, le double effet : présence de polluant ; absence de nourriture ne semble pas être dans ce cas.

Par ailleurs, le site de décontamination étant dépourvu de la pollution, il est fort probable que les ressources nutritionnelles y sont très faibles. Les très faibles teneurs en azote et en phosphore semblent être explicatives de la rareté des ressources alimentaires dans le milieu. [Yan et al \[158\]](#), ont observé un effet supplétif concernant l'inhibition de l'activité amylase chez la moule *Perna viridis* sous l'effet conjugué de l'absence de nourriture et de la présence de plomb dans le milieu. L'absence de nourriture affecte plus l'activité amylase que la présence du contaminant.

Ainsi, les activités protéase mesurées à la fin de cycle de décontamination (fig 5.24) semblent être le résultat du manque de ressources nutritionnelles en absence du polluant.

Les effets des contaminants sur les enzymes digestives peuvent également fluctuer en fonction de la température et du pH du milieu. Selon [Amiard et al \[08\]](#), la température est le facteur le plus influençant de la performance des enzymes digestives. Cependant différentes réponses des différentes enzymes digestives de bivalves ont montré des variations en fonction de la saison.

Le suivi de l'impact potentiel des contaminants sur les activités des enzymes digestives est un paramètre intéressant présentant une pertinence écologique forte. Ces activités enzymatiques jouent un rôle capital sur les processus d'assimilation de la nourriture. Une diminution de la digestion pourra conduire à une diminution de la croissance et de la reproduction avec un impact possible sur la sauvegarde de l'espèce. La mesure de ces variations d'activités enzymatiques a ainsi été considérée par plusieurs auteurs comme biomarqueur d'exposition [\[08\]](#).

5.2.3 Résultats des mesures biométriques

Des indices corporels (indice de condition, facteur de condition selon les sources) basés sur la mesure des masses et longueurs des organismes sont utilisés pour apprécier leur état de santé générale [\[120, 149, 160\]](#).

Dans notre étude, nous avons comparé les variations de la croissance à l'indice de condition des moules *Mytilus galloprovincialis* dans trois localités caractérisées par des gradients de contamination différents, dans la perspective d'étudier l'effet du degré de pollution sur la santé générale de nos spécimens. De plus la comparaison de la condition des individus contaminés avec ceux du site de référence ne semble pas être raisonnable. Le site de référence est une moulière naturelle dont différentes classes de tailles coexistent.

Les figures (5.25) et (5.26) représentent respectivement les variations de l'indice de condition (IC) et la croissance (longueur en cm) des moules transplantées dans les différentes localités de test en fonction de la période d'étude.

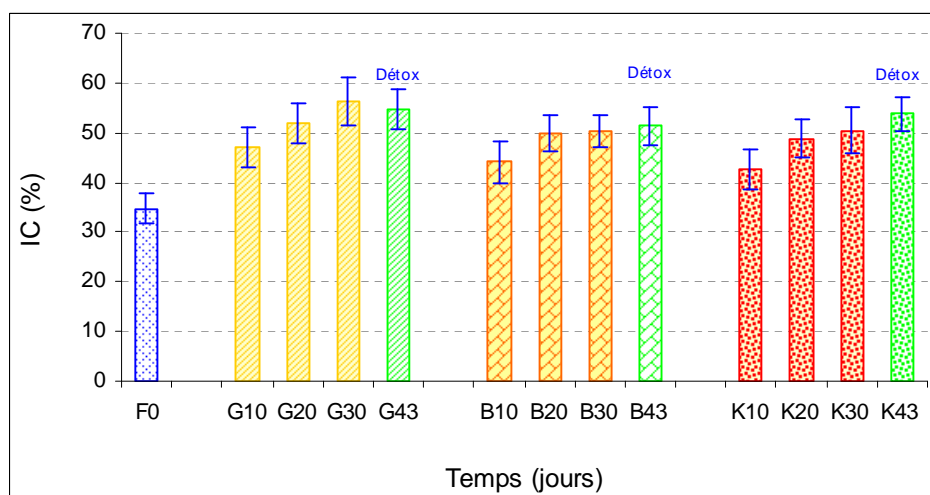


Figure 5.25 : Variation de l'indice de condition (IC) dans les différentes localités de tests en fonction du temps.

F0 : Site de référence, G : Port de Gouraya, B : Port de Bouharoune, K : Port de Khmisti.

Les valeurs de l'indice de condition (IC) exploitées dans la figure (5.25) montrent que le gain en poids chez les moules transplantées au niveau du port de Gouraya est supérieure à ceux de Bouharoune et Khemisti ($IC_{Gouraya} > IC_{Bouharoune} > IC_{Khemisti}$). Par ailleurs la variation de la croissance (longueur en cm) des moules illustrée dans la figure (5.26) montre que la taille des individus ne cesse d'augmenter pour les trois groupes de tests. Cependant la croissance des moules en fonction du site peut être classée comme suit : Croissance : Moules Gouraya > Moules Bouharoune > Moules Khemisti. Cet ordre est probablement lié au degré de pollution des sites portuaires.

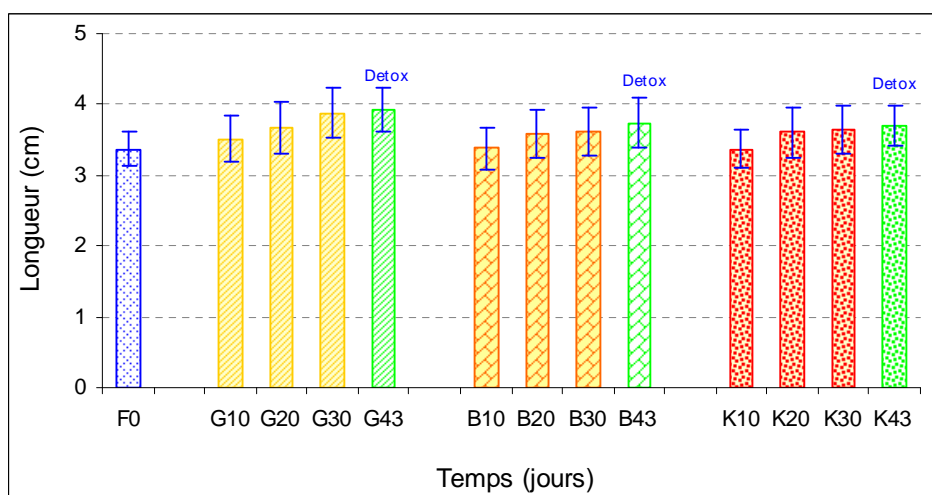


Figure 5.26 : Variation de la croissance des moules durant la période d'étude

F0 : Site de référence, G : Port de Gouraya, B : Port de Bouharoune, K : Port de Khmisti.

Chez *Mya arenaria*, mollusque bivalve intrasédimentaire, des diminutions de la condition sont observées chez des spécimens collectés sur des stations impactées par des effluents portuaires [161]. Chez la moule d'eau douce (*Dreissena polymorpha*), une diminution de la condition des organismes dans un estuaire multipollué est mesurée [162].

De fait, les conditions des moules (figs 5.25-26) ainsi discutées peuvent être liées aux déséquilibres de la balance énergétique, différente pour chaque groupe et cela en fonction du degré de pollution.

Les molécules toxiques entrent en interaction avec les molécules biologiques. Des lors, les organismes exposés développent divers mécanismes de défense : évitement et / ou isolement, élimination active, neutralisation par complexation avec des protéines etc [08]. Des études du métabolisme et de la production de biomasse chez les organismes exposés aux toxiques [129] ont mis en évidence que ces mécanismes de défense sont coûteux pour l'organisme en terme énergétique. Ces coûts de défense s'ajoutent aux coûts de maintenance : il existe donc une corrélation quantitative entre la capacité de défense de l'organisme (survie) et sa capacité de production de biomasse (croissance et reproduction).

Par ailleurs, l'allocation énergétique pour la défense, la réparation et la régénération des cellules est privilégié à la croissance et à la reproduction [129].

Chez les moules la stratégie d'évitement ou l'isolement n'étant pas possible, le recours aux enzymes antioxydantes semble être la meilleure stratégie pour faire face aux xénobiotiques. L'excrétion et la séquestration des métaux dans les tissus peuvent également intervenir. Cependant il est démontré que les premières réponses à la présence des contaminants sont celles liées au système antioxydant [69, 120, 150, 151].

Ainsi, les individus récupérés de la station de Khemisti ont montré un statut énergétique de défense (traduit par le degré d'induction CAT) plus important ce qui conduisit à une réduction de l'investissement énergétique pour la croissance des spécimens. Selon *Amiard et al* [08], les biomarqueurs de défense permettent aux organismes de lutter et de survivre en présence de polluants à des niveaux raisonnables mais ceci a un coût énergétique pour l'individu.

Par ailleurs, la fermeture des valves est un comportement connu chez les bivalves en réponse à la présence de métaux dans le milieu [18]. De ce fait, la diminution du volume d'eau filtré par les moules conduira à une diminution de capture de la nourriture ce qui aura un effet direct sur la prise énergétique. Conséquence : mauvaise croissance.

D'autre part, les atteintes de l'enzyme digestive Protéase par les polluants portuaires soit par voie trophique soit *via* l'eau, avaient probablement un effet sur l'efficacité de la conversion de l'énergie alimentaire en biomasse.

Ces indices ne sont pas des biomarqueurs au sens strict de la définition, mais ils sont mesurés en première intention car ils sont simples à réaliser, de faible coût et ils peuvent fournir des informations sur l'impact potentiel des polluants.

Des méthodes aussi simples sont disponibles pour quantifier la balance énergétique chez les bivalves à savoir : contenu calorique, investissement envers la

chaire, la coquille, les gamètes et le byssus. Dans un programme de biosurveillance de longue durée ces paramètres trouveront une très forte pertinence écologique.

Dans la présente étude, nous nous sommes également contentés d'étudier les différents paramètres métriques et pondéraux ainsi que leurs relations afin de révéler les paramètres les plus importants pouvant nous renseigner sur la croissance (l'état de santé général) de nos spécimens.

Les différents résultats des différentes relations allométriques (relation tailles-poids) des moules *Mytilus galloprovincialis* sont illustrées dans l'annexe (E).

En conclusion, la pratique des biomarqueurs, dans notre programme de surveillance de la présente étude, s'est avérée très intéressante de point de vue précocité de repose des signaux mesurés et leurs corrélations avec les niveaux de pollution. Ils peuvent en effet, constituer un complément évident des programmes de surveillance chimique en traduisant un risque pour les organismes des écosystèmes aquatiques. De ce fait, les différents biomarqueurs testés peuvent être employés et trouve encore forte pertinence écologique plus particulièrement dans le cas d'un programme de surveillance à long terme des milieux marin côtiers et estuariens.

Par ailleurs, l'intégration de ces variables biologiques dans un réseau pérenne de surveillance et mesures fournira aux gestionnaires des milieux aquatiques une meilleure information sur la tendance évolutive des milieux surveillés (signe de bonne gestion ou d'une dégradation), et permettra aux scientifiques de mieux comprendre le fonctionnement des systèmes étudiés.

CHAPITRE 6

MODILISATION DE LA BIOACCUMULATION

6.1 Introduction

Pendant des décennies, la pollution par les métaux traces a été un enjeu environnemental pour de nombreux pays développés et pays en développement. Ainsi, il y a un intérêt substantiel pour comprendre les phénomènes de la bioaccumulation et de la toxicité des métaux chez les organismes aquatiques. De telles études peuvent fournir des informations critiques sur l'évaluation des risques environnementaux de la présence des métaux dans les écosystèmes aquatiques. Actuellement, la préoccupation est vers la protection de la santé humaine suite à la consommation des produits de la pêche. En outre, les programmes de biosurveillance, qui emploient diverses espèces aquatiques afin de surveiller la pollution de l'environnement ont besoin d'une meilleure compréhension des processus de bioaccumulation des métaux dans le but d'interpréter les données générées par ces programmes [163].

Les approches fondées sur la modélisation apportent des outils pertinents et sont de plus en plus utilisées dans la recherche environnementale certainement grâce à la rapidité de calcul et à la convivialité graphique des logiciels informatiques [164].

De fait, et pour améliorer la pertinence des tests écotoxicologiques, plusieurs familles de modèles mathématiques (un modèle mathématique est une formulation graphique, symbolique ou numérique d'une série d'hypothèses établies de telle façon qu'elles puissent être traitées par des opérations mathématiques) ont été développés dans le but de mieux cerner le phénomène de la bioaccumulation. Elles se différencient principalement par leurs hypothèses quant à la cinétique toxique, par

la présence ou non d'hypothèses biologiques pour l'estimation des effets physiologiques du toxique et par le type de paramètre obtenu [05, 129].

Un modèle mathématique d'un écosystème peut être développé en quantifiant les interactions biogéochimiques en équations mathématiques et en mettant en relation ces équations par des programmes informatiques. Ce sont des outils importants pour formaliser les connaissances et pour valider des hypothèses incorporées dans celles ci. Ils nous aident à comprendre un processus en testant des théories mécanistiques.

En écotoxicologie, la modélisation permet, entre autres, de comprendre les effets des polluants sur la gestion de l'énergie par les organismes, ce qui permet une description quantitative des mécanismes de réduction de la croissance ou de la fécondité et une mise en relation entre eux des différents paramètres du cycle de vie [129, 164, 165, 166].

Par ailleurs, la modélisation s'est apparue ci derniers temps un outil incontournable pour mener a bien le changement d'échelle. Longtemps négligée, la modélisation du passage de l'individu à la population est en plein développement [164, 167, 168].

Est ce que notre théorie (traduite en équations mathématiques) est suffisante pour décrire le phénomène observé dans la réalité ? Le compromis entre la complexité et le réalisme du modèle est central pour tout exercice de modélisation. La plupart des modèles complexes peuvent être très réalistes, mais du fait de la considération de paramètres non-connus, il devient impossible de les valider. De tels modèles fournissent une légère compréhension du processus étudié mais ne permettent pas d'augmenter la confiance en une théorie. En effet, ils sont souvent confrontés à un manque de connaissances concernant les processus biologiques clés et leurs mécanismes qui ne peuvent pas être remplacés par des expertises mathématiques. Le dilemme en modélisation est de décrire le plus grand nombre de processus sans en sacrifier le réalisme et l'applicabilité [05].

6.2 Les modèles cinétiques à compartiments

Les modèles écotoxicologiques visent dans un premier temps à relier la concentration en toxique dans le milieu à sa concentration dans les tissus des organismes (concentration susceptible de générer un effet toxique). Cette première étape se réalise au moyen de modèles toxicocinétiques basés sur la chimie et la biologie des organismes. La seconde étape vise à l'estimation des effets engendrés par la présence de toxique dans les organismes. Cette étape nécessite des modèles d'effets biologiques, basés sur la physiologie [129].

L'approche dominante de modélisation en écotoxicologie se fait *via* les modèles à compartiments. Au fond, l'analyse commence par l'identification des compartiments, qui peuvent être n'importe quelle entité traitée de façon homogène au regard d'une entité transportée à partir ou vers ce compartiment. Pour être plus explicite, la focalisation se fait sur un problème écotoxicologique où les compartiments peuvent être une part de l'environnement (comme un lac ou un site expérimental), ou un organisme (comme un poisson ou un bivalve) ou une partie spécifique d'un organisme (comme l'estomac ou le soma). L'entité transportée est dans ce cas le contaminant. Le choix du compartiment ne dépend pas seulement du système décrit mais surtout de l'échelle spatiale et/ou temporelle du problème étudié. Par exemple, pour décrire le transfert de contaminants à travers une chaîne trophique, le poisson pourra être décrit comme un compartiment unique. Quand il s'agit des cinétiques de contamination dans un organe spécifique, il est nécessaire d'ajouter plus de compartiments pour décrire le système [05].

6.2.1 Concept et formulation du modèle

Généralement, on utilise un modèle toxicocinétique simple, dit modèle linéaire à un compartiment, réaliste de point de vue biologique (fig 6.1).

Un compartiment est un milieu homogène contenant un composé qui transite à travers ses limites avec simplement un taux d'entrée (k_{abs}) et un taux d'élimination ($k_{él}$). Ainsi, l'absorption du composé est supposée proportionnelle à sa concentration en solution, et son élimination proportionnelle à sa concentration interne [05, 164].

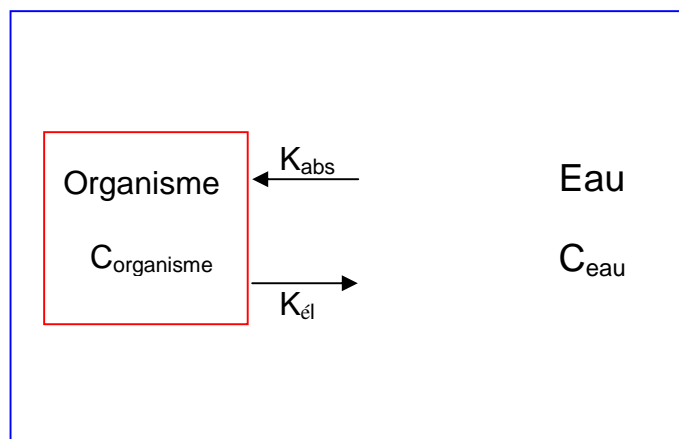


Figure 6.1: Schéma conceptuel type d'un modèle de bioaccumulation d'un organisme représenté par un seul compartiment.

L'organisme est donc représenté par un unique compartiment. Ainsi, l'équation d'évolution temporelle de la concentration en contaminant est [05, 49, 53, 164] :

$$\frac{dC_{organisme}}{dt} = K_{abs} \cdot C_{eau} - K_{él} \cdot C_{organisme} \quad (1)$$

Avec

- $C_{organisme}$: concentration en contaminant dans l'organisme ($\mu\text{g/g}$) ;
- C_{eau} : concentration en contaminant dans l'eau ($\mu\text{g/mL}$) ;
- K_{abs} : taux d'entrée du contaminant *via* l'eau (h^{-1}) ;
- $K_{él}$: taux de sortie du contaminant (h^{-1}).

La concentration en contaminant dans l'organisme ($C_{organisme}$) résulte de la balance nette de la capture de contaminant *via* l'eau ($K_{abs} \cdot C_{eau}$) et de l'élimination à partir de l'organisme ($K_{él} \cdot C_{organisme}$). A l'état d'équilibre on obtient :

$$C_{organisme} = \frac{K_{abs} \cdot C_{eau}}{K_{él}} \quad (2)$$

L'équations illustrant l'absorption et l'élimination en fonction du temps est donc la suivante :

$$C_{organisme(t)} = \frac{K_{abs} \cdot C_{eau}}{K_{\acute{e}l}} [1 - \exp(-K_{\acute{e}l} \cdot t)] \quad (3)$$

A l'entrée sous forme dissoute peut être ajoutée une entrée du contaminant sous forme particulaire ($k_p \cdot C_{nourriture}$) avec k_p : taux d'entrée du contaminant *via* les particules, et $C_{nourriture}$: concentration en contaminant sur les particules ou la nourriture. Le model peut être exprimé comme suit [05, 11] :

$$\frac{dC_{organisme}}{dt} = K_{abs} \cdot C_{eau} + K_p \cdot C_{nourriture} - K_{\acute{e}l} \cdot C_{organisme} \quad (4)$$

A l'état d'équilibre on obtient :

$$C_{organisme} = \frac{K_{abs} \cdot C_{eau} + K_p \cdot C_{nourriture}}{K_{\acute{e}l}} \quad (5)$$

L'équations illustrant l'absorption et l'élimination en fonction du temps étant donc la suivante :

$$C_{organisme(t)} = \frac{K_{abs} \cdot C_{eau} + K_p \cdot C_{nourriture}}{K_{\acute{e}l}} [1 - \exp(-K_{\acute{e}l} \cdot t)] \quad (6)$$

6.2.2 Phénomènes généraux

Les différents mécanismes rencontrés dans les milieux naturels sont illustrés dans la figure VI.2, ci-dessous.

❖ Bioconcentration

Le facteur de bioconcentration (FBC) d'un élément trace dans l'organisme est le ratio de la concentration de l'élément dans l'animal sur celle dans l'eau [05, 11, 46, 48, 49, 50, 166]. Le FBC a l'état d'équilibre est défini comme suit :

$$FBC = \frac{C_{organisme}}{C_{eau}} = \frac{K_{abs}}{K_{\acute{e}l}} \quad (7)$$

Avec :

- FBC : facteur de bioconcentration (ml/g) ;
- $C_{\text{organisme}}$: concentration en contaminant dans l'organisme ($\mu\text{g/g}$) ;
- C_{eau} : concentration en contaminant dans l'eau environnante ($\mu\text{g/ml}$).

Selon [Mackay et al \[45\]](#), le FBC peut être également défini comme :

$$FBC = \frac{C_{\text{organisme}}}{C_{\text{eau}}} \quad \text{ou bien} \quad \frac{C_{\text{organisme}}}{C_{(\text{eau})_d}} \quad (8)$$

Avec

- $C_{(\text{eau})_d}$: la concentration de l'élément dissout dans l'eau à l'état d'ion libre (la fraction la plus biodisponible).

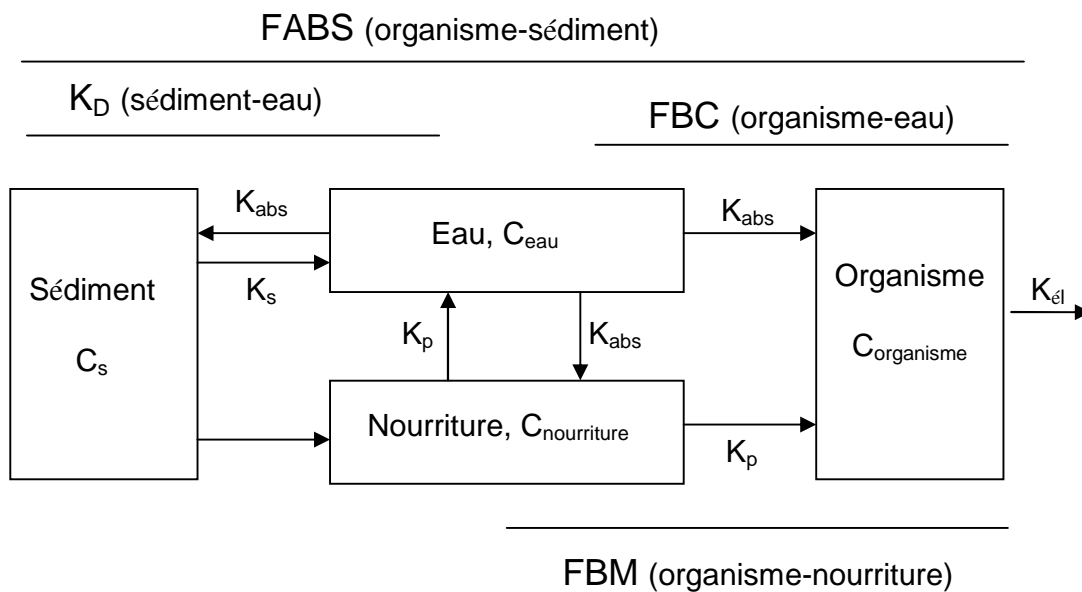


Figure 6.2 : Modèle de bioaccumulation chez les organismes aquatiques [11].

❖ Bioamplification

Dans le cas de capture des micropolluants *via* la nourriture, un facteur de bioamplification ou de biomagnification (FBM) peut être défini comme le rapport

entre la concentration de l'élément trace dans l'organisme ($C_{\text{organisme}}$) sur celle dans sa nourriture ($C_{\text{nourriture}}$) (proies-prédateur) [05, 11, 45, 46, 47, 49, 166].

Il est exprimé comme suit :

$$FBM = \frac{C_{\text{organisme}}}{C_{\text{nourriture}}} = \frac{K_p}{K_{\text{él}}} \quad (9)$$

Un problème survient en définissant le FBA quand l'organisme aura plusieurs sources d'aliment avec un degré de contamination différent. La fraction chimique bioaccumulée n'est pas nécessairement bioamplifiée [45].

D'après Zaldivar [166], La bioaccumulation se réfère à l'absorption de polluants *via* toutes les sources de l'environnement y compris l'eau, la nourriture et le sédiment. En faveur de la simplicité, le facteur de bioaccumulation (FBA) peut être exprimé à l'état d'équilibre par le ratio de la concentration d'une substance chimique dans un organisme sur sa concentration dans le milieu environnant (par exemple dans l'eau). Elle peut être ainsi évaluée en utilisant une approche multiplicative. Par conséquent,

le facteur de bioaccumulation (FBA) se calcule comme suit:

$$FBA = FBC \cdot \prod_{i=1}^n FBM_i \quad (10)$$

Où le nombre de facteurs de bioamplification dépend du niveau trophique ou la position des organismes dans la chaîne alimentaire.

D'une manière générale, la biodisponibilité d'un polluant dépend des formes chimique dans lesquelles il se trouve dans le milieu, ou des niveaux d'association qu'il a pu développer avec d'autres constituants du milieu, le rendant plus ou moins accessible aux organismes. Il est donc nécessaire de pouvoir décrire sous quelles formes le polluant se trouve dans le milieu.

❖ Partition eau-sédiment

Les premières études de répartition des polluants dans le milieu aquatique ont été conduites dans les sédiments, où se concentrent la majorité des polluants. Le plus simple des modèles proposés pour décrire les interactions entre particules et éléments traces consiste à considérer que les polluants se partagent entre deux phases, l'eau et les sédiments [53]. Dans un système à l'équilibre, on définit alors une constante de partage K_D :

$$K_D = \frac{C_{\text{sédiment}}}{C_{\text{eau}}} = \frac{K_{\text{eau}}}{K_{\text{séd}}} \quad (11)$$

Où

- $C_{\text{sédiment}}$: concentration en élément chimique sur la phase solide mg/Kg,
- C_{eau} : concentration en élément chimique dans la phase liquide mg/l.

Si les processus de bioaccumulation et de partition eau-sédiment atteignent un équilibre, la combinaison des équations (8) et (11) définit le facteur d'accumulation biote-sédiment (BSAF : Biota sediment accumulation factor).

$$FABS = \frac{C_{\text{organisme}}}{C_{\text{sédiment}}} = \frac{FBC}{K_D} \quad (12)$$

6.3 Influence de la matière organique sur la biodisponibilité et la bioaccumulation des éléments traces

La notion de biodisponibilité se situe à l'interface entre le milieu et l'organisme. Elle dépend à la fois du polluant, de son devenir dans l'environnement et de la physiologie de l'organisme exposé. On peut distinguer trois manières complémentaires d'estimer la biodisponibilité d'un polluant :

- L'une, chimique, consiste à estimer la répartition du contaminant dans le milieu (« spéciation » pour les métaux) et à faire une hypothèse de biodisponibilité sur chacune des formes chimiques que prend le contaminant.

- La seconde, biologique, consiste à mesurer la concentration en polluant accumulé dans un organisme au cours de l'exposition. La bioaccumulation reflète la concentration biodisponible dans le milieu.
- La troisième, biologique, consiste en la mesure de la réponse toxique d'un organisme (ou d'une population) à une exposition. Cette réponse biologique est alors le reflet de la concentration biodisponible du polluant.

Dans l'eau, il est généralement admis que la présence des matières organiques (MO) réduit la biodisponibilité des éléments traces (ET). L'hypothèse explicative est que le complexe formé par l'association MO-ET est trop gros et trop polaire pour traverser les membranes biologiques [53]. Il est par conséquent rendu indisponible pour l'accumulation dans l'organisme.

6.3.1 Répartition dans le milieu

Dans un système multi-phases, les interactions entre matière organique dissoute (MOD), matière organique particulaire (MOP) et les polluants peuvent être représentées par la Figure (6.3) ci-dessous : à l'équilibre, les interactions entre les différents compartiments sont représentées par des coefficients de partition (K_{DD}) pour la MOD et (K_{DP}) pour la MOP. D'un point de vue mécaniste, les interactions directes entre les différentes formes fixées (sur MOD et sur MOP) sont souvent négligées [53].

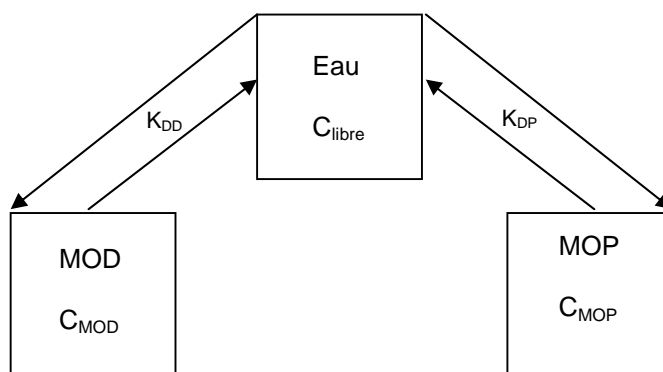


Figure 6.3 : schéma de répartition d'un élément trace dans l'environnement aquatique.

On a donc les concentrations du polluant dans l'eau sous formes libre (C_{libre}), fixée sur les MOD (C_{MOD}) et fixée sur les MOP (C_{MOP}).

À l'équilibre on peut définir le coefficient de partition K_{DD} , et K_{DP} comme suit :

$$K_{DD} = \frac{C_{MOD}}{C_{libre}} \quad (13)$$

$$K_{DP} = \frac{C_{MOP}}{C_{libre}} \quad (14)$$

Avec :

- C_{MOD} : concentration dans l'eau de l'élément trace fixé sur la MOD (en ng/L)
- C_{libre} : concentration dans l'eau de l'élément trace véritablement dissous «libres» (en ng/L)
- C_{MOP} : concentration dans l'eau de l'élément trace fixé sur la MOP (en ng/g)

Si on considère que : $C_{tot} = C_{libre} + C_{MOD} + C_{MOP}$, on obtient ainsi :

$$C_{libre} = \frac{C_{tot}}{1 + K_{DD} + K_{DP}} \quad (15)$$

$$C_{MOD} = \frac{C_{tot} \cdot K_{DD}}{1 + K_{DD} + K_{DP}} \quad (16)$$

$$C_{MOP} = \frac{C_{tot} \cdot K_{DP}}{1 + K_{DD} + K_{DP}} \quad (17)$$

Les constantes K_{DD} et K_{DP} décrivent un équilibre de partage et non un mécanisme chimique unique. L'équilibre est une intégration de réactions physico-chimiques très variées et encore mal connues [40] : échange d'ions, transfert de charges, adsorption hydrophobe puis diffusion vers l'intérieur de la matière organique, liaisons covalentes, liaisons hydrogène... La contribution de chacune de ces interactions à la constante de partition n'est pas quantifiable du fait de la complexité et de la méconnaissance de la structure de la matière organique [53].

L'impact de la matière organique particulaire sur la biodisponibilité des éléments traces est plus ambigu. La MOP a une forte capacité de fixation des éléments traces, et par conséquent peut avoir un rôle protecteur en limitant l'accumulation directe par respiration [05, 70]. A l'opposé, certaines MOP constituent la source de nourriture des organismes, ce qui peut conduire à une accumulation par voie trophique [05, 18]. Ainsi, le captage de cette matière par les organismes peut conduire à une amplification de la bioaccumulation. Le modèle toxicocinétique peut être donc décrit comme suit [53] :

$$\frac{dC_{organisme}}{dt} = K_{abs} \cdot C_{eau} + K_p \cdot C_{MOP} - K_{él} \cdot C_{organisme} \quad (18)$$

L'intégrale de l'équation (18) donnera donc :

$$C_{organisme} = \frac{K_{abs} \cdot C_{eau} + K_p \cdot C_{MOP}}{K_{él}} [1 - \exp(-K_{él} \cdot t)] \quad (19)$$

$$C_{organisme} = \left[\frac{K_{abs}}{K_{él}} \frac{C_{tot}}{1 + K_{DD}} + \frac{K_p}{K_{él}} \frac{K_{DP} \cdot C_{tot}}{1 + K_{DD}} \right] \cdot [1 - \exp(-K_{él} \cdot t)] \quad (20)$$

$$C_{organisme} = \frac{C_{tot}}{1 + K_{DP}} \frac{K_{abs}}{K_{él}} \left[1 + \frac{K_p \cdot K_{DP}}{K_{abs}} \right] [1 - \exp(-K_{él} \cdot t)] \quad (21)$$

$$C_{organisme} = \frac{C_{tot}}{1 + K_{DP}} \frac{K_{abs}}{K_{él}} \left[\underbrace{1}_{\text{Contact direct}} + \underbrace{\frac{K_p \cdot K_{DP}}{K_{abs}}}_{\text{Voie trophique}} \right] [1 - \exp(-K_{él} \cdot t)]$$

La contribution relative de la voie trophique dans la contamination s'évalue donc par

le produit : $\frac{K_p}{K_{abs}} K_{DP}$

6.4 Les modèles cinétiques à base physiologique

6.4.1 Généralités

Les modèles cinétiques à base physiologique ont été développés pour évaluer la bioaccumulation des contaminants [05]. Dans cette deuxième approche encore plus pertinente, les différents mécanismes de capture et d'élimination de toxiques sont quantifiés et introduit dans le model. Ainsi, l'acquisition d'un plus de données et d'information sur les propriétés chimiques des contaminants et sur la physiologie des organismes capteurs à savoir la respiration l'alimentation et l'efficacité d'absorption et d'assimilation sont nécessaires pour accomplir le model biodynamique. Encore, ces modèles ont l'avantage d'introduire l'effet de la dilution par croissance et les taux du métabolisme spécifique des organismes [45]. Ces modèles sont très flexibles et applicables à des environnements variés. Ils peuvent être utilisés dans l'interprétation de données de surveillance et pour prédire les niveaux de contamination des individus [05].

6.4.2 Concept et formulation du modèle

D'après Mackay *et al* [45], il y a trois voies possibles de capture et six mécanismes d'élimination ou de perte de polluant chez la majorité des organismes (ex :poisson) (fig 6.4).

Tous les organismes hétérotrophes obtiennent l'oxygène par la respiration de l'air ou de l'eau. Cette respiration peut avoir comme conséquence la prise et l'élimination des éléments traces, habituellement par un procédé passif de diffusion [05, 11, 45]. Il peut également y avoir échange dermique cutané ou extérieur. Pour les petits animaux, ceci peut être un itinéraire important de prise ou d'élimination mais pour les plus grands animaux il est moins important [45]. Par ailleurs, on présence de contaminants dans le milieu, les organismes (poissons et moules) ont développé une stratégie de défense active en produisant ou en sécrétant le mucus limitant ainsi la pénétration des xénobiotique [08].

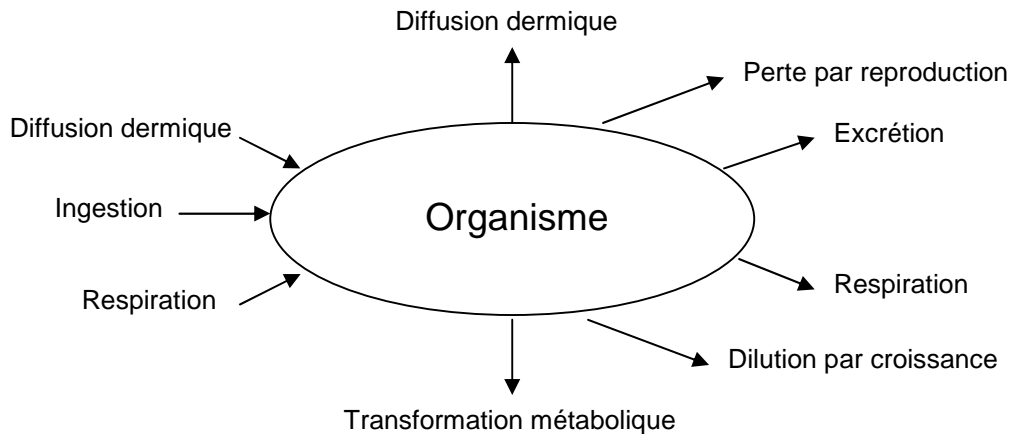


Figure 6.4 : Capture et élimination des micropolluants chez les organismes [45]

L'autre voie importante de prise est l'ingestion de nourriture comme source d'énergie, par distraction le contaminant chimique est donc retenu [45].

La bioaccumulation des métaux par les organismes aquatiques peut également être contrôlée par leur excrétion à travers le tractus alimentaire sous forme de fèces pour la décontamination métallique [05, 18, 45]. La conversion métabolique de la substance en autre espèce chimique habituellement plus oxygénée et plus hydrosoluble dans l'intestin ou autres organes internes notamment le foie. Il peut également y avoir réduction apparente de la concentration par la croissance (pour une concentration interne constante, l'augmentation du volume conduira à une dilution de cette dernière dans le tissu). Chez les animaux femelles, l'élimination des xénobiotiques accumulés peut avoir lieu suite à la reproduction. Ces pertes maternelles représentent, naturellement, la prise par la progéniture [45].

Le modèle descriptif illustré au-dessus (fig 6.4), peut être donc formulé comme suit :

$$\frac{dC_{organisme}}{dt} = K_{abs} C_{eau} + K_p C_{nourriture} - (K_{rés} + K_{exc} + K_{mét} + K_{cr}) C_{organisme} \quad (22)$$

Avec :

- $K_{rés}$: taux d'élimination du contaminant *via* la respiration (h^{-1}) ;

- K_{exc} : taux d'élimination du contaminant par excrétion (h^{-1}) ;
- $K_{mét}$: taux d'élimination du contaminant par transformation métabolique (h^{-1}) ;
- K_{cr} : taux de croissance (h^{-1}).

6.4.2.1 Modèle descriptif chez les poissons

chez les poisson le modèle de bioaccumulation est généralement décrit comme suit (fig 6.5) :

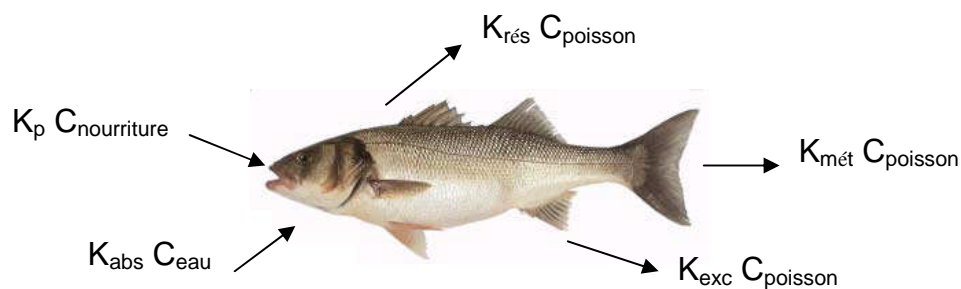


Figure 6.5 : Mécanismes de capture et d'élimination chez les poissons

Le modèle cinétique peut être ainsi décrit par l'équation suivante :

$$\frac{dC_{poisson}}{dt} = K_{abs} C_{eau} + K_p C_{nourriture} - (K_{rés} + K_{exc} + K_{mét} + K_{cr}) C_{poisson} \quad (23)$$

A l'équilibre on définit :

$$C_{poisson} = \frac{K_{abs} C_{eau} + K_p C_{nourriture}}{K_{rés} + K_{exc} + K_{mét} + K_{cr}} \quad (24)$$

Les constantes cinétiques d'une réaction du 1^{er} ordre sont exprimées en $temps^{-1}$ (s^{-1} , h^{-1} , j^{-1} ...). Cependant, les scientifiques préfèrent d'introduire les propriétés traduisant les processus biologiques (ex : respiration, ingestion...), ainsi les constantes de vitesse peuvent être exprimées par des unités ($l/Kg/temps^{-1}$).

❖ Capture via les branchies (K_{abs})

Dans la littérature, plusieurs formules sont disponibles pour estimer le K_{abs} . D'après Sarah B et al [125], la capture via les branchies K_{abs} , peut être calculée comme suit :

$$K_{abs} = \frac{B_v E_w}{P} \quad (25)$$

Où B_v est le taux de ventilation des branchies des poissons (litre d'eau/h), E_w est l'efficacité d'assimilation via l'eau (sans dimension) (E_w est estimé égale a 80% [45]), et P le poids du poisson en (kg poids frais).

Le taux de ventilation des branchies (B_v) se produit à un taux nécessaire pour fournir suffisamment d'oxygène pour maintenir le métabolisme de base. Il est estimé par l'équation suivante :

$$B_v = \frac{M_T}{E_{ox} C_{ox}} \quad (26)$$

Où M_T est le métabolisme énergétique totale, ou le métabolisme requis pour l'activité normale des poissons exprimés en fonction de la consommation d'oxygène (mg O₂ consommés/h), E_{ox} est le rendement moyen du transfert d'oxygène à travers les branchies (sans dimension), et C_{ox} est la concentration d'oxygène dissous (mg O₂/l d'eau).

Dans la littérature plusieurs modèles sont disponibles pour estimer la valeur de M_T , on a cependant recourus aux modèles bioénergétiques que nous les avons déjà utilisé. De même il y a des modèles qui tiennent comptes des conditions trophiques ainsi que les conditions en nage forcée.

En général, le métabolisme énergétique de l'oxygène peut être estimé par la relation

$$M_r = a P_m^b \quad (27)$$

Dans le cas du poisson tilapia les valeurs de a et b sont estimées égales à (0,48) et (0,7502) respectivement [].

Par ailleurs, d'autres relations intègrent l'effet de la température dans l'estimation du taux de métabolisme d'oxygène [125].

Les valeurs mesurées de E_{ox} pour les poissons sont très variables. Cependant, la plupart des mesures se situent entre 50% et 80%. Ainsi, le taux de 65% peut être pris comme moyenne dans les calculs [125]. Le E_{ox} étant indépendant de la température.

L'oxygène dissout (C_{ox}) peut être mesuré expérimentalement (dans le cas de tests en laboratoire et/ou in situ), ou bien estimé par plusieurs type de relation qui tient compte de l'effet de la température sur la saturation des milieu aquatiques en oxygène. Dans les milieux marins en tient compte également de l'effet de la salinité sur le degré de saturation en oxygène. Les différentes formules sont décrites dans [85,125, 169, 170].

Par ailleurs, John W et al [52], Mackay et al [45], préconisent ou prévoient d'utiliser d'autres formule dans le calcul de B_v (en l/j).

$$B_v = \frac{1400 P^{0,65}}{C_{ox}} \quad (28)$$

Ainsi, le C_{ox} dans cette formule est fonction de la température (T) et du degré de saturation en oxygène (S).

$$C_{ox} = (-0,24 T + 14,04)S \quad (29)$$

❖ Elimination via les branchies

Pour une première approximation, k_{abs} est une propriété des poissons, tandis que $k_{rés}$ est une fonction de k_{abs} et du FBC []. Le $k_{rés}$ peut être donc estimé de la relation (08) définissant le FBC, donc :

$$K_{rés} = \frac{FBC}{K_{abs}} \quad (30)$$

❖ Capture via la nourriture

La constante de vitesse d'absorption de contaminants *via* la nourriture est :

$$K_p = \frac{G_n E_n}{P} \quad (31)$$

Où G_n est le taux d'alimentation des poissons (kg nourriture humide/h) et E_n l'efficacité du transfert de produits chimiques à travers la paroi de l'intestin (efficacité d'assimilation *via* la nourriture) (sans dimension).

Les taux d'alimentation des poissons ont été décrits par des modèles de différents niveaux de complexité. On peut cependant utiliser de simple modèles à base bioénergétiques [125].

$$G_n = 9,2 \times 10^{-4} P^{0,85} \exp(0,06T) \quad (32)$$

L'efficacité d'assimilation *via* la nourriture E_n , peut être estimée égale à 50%. Certains auteurs suggèrent que la prise des contaminants à travers le tractus gastro-intestinal est commandée principalement par la diffusion. Comme pour le cas de E_w , le E_n est indépendante de la température [125].

❖ Elimination par excrétion fécale (k_{exc})

Dans le cas de capture des éléments traces par voie trophique, la constante K_{exc} peut être déterminée de l'équation (09) définissant le *FBM* [52, 172]. Cependant et d'après Mackay *et al* [45], la détermination du *FBM* n'étant pas facile. Dans une étude de l'influence de la matière organiques sur les processus de bioaccumulation, Gourlay [53] confirme encore la complexité des interaction conduisant généralement à des valeurs différentes.

Selon Sarah B *et al* [125], La constante K_{exc} peut être exprimée comme suit :

$$K_{exc} = \frac{G_f}{P K_{DG}} \quad (33)$$

Où G_f est le taux d'égestion fécale (kg poids frais/h) et K_{DG} le coefficient de partage du contaminant entre l'organisme et l'aliment dans le tractus gastro-intestinal GIT.

❖ Transformation métabolique

Généralement le $K_{mét}$ est négligeable devant les autres processus de détoxification dans le cas des polluants persistants [125]. Ainsi, la détermination du $K_{mét}$ *in vivo* n'étant pas possible du fait que l'ensemble des processus physiologiques d'élimination coexiste [45, 125]. Cependant, JT Smith *et al* [52], Christina *et al* [51], ont adopté l'approche indirecte afin d'estimer le rôle du foie dans la biotransformation des xénobiotiques. Ils commencèrent par des tests réalisés *in vitro*, sur la fraction S9 et l'hépatocyte pour estimer l'activité des enzymes responsables de la biotransformation métabolique. Par la suite ils transformèrent les résultats obtenus *in vitro* pour prévoir le mécanisme *in vivo*.

L'activité des enzymes métaboliques peut être caractérisée par une relation cinétique de type Michaelis Menten [52] :

$$V = \frac{V_{\max} C_s}{K_m + C_s} \quad (34)$$

Avec :

- V : taux ou vitesse de la réaction ;
- M_{\max} : taux ou vitesse maximale pouvant être atteinte par l'enzyme quand cette dernière est complètement saturée par le substrat ;
- C_s : concentration du substrat ;
- K_m : concentration du substrat à $\frac{1}{2} V_{\max}$.

La cinétique du métabolisme est d'ordre zéro quand les concentrations en substrat sont élevées et de premier ordre quand les concentrations en substrat sont basses. Dans des conditions linéaires, quand $C_s \ll K_m$ l'équation (34) se simplifie :

$$V = \frac{V_{\max} C_s}{K_m} \quad (35)$$

Par convention, le taux de réaction V peut être lié à C_s en utilisant une constante de proportionnalité nommée *in vitro* "intrinsic clearance" ($CL_{in vitro, int}$) lequel est une mesure pure de l'activité enzymatique envers un composé:

$$V = CL_{in vitro, int} C_s \quad (36)$$

Par substitution de l'équation (35) dans l'équation (36) on obtient :

$$CL_{in vitro, int} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad (37)$$

Selon [JT Smith et al \[52\]](#), Ces dernières années, les recherches ont frayé une approche alternative pour estimer $CL_{in vitro, int}$ basé sur le taux d'épuisement de substrat. Les expériences sont conduites aux faibles concentrations. Le $CL_{in vitro, int}$ peut alors être estimé à partir de la pente de la courbe d'épuisement de substrat. Les avantages de cette approche sont plusieurs :

- Elle n'exige pas une caractérisation cinétique formelle à différentes concentrations en substrat, une concentration est suffisante, à condition que ce soit $\ll K_m$;
- L'identité des produits métabolique n'a pas besoin d'être connus;
- Les méthodes de quantification de métabolite ne sont pas exigées;
- La valeur du $CL_{in vitro, int}$ reflète toutes voies contribuant à la métabolisation des substance chimiques mère (supposant que les enzymes responsables de cette activité sont présentes dans les tests d'essai *in vitro*).

Dans la deuxième étape de cette stratégie, des facteurs d'extrapolation sont utilisés pour convertir le $CL_{in vitro, int}$ exprimé en unités appropriées des tests *in vitro* aux unités d'écoulement par gramme de foie intact. Cette valeur est alors multipliée par le rapport du poids de foie exprimé en g foie/kg poisson pour obtenir une valeur intrinsèque *in vivo* "intrinsic clearance" ($CL_{in vivo, int}$), avec des unités d'écoulement (de sang), normalisée au poids de poissons.

Par exemple, l'activité enzymatique microsomale est typiquement exprimée par des concentrations en pmol/min/mg protéine et les concentrations en substrat

sont données en $\mu\text{mole/l}$. La division donne : $CL_{\text{in vitro,int}}$ avec des unités $\mu\text{Lsolution microsomale /min/mg protéine}$ [52].

Les facteurs d'extrapolation employés pour convertir cette valeur en $CL_{\text{in vivo, int}}$ sont $\text{mg protéines/g foie}$ et $\text{g foie/kg poissons}$, et les unités résultantes sont $\mu\text{L(foie) /min/kg poisson}$.

La troisième étape dans la stratégie est de convertir le $CL_{\text{in vivo, int}}$ en évaluation du (CL_h) (*in vivo* hépatique clearance). Le $CL_{\text{in vivo, int}}$ peut être vu comme limite supérieure du CL_h . Le plus simple des modèles employés peut être exprimé comme suit [52, 125] :

$$CL_h = \frac{Q_h f_u CL_{\text{in vivo,int}}}{(Q_h + f_u CL_{\text{in vivo,int}})} \quad (38)$$

Où Q_h est le débit de sang de foie ($0 < f_u < 1$).

Selon Christina et al [51], le Q_h peut être calculé par la relation suivante :

$$Q_h = CO \times LF \quad (39)$$

CO est le débit cardiaque, et LF la fraction de l'écoulement de sang qui passe à travers le foie du poisson.

Chez les poissons, le débit cardiaque est fonction de l'espèce, son activité dynamique et la température. Il varie de 5 à 100ml/min/Kg (ex : $CO(\text{Carpe})=19,7$; $CO(\text{Trout})=34,5$). Ainsi, le LF est estimé entre 1,9 et 2,3% (ex : $LF(\text{Carpe})=LF(\text{Trout})=2,9\%$) [51].

Selon le modèle décrit par l'équation (38) : si $Q_h \gg CL_{\text{in vivo,int}}$; le CL_h égalera approximativement : $f_u CL_{\text{in vivo,int}}$. La métabolisation de tels composés serait la " capacité limitée " par l'activité du système enzymatique. En revanche, le cas où $CL_{\text{in vivo,int}} \gg Q_h$; le dégagement hépatique de tels composés sera limité en raison de sa dépendance à l'égard de l'écoulement de sang vers le foie.

L'étape finale consiste à estimer le taux ou la constante de transformation métabolique $K_{mét}$ (j^{-1}), afin de déterminer comment l'élément chimique sera distribué du sang à d'autres tissus, en utilisant le volume de distribution, V_d . []

$$K_{mét} = \frac{CL_h}{V_d} \quad (40)$$

il y a aucune méthode facile pour estimer le V_d . Cependant, l'approche des méthodes prédictives estime un V_d compris entre 5 et 5,4 pour n'importe qu'elle polluant facilement bioaccumulable [51].

Les valeurs de V_d pour la truite sont étendues approximativement 3,0 –5,7.

❖ Croissance

La constante de vitesse de dilution par la croissance (k_{cr}) peut être définis comme suit :

$$K_{cr} = \frac{dP}{P \times dt} \quad (41)$$

La croissance des espèces étant dépendante de l'espèce et des conditions environnementales. Ainsi, le taux de croissance peut être facilement déterminé par plusieurs données de mesures de la croissance. Toutefois, en absence de données de mesures, une équation dérivée a été établie servant de fait a estimer un taux de croissance approprie [125].

$$k_{cr} = 0,00586 (1,113)^{T-20} \times (P \times 1000)^{-0,2} \quad (42)$$

6.4.2.2 Concept et formulation du modèle chez la moule

Les bivalves marins sont exposés aux éléments traces par l'intermédiaire de la phase dissoute (filtration) et de la phase particulaire (ingestion) [05, 18] :

La variation de l'accumulation chez les bivalves (C_{moule}) peut être ainsi décrite comme suit :

$$\frac{dC_{moule}}{dt} = K_{abs} C_{eau} + K_p C_{nourriture} - K_{él} C_{moule} \quad (43)$$

A base physiologique, le modèle peut être développée de la façon suivante [05] :

$$\frac{dC_{moule}}{dt} = (\alpha_w \cdot FR) C_{eau} + (EA \cdot IR) C_{nourriture} - (K_d + K_g) C_{moule} \quad (44)$$

Avec :

- α_w : efficacité d'assimilation *via* l'eau (sans unité) ;
- FR : taux de filtration (h^{-1}) ;
- EA : efficacité d'assimilation *via* la nourriture ;
- IR : taux d'ingestion (h^{-1}) ;
- K_d : taux d'élimination (h^{-1}) ;
- K_g : taux de croissance de l'organisme (h^{-1}).

Quant l'organisme aura plusieurs sources d'aliment avec un degré de contamination différent, le modèle peut prendre en compte les différents types de nourriture :

$$\frac{dC_{moule}}{dt} = (\alpha_w FR) C_{eau} + \left(\sum_{j=1}^n EA_j IR_j C_{(nourriture)_j} \right) - (K_d + K_g) C_{moule} \quad (45)$$

Les extensions peuvent avoir lieu sur les paramètres impliqués (EA et IR), chacun pouvant être hautement dépendants des conditions physiologiques et environnementales.

CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail était de mettre au point et de montrer l'intérêt d'utiliser des outils biologiques (bioindicateurs, biomarqueurs) dans le cadre du suivi de l'environnement et de la santé des écosystèmes aquatiques lors d'expériences *in vivo* et *in situ*.

A ce propos, le test de toxicité chronique avait pour objectif d'examiner l'effet du cuivre (Cu^{2+} à 1mg/l) sur la biométrie et les activités métaboliques traduisant l'état de santé du poisson « Tilapia, *Oréochromis niloticus* ». Des résultats se dégagent les éléments suivants :

- L'excrétion azotée s'est montrée fortement dépendante de la concentration ammoniacale ambiante. Néanmoins, l'étude de l'excrétion en fonction du temps s'est avérée intéressante, car on a relevé une perturbation des réponses métaboliques suivi par une diminution de la production de l'azote ammoniacal chez les individus stressés.
- Le retard de croissance mesuré chez les poissons contaminés est le résultat direct d'un déséquilibre de la balance énergétique et de la diminution de la prise alimentaire. Par ailleurs, la durée de détoxification était probablement insuffisante pour que les poissons puissent reprendre leur état d'équilibre énergétique.
- l'augmentation du foie des poissons pourrait être associée à la simulation d'activités enzymatiques hépatiques. Ainsi le rapport RHS peut rendre compte d'un stress apporté par des micropolluants, le foie étant l'organe majoritairement impliqué dans la détoxification des xénobiotiques [77, 78, 103, 127] . Son utilisation est ainsi intéressante en accompagnement de la mesure des activités enzymatiques.
- Les paramètres biométriques (TCS, RHS, RGS) 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 [77, 103, 127].

- Dans une perspective de synthèse des résultats des mesures biochimiques des biomarqueurs catalase et protéase, on peut dire que l'augmentation des dépenses énergétiques allouées à la défense traduite par l'induction de l'enzyme antioxydante CAT ainsi que la perturbation de l'enzyme digestive protéase sont à l'origine de l'atteinte de la biométrie et du métabolisme bioénergétique suite à l'exposition au xénobiotique (Cu^{2+}). De ce fait, une forte pertinence est accordée à ces deux biomarqueurs comme signal précoce de la dégradation de l'état de santé des organismes indicateurs ce qui donne aux gestionnaires de l'environnement une information sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer la qualité des écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des milieux avant que les effets soient perceptibles à des niveaux supérieurs aboutissant en phase finale à une dégradation de la qualité écologique d'un écosystème dans sa totalité.

L'objectif des tests courtes durées était d'étudier la cinétique de réponse des différents biomarqueurs discutés dans le test chronique. Cependant, cette fois ci, les réponses ont été relevées sous l'effet des métaux traces : Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} et le mélange polymétallique de tous ces derniers, à des concentrations de 0,5 ; 1 et 1,5mg/l. L'étude a apporté les résultats suivants :

- Du point de vue cinétique de réponse, l'excrétion azotée ne semble pas être très pertinente. Cependant, pour des durées d'exposition longues cette mesure s'avère très intéressante en traduisant l'atteinte du métabolisme bioénergétique des spécimens contaminés.
- la tendance générale de l'atteinte des réserves énergétiques était une diminution des taux du glucose avec une constance des réserves en protéines. De ce fait, la cinétique de réponse des réserves en glucose est très pertinente que celle relative aux protéines.
- En général différentes réponses de l'activité CAT ont été relevées sous l'effet des différents agents métalliques. Ainsi, l'induction enzymatique s'est avérée dépendante de la nature du polluant testé. Par ailleurs, certains xénobiotiques ont montré des atteintes de cibles préférentielles comme se fut le cas du cuivre au niveau des branchies par exemple.

- Du point de vue cinétique de réponse, la protéase ne paraît pas être pertinente au même rang que la catalase.

En conclusion, les systèmes de défenses antioxydants (ex CAT) sont des bio marqueurs capables d'établir un diagnostic individuel des effets des dommages dus au stress oxydant et constituent des signaux d'alarmes précoces d'éventuels dommages au niveau de l'écosystème. Cependant pour les utiliser comme éléments prédictifs des effets aux niveaux des populations et des communautés, il est nécessaire d'établir le lien entre les défenses antioxydantes et les indicateurs de l'état de santé des individus (croissance, réserves énergétiques, fonctions métaboliques...).

A cet effet, une très forte pertinence est accordée à l'intégration des deux biomarqueurs CAT et protéase pour définir leur capacité à prédire d'éventuels effets au niveau populationnel. Par ailleurs, les différentes mesures réalisées sur le poisson tilapia à savoir : biomarqueurs (CAT et protéase), paramètres biométriques (TCS, RHS, RGS...), bioénergétiques (y compris les réserves), et écophysiologiques constituera donc une excellente référence pour un diagnostic complet de l'état des écosystèmes dans le cas d'un programme de surveillance en milieu naturel ou en aquaculture.

Dans notre programme de biosurveillance active, on a procédé à la transplantation des moules *Mytilus galloprovincialis* aux niveaux de trois ports de pêches de la wilaya de Tipaza dans le but d'évaluer le degré de pollution de ces derniers tout en validant les différents biomarqueurs étudiés. Les résultats jugés intéressants sont :

- Les résultats des mesures hydrologiques ont mis en évidence des faibles teneurs en oxygène dissout au niveau du port de Khemisti comparativement à celles mesurées dans les ports de bouharoune et gouraya ou encore au niveau du site de référence. La désoxygénation est due probablement à une augmentation du degré de pollution. Par ailleurs, les résultats relatifs aux dosages des sels nutritifs ont montré des variations irrégulières de la concentration des composés azotés avec prédominance du phosphore au niveau du port de gouraya. Ainsi, les rejets atteignant les différentes localités ne sont pas de même nature.

- Une corrélation positive a été établie entre le niveau de pollution des différentes localités de test et le degré d'induction de l'activité de défense CAT. De même, les activités de l'enzyme antioxydante sont avérées proportionnelles à la concentration en cuivre accumulé par les moules transplantées.
- Par ailleurs, la baisse des activités CAT mesurées à la fin du cycle de décontamination pourrait refléter le rôle des biomarqueurs de défense dans le maintien de l'homéostasie des moules employées comme bioindicateurs du niveau de pollution.
- Pour mettre en évidence la différence entre les effets de la pollution et ceux des saisons, des mesures simultanées ont été effectuées à la fois dans les sites contaminés et dans le site de référence pris comme témoin. Cette stratégie nous a permis d'écarter l'effet de variation du bruit de fond dans les signaux des biomarqueurs mesurés.
- L'atteinte de l'activité de l'enzyme digestive protéase a été corrélée et liée directement aux effets des polluants présents dans les différentes localités de contamination. Par ailleurs, la protéase s'est montrée plus sensible au manque de ressources nutritionnelles dans le site de décontamination.
- Les moules récupérées de la station de gouraya ont montré une croissance et un TCS plus grand à ceux mesurés dans la station de bouharoune encore plus grand à ceux mesurés dans la station de khemisti.
- L'état des moules était lié au déséquilibre de la balance énergétique, différente pour chaque groupe et cela en fonction du degré de pollution. Ainsi, le comportement de fermeture des valves et l'atteinte de l'enzyme protéase avaient un effet probable sur l'optimisation de la prise énergétique et l'efficacité de conversion de nourriture. Par ailleurs, l'allocation énergétique pour la défense, la réparation et la régénération des cellules est privilégiée à la croissance et à la reproduction.

Un diagnostic de la qualité des écosystèmes aquatiques doit reposer sur plusieurs variables biologiques complémentaires, car l'effet biologique n'est pas en général spécifique d'un seul contaminant. Il apparaît que, dans l'état actuel des connaissances, il faudrait peut être privilégier une combinaison à la fois de biomarqueurs et de bioindicateurs dont la complémentarité des diagnostics

permettrait de déterminer en temps réel l'état de santé de l'organisme et des populations, de guider les efforts de restauration et d'évaluer les résultats de la gestion des milieux. Un suivi à long terme de biomarqueurs, couplés à des mesures de perturbations écologiques, permettrait de conclure sur l'évaluation du risque écologique qui est potentiellement apportée par les biomarqueurs [03].

L'intégration des biomarqueurs dans un réseau de surveillance rendrait ainsi possible la mesure d'une batterie de biomarqueurs à moindre coût en profitant des prélèvements réalisés en routine chaque année. La mesure d'une batterie de variables biologiques est nécessaire car il n'existe pas de biomarqueur idéal, ni informatif sur toutes les molécules chimiques, ni prédictif quant aux effets à tous les niveaux d'intégration biologique.

Dans l'approche de modélisation par les modèles cinétiques à un compartiment, la démarche s'est avérée simple et réaliste du point de vue mécanistique. Néanmoins, dans les milieux naturels la complexité des interactions entre les différents compartiments constituant l'écosystème rend l'étude de la bioaccumulation aussi difficile et complexe. Par ailleurs, les modèles cinétiques à bases physiologiques sont avérés encore plus pertinents pour décrire les différents mécanismes de capture et d'élimination des xénobiotiques.

Face aux avantages et limites des modèles cinétiques à compartiments et des modèles cinétiques à bases physiologiques, il est recommandé d'utiliser un troisième concept intermédiaire, plus récent qu'est celui des modèles cinétiques à base énergétique (Dynamic Energy Budget Model : DEB). Leur objectif est de formuler un modèle de bioénergie qui aide à connecter les différents niveaux d'organisation : de la molécule aux écosystèmes. Le cœur de la théorie est un modèle énergétique individuel qui évolue au cours du cycle de vie.

En conclusion, l'approche de modélisation en écotoxicologie est très prometteuse tant pour améliorer l'analyse des résultats expérimentaux que pour hiérarchiser entre eux les facteurs testés. Néanmoins, cette approche n'est encore qu'à ses prémises. Les approches statistiques conventionnelles de l'écotoxicologie restent donc d'une grande utilité pour encore quelques années d'autant plus que des améliorations sont en cours [164].

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

AChE : Acétylcholinestérase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BLM : Biotic ligand model

C : Contenu calorique

CAT : Catalase

CNRDPA : Centre national de recherche et de développement de la pêche et de l'aquaculture

CSE : Concentration seuil sans effet

DEB : Dynamic energy budget

DNS : Acide di-nitrosalicylique

EDTA : Ethylène-diamine tétra acétique

FBA : Facteur de bioaccumulation

FBC : Facteur de bioconcentration

FBM : Facteur de bioamplification ou de biomagnification

FIAM : Free ion activity model, le modèle de l'ion libre

GPJ : Gain en poids journalier

GPO_x : Glutathion peroxydases

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion S transférase

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

IC : Indice de condition

MES : Matière en suspension.

MDA : Malonedialdéhyde (dialdéhyde malonique)

MM : Matière minérale

MO : Matière Organique

MOD : Matière organique dissoute

MOP : Matière organique particulaire

MT : Métallothionéines

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

PCB : Polychlorobiphenyls

PVC : Polyvinylchloryde

R : Energie liée à la respiration

RGS : Rapport gonado somatique

RHS : Rapport hépato somatique

R_{mt} : Ration quotidienne de maintenance

R_{mx} : Ration maximale

ROS : Espèces réactives de l'oxygène ou « *reactive oxygen species* »

SOD : Superoxydes dismutases

TA : Titre alcalimétrique

TAC : Titre alcalimétrique complet

TH : Titre hydrométrique

TCA : Acide Trichloroacétique

TCS : Taux de croissance spécifique

TDS : Total dissout solid

U : Energie liée à l'excrétion

APPENDICE (A)

1 Analyses physico-chimiques et microbiologiques de l'eau d'élevage

1.1 Analyses physico-chimiques

Détermination de l'alcalinité (TA, TAC) :

❖ Principe

L'alcalinité d'une eau correspond à la présence des hydrogénocarbonates, carbonates et hydroxydes. Le titre alcalimétrique ou TA mesure la teneur de l'eau en hydroxyde libre (alcalis) et en carbonates alcalins caustiques.

$$TA = [OH^-] + [CO_3^{2-}]$$

Le titre alcalimétrique complet ou TAC correspond à la teneur de l'eau en alcalis libres, carbonates et hydrogénocarbonates.

$$TAC = [OH^-] + [CO_3^{2-}] + [HCO_3^-]$$

La détermination du TA et TAC est basée sur la neutralisation d'un certain volume d'eau par un acide minérale dilué, en présence d'un indicateur coloré.

❖ Mode opératoire

Détermination du TA :

100ml d'eau à analyser sont introduits dans un erlenmeyer. 01 à 02 gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine (02%) sont ajoutées à l'échantillon. Une coloration rose doit alors se développer. Dans le cas contraire le TA est « nul », ce qui se produit en générale pour les eaux naturelles dont le pH est inférieur à 8,3. Par la suite l'acide chlorhydrique ou sulfurique (0,02N) est versé doucement dans l'erlenmeyer à l'aide d'une burette, en agitant constamment, et ceci jusqu'à décoloration complète de la solution (pH 8,3). Soit V le nombre de ml d'acide utiliser pour obtenir le virage.

Détermination du TAC :

02 gouttes de solution de méthylorange sont ajoutées à l'échantillon traité précédemment ou à un prélèvement primitif s'il n'a pas eu de coloration. Le titrage de l'échantillon avec le même acide est maintenu jusqu'au virage du jaune au jaune orangé (pH 4,3). Soit V' le nombre de ml d'acide versé depuis le début du dosage.

❖ Expression des résultats

TA :

$V/5$ exprime le titre alcalimétrique en ml par litre.

V exprime le titre alcalimétrique en degré français (en effet, 1°F correspond à 10 mg de carbonate de calcium ou 0,2 mEq/l).

TAC :

$(V' - 0,5)/5$ exprime le titre alcalimétrique complet en mEq/l

$V' - 0,5$ exprime le titre alcalimétrique complet en degré français.

Détermination du titre hydrométrique (TH) « Dureté »:

❖ Principe

Le TH correspond à la teneur de l'eau en ions calcium et magnésium, cette teneur porte le nom de dureté totale qui correspond à la somme des concentrations de ces deux ions.

$$TH = [Ca^{2+}] + [Mg^{2+}]$$

Cette technique repose sur le titrage par complexométrie du Ca^{2+} et Mg^{2+} avec une solution aqueuse de sel disodique d'acide éthylène-diamine tétra acétique (EDTA), solution de pH 10, l'indicateur coloré noir ériochrome-T donne une couleur rouge foncée ou violette en présence des ions de calcium et de magnésium.

Lors du titrage, l'EDTA réagit d'abord avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} libres en solution puis au point d'équivalence avec les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} combinés. Ce dernier (EDTA) est libéré et provoque un changement de couleur du violet au bleu.

❖ Mode opératoire

Dans un bêcher de 250 ml on introduit 100 ml d'eau à analyser puis on ajoute 10 ml de solution tampon (pH 10) et deux gouttes de l'indicateur coloré noir ériochrome-T, la solution doit se colorer en violet ; on titre ensuite avec l'EDTA toute

en agitant jusqu'au virage du violet au bleu. Le point final de virage est atteint lorsque la dernière nuance violette a disparu.

❖ Expression des résultats

V : le volume nécessaire à la titration, donc : TH = V, en °F.

1.2 Contrôle microbiologique

Techniques d'analyse et préparation des dilutions

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 (eau d'élevage) 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 germes aérobies mésophiles (GAM)

Technique d'ensemencement sur milieu solide (PCA) :

Dans ce type de méthodes, les bactéries maintenues dispersées à la surface d'un milieu solide, donnent naissance, dans des condition favorable, à des colonie isolées les une des autres qui, de ce fait, peuvent être directement comptées.

En pratique 0,1 à 0,2ml d'échantillon est réparti avec un étaleur stérile (pipette Pasteur repliée en râteau) sur la surface de la gélose PCA (coulée, solidifiée, refroidie, convenablement séchée en boites de Pétri).

La lecture des résultats est faite après 72h d'incubation à 30°C.

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

❖ 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.

Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :

❖ 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.

Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Enrichissement :

A partir des dilutions 10^{-1} à 10^{-3} , on porte 1ml dans des tubes stériles numérotés puis on les complète avec 15ml de milieu Giolitti Contoni, et additionné d'une ampoule et demi de Tellurite de potassium juste avant son utilisation.

Incubation : Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture : Les tubes positifs sont ceux qui présentent un noircissement, dû à la réduction du Tellurite de potassium.

Isolement :

On fait des isolements des tubes positifs sur gélose de Chapman, préalablement fondu en boîte et solidifiée par ensemencement par stries.

Incubation : Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Lecture : Les colonies des staphylocoques sont petites, lisses, légèrement bombées jaunes.

Recherche et dénombrement de la flore fongique (levures et moisissures)

❖ Technique

A la surface de chaque boîte de Pétri contenant du milieu gélosé OGA fondu et refroidis, 0,1ml (c'est environs 4 gouttes) des dilutions 10^{-1} à 10^{-3} est transféré puis étalé sur toute la surface du milieu à l'aide d'un râteau.

Incubation : L'incubation est maintenue pendant 3 à 5 jours à 30°C.

Lecture et dénombrement :

- levures : aspect souvent identique aux colonies bactériennes. Elles peuvent avoir des bords réguliers ou irréguliers, des formes convexes ou plates, et sont pigmentées souvent opaques.
- Moisissures : colonies toujours pigmentées, à l'aspect velouté plus ou moins proéminent.

2 Analyse physico-chimique et microbiologique de l'aliment

2.1 Analyses physico-chimiques

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) .

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

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 pesé 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 :

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

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

2.2 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. Les dilutions décimales sont obtenues en procédant de la même façon comme le cas pour l'eau.

Recherche et dénombrement des différents germes

Les germes totaux, streptocoques, staphylocoques et levures et moisissures sont déterminés dans les mêmes conditions opératoires pour le cas de l'eau. Concernant les coliformes, la recherche des ces derniers est faite dans le milieu VBL à la place de BCPL.

GLOSSAIRE

Abiotique : Désigne dans toute entité écologique, ce qui est de nature strictement physico-chimique, ou encore minéral lorsqu'il s'agit de la dimension géologique d'un biotope ;

Aigue : Qui se manifeste sur une courte période (en seconde, en minute, en heure ou quelques jours relativement à la durée du cycle de vie de l'organisme ;

Anthropique : Relative à l'activité humaine ;

Apoptose : (mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire) Processus par lequel des cellules déclenchent leur auto destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation: les membranes plasmiques ne sont pas détruites, et la cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose ;

Autotrophes : êtres vivants capables d'utiliser les éléments minéraux dissous dans l'eau pour se nourrir grâce au processus de photosynthèse ;

Benthique : Se dit du fond régions aquatiques ; se dit de la partie de l'environnement aquatique habitée par des organismes (benthos) vivant dans le substrat ;

Biocénose : Ensemble des êtres vivants d'un biotope ou d'une station donnée. (La biocénose et le biotope constituent un écosystème)

Bioéssais : Expérimentation effectuée en laboratoire, sur divers types d'être vivants afin de caractériser les activités biocides ou les particularités toxicologiques de produits chimiques ou de milieux contaminés ;

Biotique : Désigne tout ce qui est propre à la vie. Facteurs biotiques : ensemble des facteurs écologiques liés aux êtres vivants (Compétition, prédation, parasitisme, mutualisme,...) ;

Biotope : Milieu biologique offrant à une biocénose des conditions de vie relativement stable (biotope terrestre, marin, etc.) ;

Ecosystème : Système dans lequel il existe des échanges cycliques de matières et d'énergie dus aux interactions entre les différents organismes présents (biotope) et leur environnement (biocénose) ;

Ecotoxicologie : Science qui étudie l'origine, l'émission et l'introduction de polluants naturels ou artificiels dans la biosphère, leur devenir et leurs actions sur les écosystèmes. Elle inclut ainsi la toxicologie de l'environnement, la toxicologie industrielle, la toxicologie alimentaire ou la toxicologie nucléaire ;

Euryhalin : Se dit des espèces capables de résister à des changements importants de salinité ;

Excrétion : Rejet des résidus en sort de l'organisme ;

Fitness : Mesure de la capacité des individus à transmettre leurs gènes à la génération suivante (donc à produire des descendants matures), relativement aux autres individus de la même population et au même moment. Cette notion inclut donc notamment celles de survie et de reproduction ;

Homéostasie : Maintien, chez les organismes vivants, de l'équilibre normal des réactions chimiques et des constituants principaux de l'organisme d'un individu. Par extension, l'homéostasie fait également référence à la stabilisation des constantes physiologiques d'un organisme ;

Ichtyomètre : Instrument de mesure de la taille du poisson (Ichtyos en Grec poisson) ;

Nécrose : Une de deux formes principales de mort cellulaire (l'autre étant l'apoptose, ou mort cellulaire programmée) observée lors d'accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou lors de déficits métaboliques. La nécrose est accompagnée habituellement d'une réponse inflammatoire qui consiste en la présence d'exsudat et de cellules spécialisées du système hématopoïétique comme les lymphocytes et les

macrophages. La cassure de la membrane plasmique qui en résulte conduit à la libération dans le milieu extérieur du contenu cytoplasmique ;

Métabolisme : Par le terme de métabolisme, on comprend toutes les réactions chimiques ayant lieu dans l'organisme, nécessaires au maintien des processus de la vie. Ces réactions concernent l'apport d'énergie, mais aussi l'introduction, la transformation, la décomposition dans les organismes ainsi que l'élimination de certains composés et le maintien ou l'augmentation de la biomasse ;

Omnivores : Animaux pouvant consommés à la fois de la chair animale et des matières végétales ;

Toxicité : Particularité propre à diverses substances dont l'absorption a pour effet de perturber le métabolisme des êtres vivants, provoquant des troubles physiologiques pouvant aller jusqu'à la mort des individus exposés. En fonction de l'intensité et de la rapidité des effets, on distingue une toxicité aiguë, une toxicité subaiguë et une toxicité à long terme encore dénommée toxicité chronique, résultant de l'exposition permanente à de faibles concentrations d'un toxique ;

Toxicité aiguë : Cette toxicité est évaluée par le biais de tests de courte durée comparativement à la durée de vie de l'organisme soumis à l'essai (ex généralement moins de quatre jours pour les poissons) ;

Toxicité chronique : Cette toxicité est évaluée par le biais de tests couvrant une partie appréciable de la vie de l'organisme soumis à l'essai et permettant d'examiner les effets sur certains paramètres tels que le métabolisme, la croissance, la reproduction et la survie ;

Voie directe : Expression relative au milieu environnant (l'eau dans le cas d'organismes aquatiques). Une contamination par voie directe consiste donc en une exposition des organismes à une substance donnée à partir du milieu environnant cet organisme ;

Voie trophique : Expression relative à la chaîne alimentaire. Une contamination par voie trophique consiste donc en une exposition des organismes à une substance donnée par le biais de la chaîne alimentaire ;

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

01. Flammarion, P., Devaux, A., Garric, J., «Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux ; exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire» Bull. Fr. Pêche Piscic. 357/358, 209-226, 2000.
02. Lagadic, Laurent., Caquet, Thierry., Amiard, Jean-Claude., Ramade, François., «Biomarqueurs en écotoxicologie, Aspects fondamentaux» Edition Masson, Paris, ISBN : 2-225-83053-3 ; ISSN :1275-0026, 1997.
03. Lagadic, Laurent., Caquet, Thierry., Amiard, Jean-Claude., Ramade, François., «Utilisation des Biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement» Edition Tec et Doc Lavoisier Paris, ISBN : 2-7430-0230-1, 1998.
04. Sabrina, Barillet., «Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zebre (*danio rerio*)» Thèse de doctorat, université Paul Verlaine de Metz, 2007, 475p.
05. Stellio, Casas., «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, 2005, 314p.
06. Khaled, Farès Nakhlé., «Le mercure, le cadmium et le plomb dans les eaux littorales libanaises : Apport et suivi au moyen de bioindicateurs quantitatifs (Eponge, Bivalves et Gastéropodes)» Thèse de doctorat, université Paris7, 2003, 246p.
07. PNUE/PAM/MED POL., «Lignes directrices pour l'élaboration d'indicateurs d'état écologique et de réduction du stress. Programme des nations unies pour l'environnement / plan d'action pour la méditerranée» MAP Rapports techniques n°154 Athènes : 2004,114p.

08. Amiard, Jean-Claude., Claude, Amiard-Triquet., «Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques» Edition Tec et Doc Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-1017-1, 2008.
09. Pieterse, G.M., «Histopathological changes in the testis of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) as a biomarker of heavy metal pollution» Thesis of Philosophiae Doctor in Aquatic health, Rand Afrikaans Univ, 2004, 153p.
10. WHO., «Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles» Environmental health criteria 155, World Health Organization Geneva, ISBN 92 4 157155 1 (NLM Classification: QH 541.15.B615) ISSN 0250-863X, 1993.
11. Ron van der Oost., Jonny, Beyer., Nico, P.E. Vermeulen., «Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review» Environmental Toxicology and Pharmacology 13, 57-149. Elsevier, 2003.
12. Forbes, V.E., Palmquist, A., Bach, L., «The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology» Environmental Toxicology and Chemistry 25, 272-280, 2006.
13. Fossi, M.C., Marsili, L., «The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals» Biomarkers 2, 205-216, 1997.
14. Jean-François, Chiffolleau., «La contamination métallique ; Programme scientifique Seine-Aval» Ifremer. ISBN 2-8433-065-7, 2001, p : 3.
15. Gérard, MIQUEL., «Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé» Rapport office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Rapport sénat n°261 : 2001, 366p.
16. D Gaujous., «La pollution des milieux aquatiques : aide-mémoire» ISBN : 2-85206-917-2 1^{re} Edition, Lavoisier Paris, 1995, p : 17,18,19.
17. Bonnomet, V., Coquery, M., Le Goff, F., Magaud, h., Monbet, P., Morin, A., «Analyse critique des méthodologies pour la détermination et l'application de normes de qualité environnementale pour les métaux» Rapport de synthèse Ministère de l'écologie et du développement durable Direction de l'eau, Paris n° CV03000081 : 2004, 27p.

18. Geffard, Alain., «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, 2001, 252p.
19. Louis, Yoann., «Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions Matière Organique Naturelle Dissoute (MOND) –Contaminants métalliques» Thèse de Doctorat, Université du Sud Toulon – Var, 2008, 214p.
20. Lewis, A.G., «The biological importance of copper, final report INCA project» no: 223, University of British Columbia : 1989, 116p.
21. Geoffrey, Lespagnol., «Lixiviation du Chrome, du Cuivre et de l'Arsenic (CCA) à partir de sols contaminés sur des sites de traitement du bois» Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne, Université Jean Monnet, 2003.
22. Pichard, A., Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Migne, V., Morin, A., Tissot, S., Gillet, C., «Cuivre et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques» INERIS-DRC-02-25590-02DF54., 2005, 66p.
23. Bonnie, Ransom Stern., Marc, Solioz., Daniel, Krewski., Peter, Aggett., Tar-Ching Aw., Scott, Baker., Kenny, Crump., Michael, Dourson., Lynne, Haber., Rick, Hertzberg., Carl, Keen., Bette, Meek., Larisa, Rudenko., Rita, Schoeny., Wout, Slob., Tom, Starr., «Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships» Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 10, 157–222, 2007.
24. Alain, Viala., Alain, Botta., «Toxicologie» ISBN : 2-7430-0678-1. Edition Tec et Doc Lavoisier Paris : 2005, p227,595-597,617,618,626,627.
25. Flemming, C., Trevors, T., «Copper toxicity and chemistry in the environment : A review» Water Air and Soil Pollution 44, 143-158,1989.
26. Gilbin, R., «Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires : spéciation, biodisponibilité et toxicité. *Exemple du cuivre*

dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France)»Thèse de Doctorat, université de Genève, 2001, 216 p.

27. Pichard, A., Bisson, M., Diderich, R., Houeix, N., Hulot, C., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Leveque, S., Magaud, H., Morin, A., Pepin, G., Pichard, A., Gillet, C., «Cadmium et ses dérivés»INERIS –DRC-01-25590-00DF249.doc, 2005.

28. PNUE/FAO/OMS., «Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le cadmium et les composés de cadmium» MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989.

29. ECE/EB.AIR/WG., «Risques pour la santé présentés par les métaux lourds provenant du transport transfrontière à longue distance des polluants atmosphériques» Nation Unies-Conseil économique et social : ECE/EB. AIR/WG. Genève, 2006.

30. Apostoli, A., Brescia., Cornelis, R., Ghent., Duffus, J., Edinburgh., Hoet, P., Lison, D., Brussels., «Elemental speciation in human health risk assessment» Environmental Health Criteria 234 :ISBN 978 92 4 157234 7, ISSN 0250-863X, World Health Organization, 2006.

31. Daniel, Cossa., Françoise, Elbaz-Poulichet., Mauricette, Gnassia-Barelli., Michèle, Roméo., «Le plomb en milieu marin biogéochimie et écotoxicologie» Ifremer. ISSN 1240 -1153, 1993.

32. *Expertise Collective* INSERM., «Plomb dans l'environnement - Quels risques pour la santé ?» Les Editions INSERM, ISBN 2 85598-745-8, 1999, 30p.

33. Laperch, V., Dictor, M.C., Clozel-Leloup, B., Branger, Ph., «Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués» Rapport final BRGM/RP-52881-FR, 2004,136p.

34. Yves, Le Gal., «Biochimie marine» Edition MASSON Paris Malin Barcelone Mexico, 1988.

35. Calmon, P., Garnier-Laplace, J., Fortin, F., «Argent 110m et environnement» Fiche radionucléide IRSN : Direction de l'environnement et de l'intervention - service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes, 2002, 15p.
36. Malika, Lachambre., Cédric, fisson., «La contamination chimique : quel risque en estuaire de seine ?» Fiche substance : Argent. GIP Seine –Aval. 2007, 9p.
37. François, Leterrier., «Divers produits chimiques employés en photographie, toxicité, dangers et précautions à prendre avec quelques indications sur leurs usages» 2004, 24p.
38. Russell, J.Erickson., Larry, T.Brooke., Michael, D.Kahl., Fred, Vendee Venter., Sandra, L.Harting., Thomas, P.Markee., Robert, L.Spehart., «Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms» Environmental Toxicology and chemistry 17, 572-578, 1998.
39. Marie-Amélie, Pétré., Marc, Benedetti., «Étude de la spéciation des métaux traces dissous en Seine, relation avec le pH et la matière organique dissoute» Université Pierre et Marie Curie, 2008.
40. Laura, Sigg., Philippe, Behra., Werner, Stumm., «Chimie des milieux aquatiques. Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement» Edition DUNOD, Paris. ISBN 2 10 004739 6, 2000.
41. Rollemberg, M.C., Gonçalves, M.S.L., «Kinetics of uptake of cadmium by *Chlorella marina* in different media» Bioelectrochemistry 52, 57-62, 2000.
42. Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., «Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae» Marine Chemistry 74, 65-85, 2001.
43. Wildgust, M.A., Jones, M.B., «Salinity change and the toxicity of the free cadmium ion $[Cd^{2+}_{aq}]$ to *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea)» Aquatic Toxicology, 41, 187-192, 1998.
44. Francois, Le Goff., Vincent, Bonnomet., «Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM» Rapport technique. INERIS DRC-03-46822-FLg/JL-03-0693, 2004, 85p.

45. D. Mackay., A. Fraser., «Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models» *Environmental Pollution* 110, 375-391, 2000. Elsevier.
46. Karin, Veltman., Jan, Hendriks., Mark, Huijbregts., Pim, Leonards., Martine, van den Heuvel-Greve., Dick, Vethaak., «Accumulation of organochlorines and brominated flame retardants in estuarine and marine food chains: Field measurements and model calculations» *Marine Pollution Bulletin* 50, 1085–1102, 2005.Elsevier.
47. Martine, G. de Vos., Mark, A.J. Huijbregts., Martine, J. van den Heuvel-Greve., A. Dick Vethaak., Kristin I. Van de Vijver., Pim E.G. Leonards., S.P.J. van Leeuwen., P. de Voogt., A. Jan Hendriks., «Accumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the food chain of the Western Scheldt estuary: Comparing field measurements with kinetic modelling» *Chemosphere* 70, 1766–1773, 2008.Elsevier.
48. Shefali, Kumar., Mohit, Kumar., Kerstin, Thurow., Regina, Stoll., Udo, Kragl., «Fuzzy filtering for robust bioconcentration factor modelling» *Environmental Modelling & Software* xxx, 1–10, 2008.Elsevier.
49. K.M. Lai., M.D. Scrimshaw., J.N. Lester., «Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems» *The Science of the Total Environment* 289, 159-168, 2002.Elsevier.
50. Berry Yun-Hua, Chou., Chung-Min, Liao., Ming-Cha,o Lin., Hsu-Hui, Cheng., «Toxicokinetics/toxicodynamics of arsenic for farmed juvenile milkfish *Chanos chanos* and human consumption risk in BFD-endemic area of Taiwan» *Environment International* 32, 545–553, 2006. Elsevier.
51. Christina, E. Cowan-Ellsberry., Scott, D. Dyer., Susan, Erhardt., Mary, Jo Bernhard., Amy, L. Roe., Martin, E. Dowty., Annie, V. Weisbrod., «Approach for extrapolating in vitro metabolism data to refine bioconcentration factor estimates» *Chemosphere* 70, 1804–1817, 2008. Elsevier.
52. John, W. Nichols., Irvin, R. Schultz., Patrick, N. Fitzsimmons., «In vitro–in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish I. A review of

methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models» *Aquatic Toxicology* 78, 74–90, 2006. Elsevier.

53. Catherine, Gourlay., «Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : influence de la matière organique naturelle et anthropique» Thèse de doctorat, Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts, Centre de Paris, 2004, 212p.

54. Worms, I., Simon, D.F., Hassler, C.S., Wilkinson, K.J., «Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms : importance of chemical, biological and physical processes on biouptake» *Biochimie* 88, 1721–1731, 2006. Elsevier

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

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

57. Benard, A., Durif, M., Lavrilloux, P., Vandamme, L., Meunier, L., Defrenne, B., «Utilisation d'une technique de biosurveillance pour évaluer les retombées de métaux lourds : Cas d'un site de seconde fusion du plomb» Rapport final : INIRES-DRC-04-55891-AIR-n°0565-MDu/LVa, 2004, 66p.

58. Arzul, G., Bocquené, G., Claisse, D., Grossel, H., Marchand, M., Munsch, C., Tissier, C., Tixier, C., Tronczynski, J., «Stratégies pour la surveillance des produits phytosanitaires en milieu marin côtier» Ifremer, R.INT-DEL/PC/2004.17 : 2004, 46p.

59. Bruno, Andral., «Guide méthodologique, Le réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO) en Méditerranée, Evaluation de la contamination chimique basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules» Ifremer : 2002, 21p.

60. Éric, Vindimian., «La surveillance biologique des impacts toxiques dans l'environnement» *Cellular and Molecular Biology* 47, 67-79, 2001.

61. Sergio, Santiago., Kristin, Becker van Slooten., Nathalie, Chèvre., Michel, pardor., Christophe, Benninghoff., Marc, Dumas., Eric, Thyband., Frédéric, Garrinier., «Guide pour l'utilisation des testes écotoxicologiques avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement» Edition Soluval Santiago, 2002, 56p.
62. Bernard, Clement., «Apports des essais en microcosmes aquatiques lenticules de laboratoire a l'évaluation écotoxicologique des polluants» Mémoire pour obtenir le diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches délivré conjointement par l'institut national des sciences appliquées et l'université LYON 1, 2006, 288p.
63. Blandin, P., «Bioindicateur et diagnostique des systèmes écologiques» Bull. Ecol 17, 215-307, 1986.
64. Vindimian, E., Garric, J., «Bioéssais et bioindicateurs de toxicité dans le milieu naturel» Agences de l'eau. Ministère de l'environnement. CEMAGREF LYON. 1993, 55p.
65. Almeida, J.A., Dinizb, Y.S., Marquesa, S.F.G., Faineb, L.A., Ribasc, B.O., Burneikob, R.C., Novellib, E.L.B., «The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination» Environment International 27, 673–679, 2002. Elsevier.
66. Ana Rosa, Linde-Arias., Alan, F. Inácio., Carla de Albuquerque., Marina, M. Freire., Josino, C. Moreira., «Biomarkers in an invasive fish species, *Oreochromis niloticus*, to assess the effects of pollution in a highly degraded Brazilian River» Science of the total environment 399, 186 – 192, 2008. Elsevier.
67. Genevieve, Deviller., «Traitement par lagunage a haut rendement algal (LHRA) des effluents piscicoles marins recycles : évaluation chimique et écotoxicologique» Thèse de doctorat, Université Montpellier I, 2003, 172p.
68. Papa Madièye, Gueye., «Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge» Thèse de doctorat , Université Louis Pasteur – Strasbourg I, 2007, 251p.

69. X. N. Verlecar., K. B. Jena., G.B.N. Chainy., «Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea» *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76(4), 745-752.
70. Elodie, Fournier., «Bioaccumulation du sélénium et effets biologiques induits chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Prise en compte de l'activité ventilatoire, de la spéciation du sélénium et de la voie de contamination» Thèse de doctorat, université Bordeaux 1, 2005, 252p.
71. Gülüzar, A., Ozlem, A., Seyhan, T., Mustapha, C., «Response of catalase activity to Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} in five tissues of freshwater *Oreochromis niloticus*» *Comparative Biochemistry and Physiology* 143, 218-224, 2006. Elsevier.
72. Gu Jing., Yu Li., Liping Xie., Rongqing Zhang., «Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper» *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 144, 184–190, 2006. Elsevier.
73. Cohen, P., «Régionalisation de l'habitat physique du poisson. Approche multi-scalaire et application au bassin de la Loire, France» Thèse de doctorat, université Claude-Bernard Lyon I, 1992, 251p.
74. Sandra, M. Monteiro., Juan, M. Mancera., Antonio, FontainhasFernandes., Mario, Sousa., «Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*» *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 141, 375 – 383, 2005. Elsevier.
75. Nevin, Üner., Elif Özcan, Oruç., Yusuf, Sevgiler., Nesli, Şahin., Hülya, Durmaz., Demet, Usta., «Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*» *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, 241–245, 2006. Elsevier.
76. Hülya, Durmaz., Yusuf, Sevgiler., Nevin, Üner., «Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*» *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84, 215–226, 2006. Elsevier.

77. A. Figueiredo-Fernandes., A. Fontainhas-Fernandes., F. Peixoto., E. Rocha., M.A. Reis-Henriques., «Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat» *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 97–103, 2006. Elsevier.
78. Gülüzar, Atli., Mustafa, Canli., «Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*» *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2007. Elsevier.
79. Trewavas, E., «Nomenclature of Tilapia of southern Africa» *J.Limnol. Soc. Sth. Afr*, 1981.
80. Melard, C., «Recherche sur la biologie d'*Oreochromis niloticus* L. (Pisces : Cichlidae) en élevage expérimental : reproduction, croissance, bioénergétique» *Cah. Ethol. Appl* 6, 1-224, 1986.
81. Dabbadie, L., «Etude de la viabilité d'une pisciculture rurale a faible niveau d'intrant dans le centre ouest de la cote d'ivoire : approche du réseau trophique» *Thèse de doctorat, universite Paris 6*, 1996, 214 p.
82. Harrison, Charo-Karisa., Mahmoud, A. Rezkc., Henk, Bovenhuisb., Hans, Komen., «Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles» *Aquaculture* 249,115-123, 2005. Elsevier.
83. Pullin, R.S.V., Lowe Me Connel R.H., «The biology and culture of tilapias» *ICLARM Conference Proceedings*, 7 Manila, Philippines, 1982, 432p.
84. Gilles, Lemarie., Jean Francois, Baroiller., Frederic, Clotac., Jerome, Lazard., Antoine, Dosdata., «A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*» *Aquaculture* 240, 575–587, 2004. Elsevier.
85. Garidou, Cécile., «Quantification des rejets d'une ferme piscicole de Loup (*Dicentrarchus labrex* L). Bilan de mass : N, P et C» *GIE recherche aquacole Station IFREMER* : 1994, 209p.

86. Hélène, J., «Manger ou Nager faut-il choisir, Influence de la demande métabolique sur la hiérarchisation des fonctions chez le Bar *Dicentrarchus labrex*» UMR : 2006, 24p.
87. Hulbert, A.J., Else, P.L., «Basal metabolic rate: history, composition, regulation, and usefulness» *Physiol Biochem Zool* 77, 869-76, 2004.
88. Schurmann, H., Steffensen, J.F., «Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod» *Journal of Fish Biology* 50, 1166-1180, 1997.
89. Jean-Paul, Blancheton., Antoine, Dosdat., Jean-Marc, Deslous Paoli., «Minimisation des rejets biologiques issus d'élevages de poissons» Dossier de l'environnement de l'INRA n°26 : 12p.
90. Patricia, A., Wright., «Review nitrogen excretion: three end products, many physiological roles» *Journal of Experimental Biology* 198, 273–281, 1995.
91. Pagand, Pascal., «Traitement des effluents piscicoles marins par lagunage a haut rendement algal» Thèse de doctorat, université de Montpellier I, 1999, 220p.
92. Leung K. M. Y., Chu J. C. W., Wu R. S. S., «Effect of body weight, water temperature and ration size on ammonia excretion by the aeolated grouper (*Epinephelus areolatus*) and mangrove snapper (*Lutjanus argentimaculatus*)» *Aquaculture* 170, 215-227, 1999.
93. Filippo, Donnini., Enrico, Dinelli., Francesca, Sangiorgi., Elena, Fabbri., «A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy)» *Environment International* 33, 919–928, 2007. Elsevier.
94. Mohamed, Maanan., «Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region» *Environmental Pollution* 153, 176-183, 2008. Elsevier.
95. M. Schintu., L. Durante., A. Maccioni., P. Meloni., S. Degetto., A. Contu., «Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques» *Marine Pollution Bulletin* 57, 832-837, 2008. Elsevier.

96. Victoria, Besada., José Manuel, Andrade., Fernando, Schultze., José, Fumega., Bruno, Cambeiro., Juan José, González., «Statistical comparison of trace metal concentrations in wild mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in selected sites of Galicia and Gulf of Biscay (Spain)» *Journal of Marine Systems* 72, 320–331, 2008. Elsevier.
97. Raffaella, Bocchetti., Claudia Virno, Lamberti., Barbara, Pisanelli., Erika M. Razzetti., Chiara, Maggi., Barbara, Catalano., Giulio, Sesta., Giacomo, Martuccio., Massimo, Gabellini., Francesco, Regoli., «Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea» *Marine Environmental Research* 66, 24–26, 2008. Elsevier.
98. Lindner, G., «Guide des coquillages marins» Paris, 1989, 255p.
99. Kornprobst, J-M., «Substances naturelles d'origine marine» Edition Tec et Doc. Lavoisier, 2005, p 248.
100. Lindner, G., «Coquillage et bivalves d'Europe» Edition Vigot, 2004, 95p.
101. Barnabe, G., «L'aquaculture» Edition Lavoisier, Paris volume 1, 2^{ème} édition, Technique et documentation, 1991,12, 95p.
102. Alain, Aminot., Marcel, Chaussepied., «Manuel des analyses chimiques en milieu marin» Centre National pour l'Exploitation des Océans, (CNEXO), 1983.
103. Kosmala, A., «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, 1998, 189 p.
104. Euloge, Dongmeza., Perumal, Siddhuraju., George, Francis., Klaus, Becker., «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, 2006. Elsevier.
105. Jessica, Kojadinovic., Michel, Potier., Matthieu, Le Corre., Richard, P. Cosson., Paco, Bustamante., «Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean» *Environmental Pollution* 1-19, 2006. Elsevier.

106. Benjamin, J. Shaw., Richard, D. Handy., «Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*» *Aquatic Toxicology* 76, 111–121, 2006. Elsevier.
107. Ferit, Rad., Sezai, Bozaoğlu., Serap Ergene, Gözükara., Arzu, Karahan., Gülderen, Kurt., «Effects of different long-day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)» *Aquaculture* 255, 292–300, 2006. Elsevier.
108. Saber, A. El-Shafaia., Fatma, A. El-Goharya., Fayza, A. Nasra., N. Peter van der Steenb., Huub, J. Gijzenb., «Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*)» *Aquaculture* 232, 117–127, 2004. Elsevier.
109. Ann, Houck., Joseph, J. Cech Jr., «Effects of dietary methylmercury on juvenile Sacramento blackfish bioenergetics» *Aquatic Toxicology* 69, 107–123, 2004. Elsevier.
110. Freric, Glasser., Mark, Oswald., «High stocking densities reduce *Oreochromis niloticus* yield : model building to aid the optimisation of production» *Aquat. Living Resour* 14, 319-326, 2001.
111. Shouqi, Xie., Yibo, Cui., Yunxia, Yang., Jiankang, Liu., «Effect of body size on growth and energy budget of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*» [Aquaculture](#) 157, 25-34, 1997. Elsevier.
112. D. Lemos., B. Netto., A. Germano., «Energy budget of juvenile fat snook *Centropomus parallelus* fed live food» *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144, 33–40, 2006. Elsevier.
113. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, N.J., Randall, R.J., «Protein measurements with the Folin phenol reagent» *J. Biol. Chem.* 193, 265–275, 1951.
114. Ranilson, S., Eduardo, J., Rodrigo, B., Patricia, M., Maria, E., Luana, C., Coelho, L., «Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)» *Process Biochemistry* 40, 1826-1834, 2005. Elsevier.

115. G Gumus., H Filik., B Demirata., «Determination of bismuth and zinc in pharmaceuticals by first derivative UV-Visible spectrophotometry» *Analytica Chimica Acta* 547, 138-143, 2005. Elsevier.
116. Zhefeng, Fan., Wei, Zhou., «Dithizone-chloroform single drop microextraction system combined with electrothermal atomic absorption spectrometry using Ir as permanent modifier for the determination of Cd in water and biological samples» *Spectrochimica Acta* 61, 870-874, 2006. Elsevier.
117. Michiel, H.S. Kraak., Yvonne, A. Wink., Suzanne, C. Stuijzand., Marion, C. Buckert-de Jong., Chris, J. de Groot., Wim, Admiraal., «Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*» *Aquatic Toxicology* 30, 77-89, 1994. Elsevier.
118. Eurica, M. Nogami., Claudia, C. M. Kimura., Claudenice, Rodrigues., Andrea, R. Malagutti., Ervim, Lenzi., Jorge, Nozaki., «Effects of Dietary Cadmium and Its Bioconcentration in Tilapia *Oreochromis niloticus*» *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 291-295, 2000.
119. Stefania, Gorbi., Claudia Virno, Lamberti., Alessandra, Notti., Maura, Benedetti., Daniele, Fattorini., Ginevra, Moltedo., Francesco, Regoli., «An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea» *Marine Environmental Research* 65, 34–49, 2008. Elsevier.
120. A Box., A Sureda., F Galgani., A Pons., S Deudero., «Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*» *Comparative Biochemistry and Physiology* 146, 531–539, 2007. Elsevier.
121. Zakaria, A. Mohamed., Ahmed, A. Hussein., «Depuration of microcystins in tilapia fish exposed to natural populations of toxic cyanobacteria: A laboratory study» *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 424–429, 2006. Elsevier.
122. Joyce, J. Evans., Craig, A. Shoemaker., Phillip, H. Klesius., «Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone*

saxatilis) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation» *Aquaculture* 189, 197–210, 2000. Elsevier.

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

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

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

126. Leung, K. M. Y., Chu, J. C. W., Wu, R. S. S., «Effect of body weight, water temperature and ration size on ammonia excretion by the aeolated grouper (*Epinephelus areolatus*) and mangrove snapper (*Lutjanus argentimaculatus*)» *Aquaculture* 170, 215-227, 1999.

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

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

129. Virginie, Ducrot., «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, 2005, 384p.

130. J.A, Almeida., E.L.B, Novelli., M Dal Pai Silva., R Alves Junior., «Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*» *Environmental Pollution* 114, 169-175, 2001. Elsevier.
131. Sumpter, J.P., Jobling, S., «Vitellogenesis as a biomarker of eostrogenic contamination of the aquatic environment» *Environ. Health Perspect* 103, 173-178, 1995.
132. Qing, Pana., Sheng, Liu., Yong-Gang, Tan., Yin-Zuo, Bi., «The effect of chromium picolinate on growth and carbohydrate utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus*_*Oreochromis aureus*» *Aquaculture* 225, 421–429, 2003. Elsevier.
133. Anulak, Worratao., Jirawat, Yongsawatdigul., «Purification and characterization of transglutaminase frombTropical tilapia (*Oreochromis niloticus*)» *Food Chemistry* 93, 651–658, 2005.Elsevier.
134. Marchand, J., Quiniou, L., Riso, L., Thebaut, M.T., Laroche, J., «Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Co.ast» *Aquat Toxicol* 70, 327-343, 2004.
135. R.E, Jones., R.J, Petrell., D, Pauly., «Using modified length–weight relationships to assess the condition of fish» *Aquacultural Engineering* 20, 261–276, 1999. Elsevier.
136. Irene, Martins., José, Costa Pereira., Jaime, A. Ramosa., Sven, Erik Jørgensen., «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, 2004. Elsevier.
137. Sloof, W., Van Kreijl, C.F., Baacs, A.J., «Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes on fish from polluted surface waters in the Netherlands» *Aquatic toxicology* 4, 1-14, 1983.
138. Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D., Fontainhas-Fernandes, A., «Toxicological effets of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus* » *J. Pesticide Biochemistry and Physiology* 85, 91-96, 2006. Elsevier.

139. Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., «Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels» *J. Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 177-183, 2005. Elsevier.
140. Randall, D., Eddy, B., Mackinlay, D., «Ion transfert across fish gills» International congress on the biology of fish, University of Aberdeen, Scotland, 2000.
141. Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P., «Effet of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in chanel cat fish» *Aquat.Toxicol* 26,1-22, 1993.
142. Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, M.C., «Histological changes and Copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*." »*Ecotox. and Environ. Safety* 4, 62-72, 1999.
143. Mazon, A.F., Cerqueira, C.C., Fernandes, M.N., «Gill cellular changes induced by Copper exposure in the south american tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*» *Environmental Research Section A* 88, 52-63, 2002.
144. Yuanyuan, S., Hongxia, Y., Jingfei, Z., Ying, Y.n Huahong S., Xiaorong, W., «Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure» *J. Cemosphere* 63, 1319-1327, 2006. Elsevier.
145. Wilding, J., Maltby, I., «Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean» *Environ Toxicol Chem* 25,1795-1801, 2006.
146. Thomas, A.Neubecker., Herbert, E.Allen., «The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters» *Water Res* 17, 1-14, 1983.
147. K. Pynnonen., 1995. «Effect of pH, hardness and maternal pre-exposure on the toxicity of Cd, Cu and Zn to the glochdial larvae of a freshwater clam *Anodonta cygnea*» *Wat. Res* 29, 247-254.

148. R.N, Sylva., «The environmental chemistry of copper (II) in aquatic systems» *Water Research* 10, 789-792, 1976.

149. Laura, E. Petes., Bruce, A. Menge., Gayle, D. Murphy., «Environmental stress decreases survival, growth, and reproduction in New Zealand mussels» *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 351, 83–91, 2007. Elsevier.

150. G, Damiens., E, His., M, Gnassia-Barelli., F, Quiniou., M, Roméo., «Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions» *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(2), 121-128, 2004.

151. Thomais, Vlahogianni., Manos, Dassenakis., Michael, J. Scoullou., Athanasios, Valavanidis., «Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece» *Marine Pollution Bulletin* 54, 1361–1371, 2007. Elsevier.

152. Daniele, Fattorini., Alessandra, Notti., Rossella, Di Mento., Anna Maria, Cicero., Massimo, Gabellini., Aniello, Russo., Francesco, Regoli., «Seasonal, spatial and inter-annual variations of trace metals in mussels from the Adriatic sea: A regional gradient for arsenic and implications for monitoring the impact of off-shore activities» *Chemosphere*, 2008. Elsevier.

153. Rodier, J., «L'Analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaire, eau de mer» Edition DUNOD, Paris.

154. Justyna, Kopecka., Kari, K. Lehtonen., Janina, Barsiene., Katja, Broeg., Pekka, J. Vuorinen., Jens, Gercken., Janusz, Pempkowiak., «Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic)» *Marine Pollution Bulletin* 53, 406–421, 2006. Elsevier.

155. F, Akcha., C, Izuel., P, Venier., H, Budzinski., T, Burgeot., J-F, Narbonne., «Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in

benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*» Aquatic Toxicology 49, 269–287, 2000. Elsevier.

156. Borkovic, SS., Saponjic, JS., Pavlovic, SZ., Blagojevic, DP., Milosevic, SM., Kovacevic, TB., Radojicic, RM., Spasic, MB., Zikic, RV., Saicic, ZS., «The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea» CBP 141, 366-374, 2005.

157. Dellali, M., Roméo, M., Aissa, P., «Suivi de l'activité catalase des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte» Oceanol. Acta 24, 263-271, 2001.

158. Yan, T., Teo, LH., Sin, YM., «Effets of metals on α -amylase activity in the digestive gland of the green mussel, *Perna viridis* L» Bull Environ Contam Toxicol 56, 677-682, 1996.

159. Essedaoui, A., Masse, H., Sif, J., «Etude de l'effet de cadmium sur l'activité de l'estérase C₄, l' α -amylase chez le mollusque *Mytilus galloprovincialis* dans la région de Jorf-Lasfar-El Jadida, Maroc» Bull Inst Sci Rabat 2, 89-94, 1998.

160. C. Nina Steffani., George M. Branch., «Growth rate, condition, and shell shape of *Mytilus galloprovincialis* : responses to wave exposure» Marine Ecology Progress Series 246, 197–209, 2003.

161. Siah, A., Pellerin, J., Amiard, JC., Pelletier, E., Viglon, L., «Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada)» BCP 135C, 145-156, 2003.

162. Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, AM., «A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*)» Environ Toxicol Chem 25, 112-119, 2006.

163. Wen-Xiong, Wang., Philip, S. Rainbow., «Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals» Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2008. Elsevier.

164. Flammarion, P., Pery, A., «Apports de la modelisation des effets toxiques sur l'individu et la population en ecotoxicologie aquatique» *Revue des sciences de l'eau, Rev. Sci. Eau* 17/4, 489-502, 2004.
165. Stello, Casas., Cédric, Bacher., «Modelling trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring» *Journal of Sea Research* 56, 168–181, 2006. Elsevier.
166. José-Manuel, Zaldívar., «JRC Scientific and Technical Reports» European Commission EUR 23626 EN, 2008.
167. Richard, A. Parka., Jonathan, S. Clough., Marjorie, Coombs Wellman., «AQUATOX : Modeling environmental fate and ecological effects in aquatic ecosystems» *ecological modelling* 213, 1–15, 2008. Elsevier.
168. Jerry M. Neff., Stale Johnsen., Tone K. Frost., Toril I. Røe Utvik., Gregory S. Durell., «Oil well produced water discharges to the North Sea. Part II: Comparison of deployed mussels (*Mytilus edulis*) and the DREAM model to predict ecological risk» *Marine Environmental Research* 62, 224–246, 2006. Elsevier.
169. Gérard, Copin-Montégut., «Chimie de l'eau de mer» Institut Océanographiques Paris, ISBN: 2-903581-14-2, 1996. p240.
170. A, Belaud., R, Labat., P, Lim., «Amélioration de la gestion technique des salmonicultures par programmation sur micro-ordinateur» *Bull. Fr Pêche Piscic.* 297, 55-67, 1984.
171. J.T. Smith., «Modelling the dispersion of radionuclides following short duration releases to rivers Part 2. Uptake by fish» *Science of the Total Environment* 368, 502–518, 2006.Elsevier.

