Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Réponses physiologiques et biochimiques du poisson-chat du Mékong Pangasius hypophthalmus (Sauvage 1878) suite à un traitement aux fluoroquinolones

Nkejabega, Noémie

Award date:
2007

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 04. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

REPONSES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DU POISSON-CHAT DU MEKONG *PANGASIUS HYPOPHTHALMUS* (SAUVAGE 1878) SUITE A UN TRAITEMENT AUX FLUOROQUINOLONES

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Noémie NKEJABEGA

Septembre 2007

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Réponses physiologiques et biochimiques du poisson-chat du Mékong *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage 1878) suite à un traitement aux fluoroquinolones

NKEJABEGA Noémie

Résumé

L'utilisation d'antibiotiques est très répandue dans les élevages de pangasius au Vietnam. Toutefois, aucune donnée concernant les réponses physiologiques et biologiques de ces poissons-chats n'est disponible à ce jour.

Dans ce travail, des *P. hypophthalmus* ont été acclimatés pendant 3 semaines, sous conditions de laboratoire, à des densités de 24ind/m^2, 40ind/m^2 et 60ind/m^2. Ils ont ensuite été exposés pendant une semaine à de l'enrofloxacine 99% (antibiotique fluoroquinolone), mélangée à de la nourriture commerciale à raison de 1g/kg, conditions proches de celles rencontrées dans les fermes d'élevage au Vietnam.
Le foie des poissons ainsi que le cerveau et les branchies ont été récoltés à 0h, 72h et au 7ème jour de la période d'exposition et après 24h, 72h et 7 jours de décontamination. Différents dosages ont été effectués (le Glutathion total GSH, la Glutathion S-transférase GST, la Catalase CAT, l'Acétylcholinestérase AChE et la peroxydation des lipides LPO) afin de mettre en évidence des biomarqueurs d'effet de l'exposition à l'antibiotique.
La concentration en glutathion (GSH) et l'activité des différentes enzymes fluctuent significativement dans le temps, cependant, ni la présence de l'enrofloxacine dans les aliments, ni la densité de stockage n'exercent d'influence significative sur les réponses biochimiques analysées chez le *P. hypophthalmus*.

Il serait intéressant, lors d'études ultérieures, de tester l'influence de l'enrofloxacine sur l'activité (EROD), ainsi que de doser les résidus de l'antibiotique dans les muscles du pangasius. L'étude de l'impact d'une exposition à la fluoroquinolone sur la flore bactérienne du poisson pourrait également être envisagée.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2007

Promoteur: P. Kestemont

Arrivée au terme de ce mémoire, je tenais à dire un tout grand MERCI à...

Toute l'équipe URBO et en particulier à mon promoteur, le Professeur Patrick Kestemont, de m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche et donné l'opportunité de me rendre à Can Tho. Merci pour votre suivi, vos conseils et... les Tiger partagées.
Frédéric Sylvestre. Merci -malgré ton planning effrayant- d' avoir pris le temps de nous conseiller (Le Ca Kho Tieu du Mékong : un vrai délice !) et de nous avoir encouragés jusqu'au bout !
Marie-Claire Forget, la « fée du labo » ! Merci de m'avoir soutenue dans les moments de découragement. Sans tes conseils judicieux et petits bouts de chocolats, je n'y serais jamais arrivée !

Tu, for the time you managed to give me when I needed help... Considering you were the busiest soul on campus, I truly appreciate what you did for me.

Ma petite famille. Papa et maman, Merci de nous avoir donné la chance de faire des études, de suivre nos envies, de nous pousser toujours plus loin. Merci de me laisser vivre ces voyages qui changent ma vie, de me soutenir (et supporter) avant, pendant et après... Merci Maïté pour tes jolis dessins et Gilles... parce que j'arrive même pas à imaginer Yser 12 sans toi! ;)

Marie (beira-parce-que-je-ne-t'appelle-jamais-comme-ça) pour les calendriers comiques, les posters tendance, les mots fléchés trop simples, les photos scandaleuses, les magazines de filles, les coups de fil interminables anywhere anytime, les meilleurs conseils du monde,... Pour ces années de folie qu'on a passées ensemble et toutes celles à venir.

... sans oublier tout le staff de l'hôtel « 14 ruelle Sana »**** (dans tous les bons guides).
Plus accueillant tu meurs!

Bertrand Bush Bob... Bia Hoi, Victoria burger, les ♡ sur le siège, Salsa de Noche, Xin Cam on (metro voice), Kong xa Rac, ca phé sua dà, shmoke and a pancake, XO dancing baby...
Merci, parce qu'il n'y a que toi qui peux comprendre tout ça ! Grand plaisir que d'avoir partagé ce voyage mémorable avec toi... les moments de pur Bonheur comme ceux beaucoup plus douloureux...

Aux derniers licenciés URBO -espèce en voie de Distinction- pour ces 2 dernières années passées ensemble. Je n'aurais jamais survécu au 207 si ce n'était pour la bonne ambiance qui régnait entre nous... Merci spécial à Andréééé et santé au vieux couple qu'on forme (!!!).

Johnny, Claire, Fanny, Tho, Andrew and Laure. You guys made "my" Vietnam...
... so precious and intense. *Forward and never Forget*

Laurent, pour ton soutien inconditionnel, tes goût musicaux, cinématographiques, chocolatesques, humoristiques,...

Tous ceux qui se sont intéressés de près ou de loin à mon mémoire, en me répétant
"À chaque fois qu'on mange du *Pangasius*, on pense très fort à toi..."

Et finalement...
À tous les poissons qui ont donné leur corps à la science, encore merci !

Table des matières

I. Introduction

1. Introduction générale....1
2. Le *Pangasius hypophthalmus*....2
   2.1. Répartition géographique....3
   2.2. Cycle de vie....3
   2.3. Aquacluture du *Pangasius hypophthalmus* au Vietnam....4
      2.3.1. Les différents modes de culture....4
         2.3.1.1.Les cages flottantes et enclos....4
         2.3.1.2.Les étangs....4
      2.3.2. Evolution de l'aquaculture du pangasius dans le delta du Mékong....5
   2.4. Maladies rencontrées en élevage....6
   2.5. Effets de l'aquaculture sur l'environnement....6
3. Utilisation d'antibiotiques en aquaculture....7
   3.1. L'enrofloxacine....7
      3.1.1. Structure et propriétés....8
      3.1.2. Mode d'action....9
      3.1.3. Pharmacocinétique de l'enrofloxacine chez certains poissons d'élevage....10
      3.1.4. Législation....11
   3.2. Alternative aux antibiotiques....11
4. Importance de la densité de stockage appliquée en aquaculture....12
   4.1. Conséquences d'une densité de stockage élevée....12
   4.2. Influence de la densité sur *Pangasius hypophthalmus*....13
5. Les biomarqueurs....13
   5.1. Définition....13
   5.2. Les biomarqueurs d'effet, d'exposition et de sensibilité....14
   5.3. Importance des biomarqueurs en aquaculture....14
   5.4. Biomarqueurs couramment utilisés en aquaculture....15
      5.4.1. Le système antioxydant et la peroxydation des lipides (LPO)....15
      5.4.2. L'activité EROD....17
      5.4.3. L'activité Acétylcholinestérase (AChE)....17
6. Objectifs du mémoire....19

II. Matériel et méthodes

1. Schéma expérimental....20
   1.1. Les poissons....20
   1.2. Les tanks....20
2. Période d'exposition....21
3. Echantillonage....21
4. Homogénéisation et préparation des échantillons pour les différents dosages....21
5. Les dosages....22
   5.1. Réalisés au Vietnam (College of aquaculture and Fisheries, CTU)....22
      5.1.1. Dosage des protéines selon la méthode de LOWRY....22
      5.1.2. La peroxydation lipidique (LPO)....22
      5.1.3. La glutathion S-transférase (GST)....23
      5.1.4. La catalase (CAT)....23
      5.1.5. l'acétylcholinestérase (AChE)....24

5.2. Réalisés en Belgique (URBO, Faculté Universitaire Notre-Dame de la Paix Namur)
5.2.1. Le glutathion total (GSH)....24
5.2.2. Mise au point de l'EROD....25
6. Traitement statistique des données....27

III. Résultats....28

1. Déroulement général de l'expérience réalisée au Vietnam....29
2. Contrôle de la qualité de l'eau....30
2.1. La température de l'eau....30
2.2. La concentration en oxygène dissous....30
2.3. Le pH....31
2.4. Les formes azotées....31
3. Dosages des biomarqueurs enzymatiques....33
3.1. Dosage du glutathion (GSH)....33
3.2. Dosage de l'activité glutathion S-transférase (GST)....34
3.3. Dosage de l'activité catalase (CAT)....35
3.4. Dosage de la peroxydation lipidique (LPO)....36
3.5. Dosage de l'activité acétylcholinestérase (AChE)....37

IV. Discussion....38

V. Conclusion et perspectives....45

VI. Références bibliographiques....48

Liste des abréviations utilisées dans ce travail

AChE : acétylcholinestérase
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPs : Peptides antimicrobiens
BSA : Sérum Albumine Bovin
CAT : Catalase
CDNB : 1-chloro-2,-dinitrobenzène
CF : Ciprofloxacine
CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO : diméthylesulfoxyde
DNTB : dithiobisnotrobenzoate
DTT : dithiothreitol
EF : Enrofloxacine
EROD : 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase
FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations
FQ : fluoroquinolone
GPx: Glutathion peroxydase
GR: Glutathion réductase
GSH : gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine ou glutathion
GSSG: Glutathion oxydé
GST: Glutathion S-transférase
IRD: Institut de Recherche pour le Développement
LMR : limite maximale de résidus
LPO : peroxydation des lipides
MDA : malondialdéhyde
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OIE : International Office of Epizootics
PMSF: phenylmethylsulphonylfluoride
RF: 7-éthoxy-O-résorufine
ROS: Reactive Oxygen Species
SOD: superoxyde dismutase
SSA: acide sulfosalycilique
TBARS: Thiobarbituric Acid (Reactice Substance)
TBA: acide thiobarbiturique
TMOP: 1,1,2,3 methylmalonaldehyde
Tris HCl: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochloride
UCT : University Can Tho
WHO : World Health Organization

Première partie : Introduction

I. Introduction

1. Introduction générale

Dans le cadre de mon mémoire, je me suis rendue à Can Tho dans le delta du Mékong au Vietnam. Pendant 3mois, j'ai travaillé en collaboration avec le « College of Aquaculture and Fisheries » de l'Université de Can Tho sur un poisson-chat originaire du Mékong, le *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage 1878).

Le Vietnam, avec un littoral de 3260km de long, plus d'1,7 millions d'hectares d'eaux continentales et un climat tropical, possède des atouts majeurs au bon développement de l'aquaculture d'espèces locales. La production aquacole, toutes espèces et milieux confondus, dépassait déjà le million de tonne en 2005 et pourrait atteindre les 2 millions en 2010 (Ministry of Fisheries, 2003)[1]. La production de *Pangasius* spp. représente à elle seule 30% de ce total et est entièrement localisée dans le delta du Mékong, au Sud du Vietnam (Lazard, 2007).
Depuis une dizaine d'années, et ce grâce à des progrès en matière de recherche (domestication des espèces), de technologie (systèmes d'élevage, alimentation) et des exigences du marché (qualité), cette filière d'élevage a considérablement évolué.

De nos jours, la question de l'utilisation d'antibiotiques dans la pangasiculture vietnamienne constitue un véritable enjeu en terme de qualité (Lazard, 2007) et est inévitable pour assurer au Pangasius un avenir durable sur le marché international. Bien que des cas d'antibiorésistance de la flore bactérienne isolée à partir de poissons d'élevage aient déjà été détectés (Sarter et al., 2006), aucune donnée concernant les réponses physiologiques et biochimiques des *Pangasius hypophthalmus* suite à un traitement antibiotique n'est disponible à nos jours.

[1] www.fistenet.gov.vn

Tableau 1 : Informations d'ordre général sur *Pangasius hypophthalmus*

Classification

Classe : Actinoptérygiens
Ordre : Siluriformes (poissons-chats)
Famille : Pangasiidae
Espèce : *Pangasius hypophthalmus*
Auteur : (Sauvage, 1878)

Environnement

Eau douce uniquement, pH optimal entre 6,5 et 7,5
Température : 22-26°C
Climat : tropical
Distribution : en Asie uniquement (natif des Fleuves Mékong et Chao Phraya)
Habitat : benthopelagique
Migrations : potamodrome

Importance

Régime alimentaire : omnivore
Usage en aquaculture : commercial
Utilisé comme appât : jamais/rarement
Utilisé pour la pêche de loisir : non
Poisson d'ornement : jamais/rarement
Dangerosité du poisson : inoffensif
Électroréception : aucune capacité spéciale

Taille et poids

Longueur maximale : 130cm
Poids maximal : 44kg

Source : Chleng et al., 2004

2. Le *Pangasius hypophthalmus*

En Asie du Sud Est, le fleuve Mékong abrite treize des vingt-huit familles de poissons-chats *Pangasiidae* présentes sur ce continent. Huit espèces présentent un intérêt aquacole, mais dans le Delta du Mékong au Vietnam, seulement deux d'entre-elles sont exploitées à grande échelle : *Pangasius bocourti* et *Pangasius hypophthalmus*.

Pangasiidae d'intérêt aquacole présents dans le Delta du Mékong (Vietnam) :

	Nom vietnamien	Appréciation par les consommateurs	Potentialités pour l'aquaculture [1]
Pangasius krempfi	Ca bong lau	++++	0
P. mekongensis	Ca tra ban	+++/++++	+
P. hypophthalmus	Ca tra	+/++	++++
P. bocourti	Ca ba sa	+++	+++
P. larnaudii	Ca vo dem	+++	+
P. conchophilus	Ca hu	+++	+
P. gigas	Ca tra dau	Espèce rare	0
P. sanitwongsei	Ca vo co	Espèce rare	0

[1] Potentialités pour l'aquaculture :
0 : aucune référence sur l'élevage de l'espèce
+ : seuls *P. hypophthalmus* (++++) et *P. bocourti* (+++) ont fait l'objet d'élevages permettant d'évaluer le potentiel à grande échelle. Pour les autres espèces, seuls des essais très préliminaires ont été effectués (+).

Source : Lazard et al., 2005

Ces deux espèces sont particulièrement appréciées en aquaculture car elles présentent une adaptation unique chez les *Pangasiidae* : une vessie natatoire, utilisée comme organe respiratoire accessoire, qui leur permet de tolérer des déficits en oxygène souvent associés aux importantes densités de stockage et à un faible taux de renouvellement de l'eau (Lazard et al., 2005).
En 1983, Kramer et Mc Clure observèrent des mouvements de remontée en surface du *Pangasius hypophthalmus* qui suggéraient une respiration aérienne. Deux ans plus tard, Browman et Kramer (1985) confirmèrent la présence d'une respiration aérienne chez ce poisson-chat en mesurant la fréquence de remontées en surface par rapport à la concentration en oxygène dissous. Cette fréquence diminuait de 21 à 10,6 remontées par heure quand la concentration en oxygène dissous augmentait de 0,0 à 6,7mg/l.
La dissection du *Pangasius hypophthalmus* indiqua que la vessie natatoire, fortement vascularisée, transformée en poumon, était l'organe respiratoire complémentaire.
Le Tableau 1 reprend des informations d'ordre général sur le *Pangasius hypophthalmus*.

2.1. Répartition géographique

Pangasius hypophtalmus est un poisson-chat tropical, natif de l'Asie du Sud-est. On le retrouve essentiellement dans des eaux dont la température est comprise entre 22 et 26°C caractéristique des milieux tropicaux. Son habitat naturel se situe dans les grands cours d'eau du sub-continent indien comme les fleuves Mékong et Ménam Chao Phraya qui sillonnent le Laos, le Vietnam, la Thaïlande, le Cambodge et le Myanmar, mais il fut introduit au Bengladesh, en Inde, en Indonésie, en Malaisie, à Singapour et au Pakistan.
Les poissons utilisés pour cette étude proviennent d'une ferme de la ville de Thot Not dans la province de Can Tho dans le delta du Mékong.



Delta du Mékong
Province de Can Tho



2.2. Cycle de vie

Pangasius hypophthalmus est un poisson potamodrome. Il remonte les cours d'eau pendant la saison des pluies, quand les fleuves gonflent, pour aller pondre en amont, et les juvéniles dévalent quand le débit du fleuve s'affaiblit, à la recherche d'habitats pour leur croissance.
Les dates de migration varient selon le système hydrique du fleuve en question, mais en ce qui concerne le Mékong, la montaison s'effectue généralement entre les mois de mai et juillet et la dévalaison s'observe de septembre à décembre. C'est ainsi qu'en fin d'année, on peut capturer des juvéniles dans le Delta du Mékong à l'aide de grands filets coniques. Ces jeunes Pangasius sont généralement capturés pour être mis en élevage[2].

[2] www.fishbase.org

2.3. Aquaculture du *Pangasius hypophthalmus* au Vietnam

2.3.1. Les différents modes de cultures

De nos jours, il existe 3 techniques principales de culture au Vietnam ; les étangs, les cages flottantes et plus récemment, les enclos sur les berges du Mékong.

2.3.1.1.Les cages flottantes et les enclos

La culture en cage et la culture en enclos sont toutes les deux des genres de pisciculture en enceinte et demandent que l'organisme soit retenu captif dans un espace clôturé tout en maintenant un échange d'eau permanent.



Source : http://museum.agropolis.fr/english/pages/expos/aliments/poissons/images/pisciculture2.htm

Cependant, les deux méthodes sont distinctes l'une de l'autre.
Une cage est totalement fermée par des filets, la partie supérieure pouvant cependant, dans certains cas, rester libre. Dans la culture en enclos, par contre, le fond de l'enclos est formé par le fond du cours d'eau, du lac ou de la mer où repose l'enclos.
Dans le delta du Mékong, les enclos à poissons sont placés le long de la berge. Cette technique d'élevage remporte un vif succès auprès des programmes de développement car cette culture, praticable dans des masses d'eau existantes, n'engage que des capitaux relativement modestes et sa technologie est simple.

2.3.1.2.Les étangs

Les étangs de grossissement des Pangasius sont généralement conçus pour accueillir une production intensive. Quand les conditions le permettent, ces étangs sont donc profonds (2-3 m) et bénéficient d'un bon renouvellement d'eau. La surface des étangs est variable dans le delta du Mékong : d'une centaine de m^2 pour les petits étangs domestiques à 4 ha pour les grands étangs de production industrielle. Lorsque les intrants ne sont pas limitants, avec un empoissonnement et une alimentation suffisante, le rendement des étangs est conditionné par la qualité de l'eau.

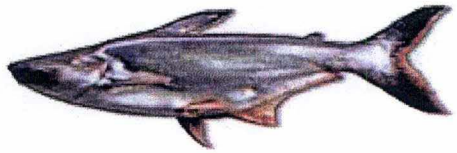


Source : http://www.handsontv.info/series7/04_taking_it_personally_reports/report3.html

2.3.2. Evolution de l'aquaculture du Pangasius dans le delta du Mékong

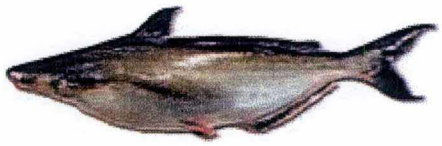
Au milieu des années 90, la production de *Pangasius* dans le delta du Mékong, atteignait les 50 000 tonnes se répartissant en 15 000 à 30 000 tonnes en cages flottantes et 30 000 tonnes en étangs extensifs. La filière était également caractérisée par l'élevage de 2 espèces distinctes correspondant chacune à un système d'élevage et à un marché spécifiques :

- *Pangasius hypophthalmus* élevé en étangs extensifs et destiné au marché local principalement à l'état frais. Ce poisson est caractérisé par une chair jaunâtre, plus ferme que celle de *P. bocourti* et une masse de graisse périviscérale plus faible.



Pangasius hypophthalmus
www.nfi.or.th/nfi/fish/intro.htm.

- *Pangasius bocourti* élevé en cages flottantes et destiné à l'exportation principalement sous forme de filets congelés. Ce poisson est caractérisé par une chair blanche, fondante et par la présence d'une importante passe de graisse périviscérale.



Pangasius bocourti
www.nfi.or.th/nfi/fish/intro.htm

Jusqu'en 1995, l'approvisionnement des élevages de *Pangasius hypophthalmus* et de *Pangasius bocourti* était assuré par la capture de juvéniles dans le milieu naturel. La disponibilité de ces derniers s'avérant rapidement être le facteur limitant au développement de la production, le CIRAD[3], l'IRD[4] et d'autres organismes français et vietnamiens dont l'UCT[5] et AGIFISH[6] décidèrent de collaborer pour mettre sur pied une technique de contrôle de la reproduction en captivité de ces 2 espèces[7].
Ainsi, en 1995, le cycle du Pangasius fut totalement maîtrisé grâce à des traitements hormonaux d'induction de l'ovulation et de la spermiation, associés à la technique de fécondation artificielle (Cacot et Lazard, 1999).
L'application de ces techniques de reproduction en captivité a permis d'augmenter considérablement la production de *Pangasius* et s'est accompagnée d'importantes modifications des pratiques d'élevage notamment sur le plan des espèces produites. La reproduction en captivité a fait apparaître de profondes différences de caractéristiques biologiques entre les 2 espèces. *P.bocourti* (la plus recherchée pour l'exportation) a révélé 3 handicaps majeurs pour une production massive d'alevins en conditions contrôlées : une faible fécondité (5000 à 7000 oeufs par kg de femelle), une maturation complète difficile

[3] CIRAD : centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
[4] IRD : Institut de Recherche pour le Développement
[5] UCT : Université de Can Tho, Vietnam
[6] AGIFISH : entreprise provinciale vietnamienne pour l'aquaculture
[7] http://www.virtualcentre.org/fr/enl/EN1/succes_chat/pchat.htm

Tableau 2 : Exemples d'infections communes du *Pangasius hypophthalmus* en élevage avec leurs symptômes les traitements recommandés et les mesures de prophylaxie.

Nom de l'infection	Agent infectieux	Symptômes	Traitement	Prophylaxie	Remarques
Maladie des points blancs	Ichthyophthirius multifiliis	-Points blancs 0.5 à 1mm sur nageoires, peu et branchies s'élargissant en taches. -Perte de la peau, nageoires réduites -Haute mortalité	-3g d' hydrochloride de quinine dans 300cm^3 d'eau pour un bassin de 100l. -bleu de méthylène 5 mg/litre	Tous les nouveaux poissons sont placés en quarantaine jusqu'à la fin du traitement des poissons infectés.	-Traitement efficace si appliqué immédiatement après l'apparition des premiers points. -Au microscope de dissection, le parasite a un macronucléus en forme distincte de "U".
Entéro-septicémie du poisson-chat	Edwardsiella ictaluri	-Posture particulière en surface 'head-up tail-down' -Peau et base nageoires rouge vif (hémorragie sévère) -Taches dépigmentées évoluant en ulcères cutanés enflammés -Branchies pales -Distension abdominale -Reins et rate hypertrophiés	-Oxytétracycline, mixée à la nourriture (50mg à 75mg/kg de poisson par jour pendant 12 à 14 jours. -**Enrofloxacine** 10mg/kg de poisson par jour pendant 5 ou 10 jours.		-La septicémie entérique du poisson-chat est une infection cyclique qui frappe à la fin du printemps jusqu'au début de l'été et puis en automne -haute mortalité (30-60%)
Trichodinosis	Trichodina sp.	-Substance visqueuse recouvre la peau -Nageoires réduites et dénudées.	Bain de Formaline 250 ml/l d'eau pour 15min.	-Attention spéciale à la qualité de l'eau -Eviter les densités élevées	Infection commune
Dactylogyrus ou helminthose	Dactylogyrus sp. (Plathelminthe, Trématode)	-Branchies pales et gonflées -Importante sécrétion de mucus -couleur sombre -perte de poids (jeûne prolongé) - nage rapide et sauts hors de l'eau	Bain de Masoten de 25 à 30 g/l pour 5 à 10 min.	-Régime approprié -Désinfection avant le stockage (CaO) -Mise en quarantaine	Mortalité élevée

Source: www.fishbase.org

nécessitant un traitement hormonal et finalement, un élevage larvaire inféodé à des structures intensives avec première alimentation à base de proies vivantes (Hung et al., 2001).
Le *P. hypophthalmus* s'est montré bien plus performant avec une fécondité élevée (70 000 oeufs par kg de femelle), une bonne maturation en captivité et une bonne survie en élevage larvaire extensif en étang fertilisé.
En quelques années, le *P. hypophthalmus* s'est substitué à *P. bocourti* en tant que principale espèce d'élevage en cages flottantes destinée à l'exportation. De nos jours, P. bocourti n'est plus élevé que marginalement et P. hypophthalmus constitue plus de 95% des *Pangasius* exportés (Lazard, 2007).

2.4. Maladies rencontrées en élevage et mesures prises

Tous les groupes connus de parasites affectent le *Pangasius hypophthalmus* et selon leur localisation sur l'hôte, on distingue les ectoparasites qui vivent sur le tégument et/ou les branchies, les mésoparasites dans le système digestif et les endoparasites que l'on retrouve dans les cavités ou tissus du corps (Euzet et Pariselle, 1996). De nos jours, 12 infections touchant le *P. hypophthalmus* ont été rapportées. Le Tableau 2 reprend les plus communes ainsi que les traitements recommandés.
L'entéro-septicémie du poisson-chat causée par la bactérie *Edwarsiella ictaluri* fut découverte en 1979 par Hawke dans les élevages du poisson-chat américain (*Ictalurus punctatus*) aux États-Unis mais la première infection des élevages de *P. hypophthalmus* au Vietnam eut lieu en 1999 (Dung dans Ferguson et al., 2001). Aux USA, où cette infection engrange des pertes économiques importantes, les éleveurs utilisent déjà des vaccins contre la septicémie (Klesius et Shoemaker, 1999) mais au Vietnam, seul l'usage des antibiotiques (oxytétracycline et enrofloxacine) est pratiqué.

2.5. Effets de l'aquaculture sur l'environnement

L'accélération du développement de l'aquaculture a des impacts plutôt négatifs sur l'environnement. La destruction de mangroves en Asie du Sud-est (Fromard et al., 2002), les changements de régimes hydrologiques par détournement des fleuves[8] et l'augmentation des blooms algaux (red tides) due à la décharge élevée de matière organique dans les eaux côtières (Maclean, 1993) en sont quelques exemples. Le problème majeur en aquaculture se situe au niveau de la gestion des déchets.
Premièrement, il est très difficile de prévoir la quantité optimale de nourriture à fournir aux poissons et les surplus alimentaires constituent dès lors une grande partie des déchets.
Deuxièmement, les déchets provenant des élevages en cages ou enclos, qu'ils soient des surplus alimentaires ou d'origine fécale, sont vites dispersés dans le milieu (Cho et al., 1994). Ces solides en suspension sont principalement composés de carbone, d'azote et de phosphore (C,N,P). Cet enrichissement en nutriments permet la multiplication rapide des végétaux aquatiques (blooms) avec comme résultat une chute de la concentration en oxygène dissous, c'est ce qu'on appelle l'eutrophisation du milieu. L'importance de l'impact varie d'un simple enrichissement de l'eau à la formation de couches de sédiments anoxiques et la disparition d'organismes aquatiques aérobies (insectes, crustacés, poissons, et végétaux) dont la décomposition, consommatrice d'oxygène, amplifie le déséquilibre.

[8] Symposium sur l'aquaculture en Afrique sur http://www.fao.org/docrep/005/AC672B/AC672B07.htm

Tableau 3 : Principaux antibiotiques utilisés en aquaculture, leur mode d'administration et leur importance en médecine. (WHO, 2005)

Antibiotiques (Classe)	Administration	Importance en médecine
Amoxicilline (aminopenicillines)	Oral	Extrêmement important
Ampicilline (aminopenicillines)	Oral	Extrêmement important
Cloramphénicol (amphénicoles)	Oral, bain, injection	Important
Florfenicol (amphénicoles)	Oral	Important
Erythromycine (macrolides)	Oral, bain, injection	Extrêmement important
Streptomycine, neomycine (aminoglycosides)	Bain	Extrêmement important
Furazolidone (nitrofuranes)	Oral, bain	Important
Nitrofurantoïne (nitrofuranes)	Oral	Important
Acide oxilinique (quinolones)	Oral	Extrêmement important
Enrofloxacine (fluoroquinolones)	**Oral, bain**	**Extrêmement important**
Fluméquine(fluoroquinolones)	Oral	Extrêmement important
Oxytetracycline (tetracyclines)	Oral, bain, injection	Très important
Sulphonamide (sulphonamides)	Oral	Important

A ces déchets d'origine organique viennent s'ajouter les compléments alimentaires (vitamines antioxydantes et pigments), les traitements thérapeutiques (antibiotiques) et autres produits chimiques (herbicides, antiparasitaires,...) (Eng et al., 1989).

En règle générale, pour assurer un poisson de bonne qualité et réduire l'impact écologique, il faut que l'empoissonnement soit ajusté à la capacité d'auto-épuration du milieu, que le renouvellement d'eau soit ajusté à la qualité de l'eau et que l'on s'oriente vers une polyculture avec des poissons filtreurs et benthophages pour éviter la prolifération de phyto- et zooplancton.

3. Utilisation d'antibiotiques en aquaculture

L'utilisation et la diversité de produits chimiques en aquaculture ont augmenté parallèlement au développement de la production aquacole de ces dernières décennies (Rapport FAO/OIE/WHO, 2006).[9] En aquaculture, les stratégies de contrôle des maladies infectieuses sont similaires à celles utilisées dans d'autres secteurs de production animale et les éleveurs utilisent donc également des antibiotiques. La plupart des agents bactériens utilisés en aquaculture ont été conçus, à la base, pour être utilisés en médecine et médecine vétérinaire. Le Tableau 3 présente des antibiotiques couramment employés en médecine et adopté, par la suite, en aquaculture (WHO, 2005).

Les ulcères de la peau et les septicémies (comme l'entéro-septicémie du poisson-chat) sont des infections piscicoles couramment traitées par agents antibactériens qui sont soit directement injectés au poisson, incorporés à la nourriture (administration orale) ou placés dans l'eau (administration par bain) ce qui résulte en la dispersion des agents antibactériens dans l'environnement. Les risques encourus par l'utilisation d'antibiotiques dans un écosystème aquatique comprennent le développement et la répartition de souches bactériennes résistantes, des résidus de xénobiotiques dans les produits aquacoles destinés à la consommation et un impact négatif sur l'environnement (Hölstrom et al., 2003).
De nos jours, la question de l'utilisation d'antibiotiques dans la pangasiculture vietnamienne constitue un véritable enjeu en terme de qualité (Lazard, 2007) et est inévitable pour assurer au Pangasius un avenir durable sur le marché international. Bien que des cas d'antibiorésistance de la flore bactérienne isolée à partir de poissons d'élevage aient déjà été détectés (Sarter et al., 2006), il n'y a encore aucune donnée disponible concernant le comportement et les effets des antibiotiques utilisés sur le *Pangasius hypophthalmus*.

3.1. L'enrofloxacine

L'enrofloxacine (EF), une fluoroquinolone (FQ) dérivée de l'acide nalidixique, est un antibiotique largement utilisé en médecine et médecine vétérinaire grâce à son large spectre d'activité (Otero et al., 2001). La famille d'antibiotiques quinoléiques a été découverte en 1962 par Lesher qui a isolé l'acide nalidixique à partir d'une préparation de chloroquine destinée au traitement du paludisme. Depuis, plus de 10 000 dérivés ont été synthétisés et

[9] FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nation
WHO : World Health Organization
OIE : International Office of Epizootics

Tableau 4 : Elargissement du spectre d'activité de l'enrofloxacine, une fluoroquinolone, par rapport à celui de l'acide nalidixique, une quinolone. (Martindale, 1996)

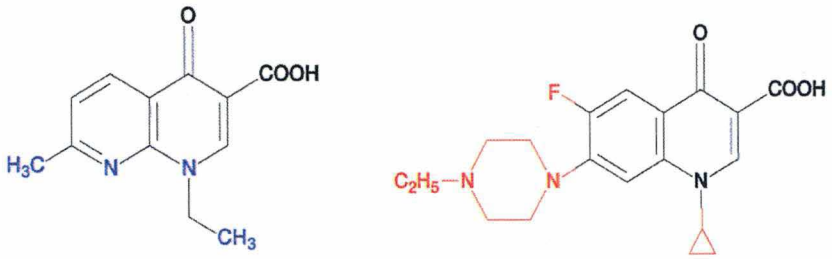
	Gram Positif			**Gram Négatif**		
Bactéries	*Clostridium*	Staphylocoques Streptocoques	*Corynebacterium*	*Pasteurella*	*E.Coli*	*Pseudomonas spp.*
Acide nalidixique	R	R	R	HS	MS	R
Enrofloxacine	R	HS	HS	HS	HS	I

R : résistante ; I : intermédiaire ; HS : habituellement sensible

l'EF, synthétisée en 1988 par des chercheurs du groupe Bayer®, fait partie de la deuxième génération de quinolones : les fluoroquinlones (Andriole, 2005).
L'enrofloxacine reçoit une attention grandissante en pisciculture pour son potentiel à traiter les infections communes qui touchent les élevages et ce, à une faible Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)[10] pour la plupart des pathogènes rencontrés en aquaculture (Samuelsen, 2006).

3.1.1. Structure et propriétés

Tout comme l'acide nalidixique, quinolone dont elle dérive, l'EF possède deux cycles aromatiques accolés, une fonction cétone et une fonction carboxylique.



Structure de l'acide nalidixique et de l'enrofloxacine.
www.poultry.baytril.com

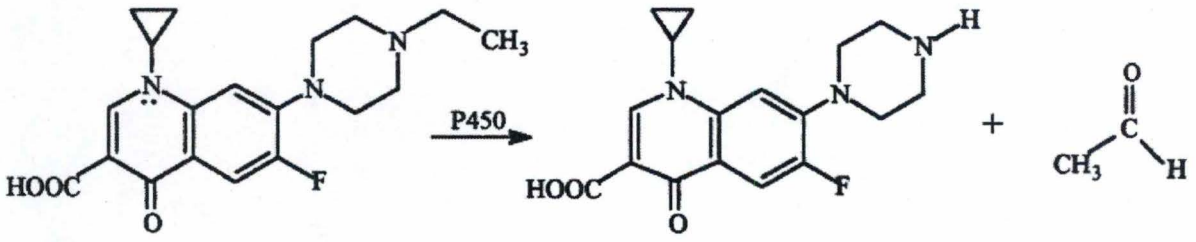
Les groupes C=O coplanaires sont généralement requis pour l'activité antimicrobienne des fluoroquinolones. Ces groupes confèrent aux FQ des propriétés chélatrices et ces dernières peuvent dès lors fixer des cations bivalents comme le magnésium et le cuivre. En 1998, Lecomte et al., 1998 ont mis en évidence l'importance de ces cations sans lesquels, les fluoroquinolones se lient préférentiellement à de l'ADN simple brin et ne peuvent effectuer aussi efficacement leur activité antibactérienne. Ce potentiel chélateur joue donc un rôle dans l'activité antibactérienne des FQ car elle permet le blocage de l' ADN gyrase des procaryotes.

Différentes substitutions sur le noyau « quinolone » ont permis d'améliorer l'efficacité de l'enrofloxacine. Ainsi, l'introduction d'un atome de fluor améliore l'efficacité de la molécule contre les bactéries Gram négatives et élargit le spectre d'action aux bactéries gram positives. Quant au cycle pipérazinique, il permet d'élargir encore le spectre d'activité contre les organismes de type *Pseudomonas* (Tableau 4).

[10] CMI: Concentration Minimale Inhibitrice : plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C (Archambaud, 2000).

Tant chez les mammifères que chez les non mammifères, l'enrofloxacine est métabolisée en ciprofloxacine par le cytochrome P450, au niveau du foie. Ce métabolite est également un antimicrobien utilisé en médecine générale (Bergan et al., 1988). Les études de Gürbay et al. (2001) ont montrés que le métabolisme des fluoroquinolones planes par le P450, générait des radicaux libres intermédiaires pro-oxydants qui pouvaient causer des dommages au niveau des membranes cellulaires en oxydant les lipides ou encore dégrader les protéines cytosoliques.

Oxidative deethylation of enrofloxacin



ENROFLOXACIN **CIPROFLOXACIN**

Source: Vaccaro et al., 2003

3.1.2. Mode d'action

Grâce à la présence d'une fonction amine tertiaire de force acido-basique comparable à la fonction carboxylique, les fluoroquinolones sont des molécules amphotères, liposolubles et capables de pénétrer les tissus et les déchets organiques. Elles diffusent passivement dans les cellules via les porines et bloquent la croissance bactérienne en inhibant les ADN topo-isomérases, principalement la sous-unité α de la topo-isomérase II ou ADN gyrase, mais également, de la topo-isomérase IV dans certaines espèces bactériennes.
Les topo-isomérases sont des enzymes impliquées dans le super-enroulement et la stabilité de la molécule double-brin d'ADN. La fonction de l'ADN gyrase est de former des supertours dans la double hélice et ainsi lui donner sa forme tridimensionnelle et hautement condensée que l'on rencontre habituellement dans une cellule. Pendant la création des supertours, les 2 brins d'ADN sont clivés par la gyrase à un site spécifique de 4 paires de bases qui forme également une « quinolone binding pocket ».
Deux molécules d'enrofloxacine peuvent former un dimère dans cette « poche » et se lier électrostatiquement au complexe « gyrase-ADN » bloquant ainsi une étape intermédiaire à la formation des supertours. Ces clivages dans les brins d'ADN induisent la synthèse de nucléases, enzymes réparatrices qui n'avancent pas toujours de manière coordonnée, ce qui crée des dommages irréparables dans la séquence d'ADN et entraîne la mort cellulaire.
Les bactéries sont une cible idéale pour l'enrofloxacine car la gyrase, absente chez les eucaryotes, est une enzyme essentielle chez les procaryotes (Huet et al., 2006).

Tableau 6 : Activités monooxygénases des microsomes hépatiques du bar (*Dicentrarchus labrax*) après exposition à des multi doses d'enrofloxacine de 1mg/kg (3 injections/jour) et à une dose unique de 3mg/kg (1 injection/jour)

Paramètres	Activité				
	Contrôle	Multi doses de 1mg/kg	**% inhibition**	Dose unique de 3mg/kg	**% inhibition**
Cytochrome P450	164±27	126±44	**23**	122±41	**25**
Aminopyrine N-demethylase	921±120	525±70*	**43**	405±63*	**56**
Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)	183±70	27±4*	**85**	26±7*	**86**
7-Ethoxycomarin-O-deethylase (ECOD)	27±9	6±3*	**78**	4±2*	**85**
Erythromycin N-demethylase	1162±200	253±61*	**79**	206±83*	**82**
6β-T hydroxylase	26±8	6±2*	**77**	5±3*	**81**

Ces données sont des moyennes±E.T. (Ecart-Type) de 4 expériences. Les microsomes d'un seul poisson sont utilisés par expérience. La concentration en protéine pour le P450 est exprimée en pmol/mg protéine et les activités enzymatiques en pmol/min/mg protéine. *Significativement différent des microsomes contrôles d'après les test de Student, $P<0,01$

Source: E.Vaccaro et al., 2003

3.1.3. Pharmacocinétique de l'enrofloxacine chez certains poissons d'élevages.

Il est important que les traitements thérapeutiques prescrits possèdent une efficacité maximale et ainsi permettent de minimiser le risque de pathogènes résistants. C'est pourquoi l'étude des propriétés pharmacocinétiques des agents antibactériens utilisés est un outil très important pour l'établissement d'un dosage optimal. Bien que l'enrofloxacine reçoive une attention grandissante pour sa potentielle efficacité à traiter les infections rencontrées en pisciculture, très peu de données relatives à son métabolisme et comportement pharmacocinétique sont disponibles pour les poissons d'élevage. (Lewbart et al., 1997) Le Tableau 5 (page suivante) reprend le comportement de l'enrofloxacine pour quelques espèces d'élevage.
Les différentes études menées sur la pharmacocinétique de l'enrofloxacine ont montré que si cette dernière est relativement lentement assimilée et éliminée, elle est très bien distribuée dans les différents tissus et ce, pour des périodes prolongées qui permettent une protection globale, tant lors d'infections généralisées (septicémies) que locales, contre les agents bactériens (Stoffregen et al., 1997). Néanmoins, c'est dans le foie que l'on retrouve les plus hautes concentrations d'enrofloxacine, ce qui concorde avec le rôle de cet organe dans le métabolisme de l'antibiotique (Intorre et al., 1997).
Aux doses appliquées dans les études menées sur différentes espèces de poissons présentées dans le tableau 5, l'enrofloxacine se retrouve toujours en concentration supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI)[11]. En moyenne, les bactéries infectieuses en pisciculture ont une CMI pour l'enrofloxacine de 0,16 µg/ml plasma (Bowser et House, 1990). Ce qui signifie qu'aux doses employées dans les différentes études, peu importe le mode d'administration, on obtient des concentrations plasmatiques d'enrofloxacine aux vertus thérapeutiques (exemples de C_{96h} : 36µg/ml plasma ; 0,2µg/ml) (Intorre et al., 2000 ; Lewbart et al., 1997).

Le métabolisme de l'enrofloxacine a été étudié chez différentes espèces animales (rats, poulets et alligator américain) (Mayeaux et Winston, 1998 ; Schlosberg et al., 1995; Vancutsem et Babish, 1996) et chez les humains (Fuhr et al., 1990). Il en est ressorti que l'antibiotique induisait une inhibition de l'activité du cytochrome P450 (système de détoxification des drogues) lorsque des multi-doses de 10mg/kg et plus sont administrées.

L'article de Vaccaro et al. (2003) montre qu'une dose unique d'enrofloxacine de 3mg/kg ou des multi-doses de 1mg/kg sont suffisantes pour causer une dépression générale de l'activité du cytochrome P450 chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) (Tableau 6). En 1997, Moutou et al. s'étaient déjà penchés sur la réponse du P450 de la truite arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*) après une exposition à l'acide oxolinique et à la fluméquine, deux quinolones et ils avaient également souligné leur action inhibitrice au niveau du cytochrome, réversible et dépendante du temps d'exposition et de la dose administrée.
Les quinolones dont l'enrofloxacine, sont aujourd'hui considérées comme des inhibiteurs du système de détoxification des drogues. Les inhibiteurs du P450 ne modifient pas la quantité d'enzymes produites, ils réduisent l'activité de celles-ci ce qui a pour effet d'augmenter la toxicité du xénobiotique (Beasley, 1999).

[11] CMI: Concentration Minimale Inhibitrice : plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique (Archambaud, 2000)

Tableau 5 :

Espèce	T° (°C)	Administration	Dose Enroflo. (mg/kg)	T½ vie (h)	C_{Max} enrofloxacine	T_{max} (h)	Evolution [enroflo] Dans le plasma	C_{Max} ciprofloxacine	T_{max} (h)	Source
Salmo salar	9,7	Intra artérielle (aorte dorsale)	10	130,6	14,38µg/g de branchies	19,35				Stoffregen et al., 2006
		Intrapéritonéale		34,32	21,14µg/g de rein	100,8				
		Intramusculaire		84,98	17,58µg/g de rein	91,2				
		Orale	10	105,11	9,23µg/g de rein	105,6				
			5	48,24	5,70µg/g de rein	86,4				
Dicentrarchus labrax	15	Orale	5	25	1,39µg/ml de plasma	8	0,36µg /ml à 96h	~0		Intorre et al., 2000
Colossoma brachyponum	25	Intramusculaire	5	28,9	1,64µg/ml de plasma	4	0,2µg /ml à 96h	0,05µg/ml plasma	4	Lewbart et al. 1997
		Orale	5		0,8µg/ml de plasma	36	0,19µg /ml à 96h	0,02µg/ml Plasma	36	
Silurus asotus	25	Intraveineuse	10	17,44			0,36µg/ml à 72h	0,17µg/ml plasma	0,18	Kim et al., 2006
		Orale	10	34,13	1,02µg/ml de plasma	3,44	0,14µg/ml à 72h	0,04µg/ml plasma	6,67	
Sparus aurata	27	Intraveineuse	2,5		0,38µg/ml de plasma	4h	0,087µg/ml à 120h	Non détectée		Della Rocca et al., 2004
		Orale	10		2,84µg/ml de plasma	8	0,149µg/ml à 120h	Non détectée		
Oreochromis niloticus		Orale	50		5,96µg/g de foie		Disparition en 22jours	0,22µg/g muscle		Weihai Xu et al., 2006

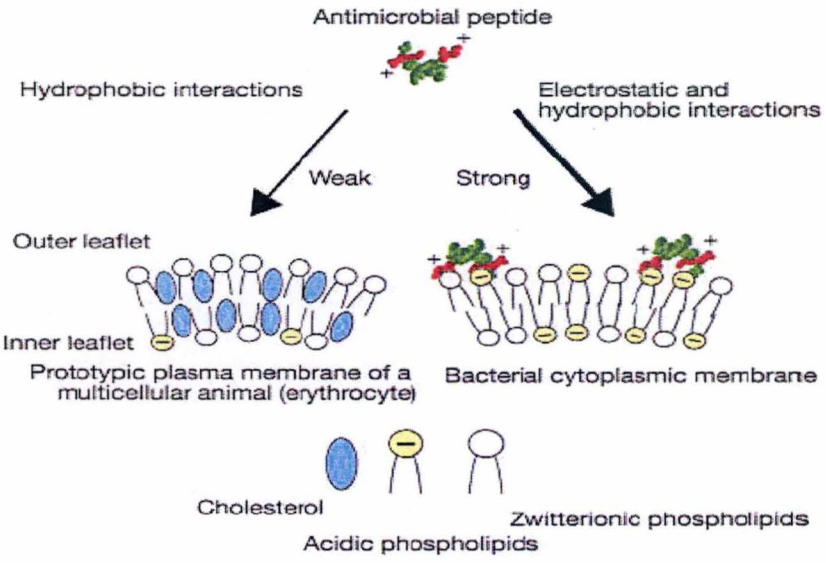


Figure 1: La cible membranaire des AMPs, base de leur spécificité (Zasloff, 2002).
Le feuillet externe de la bicouche membranaire des cellules bactérienne comprend des phospholipides chargés négativement alors que ce même feuillet chez les plantes et animaux est neutre. Les AMPs, étant chargés positivement, vont se lier préférentiellement aux phospholipides bactériens.

Avec référence à la chimie de l'eau, les quinolones sont moins biodisponibles dans les poissons d'eau de mer que les poissons d'eau douce. Les contraintes d'osmorégulation forcent les poissons d'eau de mer à boire énormément, en conséquence, le pH de leur estomac est élevé, et on y retrouve plus de cations que chez les poissons dulcicoles. Sous conditions salines, les quinolones ont un haut degré d'ionisation et forment des complexes avec les cations, ce qui réduit la biodisponibilité de la molécule (de 2 à 5 fois) (O'Grady et al., 1988 ; Ingebrigtsen, 1991 ; Burka et al., 1997 dans Intorre et al., 2000).

3.1.4. Législation

D'après les règlements 315/93CE et 466/2001CE de la Communauté Européenne (CE), les antibiotiques, telles les quinolones, sont considérés comme contaminants. Pour ces substances, entres autres, la CE se voit de fixer des limites maximales de résidus (LMR) dans les aliments d'origine animale. Une LMR est une concentration de résidus qui peut demeurer dans les tissus d'un animal destiné à l'alimentation (ou ses produits alimentaires, ex : le lait) à qui l'on a administré des médicaments vétérinaires. Cette limite représente la quantité de résidus qui, croit-on, peut être consommée quotidiennement par un être humain tout au long de sa vie sans que cela n'ait d'effets indésirables sur sa santé.
La limite maximale de résidus (LMR) autorisée pour l'enrofloxacine et son métabolite, la ciprofloxacine, est fixée à 100µg/kg pour toutes les espèces productrices d'aliments. Pour les poissons, cette LMR est vérifiée sur les muscles et la peau dans des proportions naturelles (Annexe 1 du règlement CEE 2377/90 du conseil, du 26 juin 1990 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale).

Au Vietnam, la directive 26/2005/QD-BTS délivrée le 18 août 2005 par le ministère des pêches interdit l'usage de 11 antibiotiques de la famille des fluoroquinolones –dont l'enrofloxacine et ciprofloxacine- dans les élevages aquacoles destinés à l'exportation vers les États-Unis et le Canada car ceux-ci ne tolèrent aucun résidu de l'antibiotique (0µG/kg alors que l'Europe accepte 100µg/kg).

3.2. Alternatives aux antibiotiques

L'impact des antibiotiques sur l'environnement, l'émergence de souches de bactéries résistantes et le risque sanitaire lié aux résidus de ces molécules dans les animaux destinés à l'alimentation ont poussé la communauté scientifique à se tourner vers d'autres moyens de protection contre les infections bactériennes. Voici quelques exemples d'alternatives aux antibiotiques.

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des molécules naturelles, végétales ou animales, possédant une action antibactérienne qui pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique dans le combat de micro-organismes infectieux, leur large spectre d'activité permettant d'envisager des applications pour le traitement des infections bactériennes et fongiques (Sarter pour projet du Cirad, 2006). Les AMPs ont pour cible une différence fondamentale dans la structure de la membrane cellulaire des bactéries et des pluricellulaires (voir Figure 1). Une dépolarisation de la membrane, la création de trous qui laisseraient s'échapper le contenu cellulaire, l'activation d'hydrolases sont quelques hypothèses quant à la mise à mort de la cellule bactérienne par les AMPs (Zasloff, 2002).

Tableau 7 : Antigènes disponibles, acceptés et commercialisés pour poissons et crustacés selon leur répartition géographique.

Antigen	Available region and target species		
	Europe/North America	Mediterranean	Asia
Aeromonas salmonicida	Salmonids		
Vibrio anguillarum	Salmonids	Seabream/Seabass	*Seriola* spp.
V. salmonicida	Salmonids		
V. viscosus (Moritella viscosa)	Salmonids		
V. ordalii	Salmonids		
Yersinia ruckerii	Salmonids		
Renibacterium salmoninarum	Salmonids		
Flexibacter columnarae	Salmonids		
Piscirickettsia salmonis	Salmonids		
Lactococcus garvieae	Salmonids	Seabream/Seabass	*Seriola* spp.
Streptococcus iniae	Salmonids	Seabream/Seabass	
Pasteurella piscicida (*Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*)		Seabream/Seabass	
Edwardsiella ictaluri	Catfish		
V. harveyi			Shrimp
V. parahaemolyticus			Shrimp
V. alginolyticus			Shrimp
V. vulnificus			Shrimp
IPNV	Salmonids		
IHNV	Salmonids		
ISAV	Salmonids		
VHSV	Salmonids		
SPDV	Salmonids		
GCRV			Grass Carp
Iridovirus			*Seriola* spp.

IPNV: Infectious pancreatic necrosis virus; IHNV: infectious haematopoietic necrosis virus; ISAV: infectious salmon anemia virus; VHSV: viral haemorrhagic septicaemia virus; SPDV: salmon pancreatic disease virus; GCRV: grass carp aquareovirus

La vaccination est également une alternative aux antibiotiques. Parmi leurs avantages, les vaccins fournissent une protection à long terme et ne laissent aucune trace de résidus dans le produit animal ou l'environnement. Malgré tout, en Asie (excepté au Japon), l'utilisation des vaccins n'est pas encore répandue. Cela est dû au manque d'information sur les maladies et sur le système immunitaire des espèces élevées dans cette région. La majorité des vaccins développés sont dédiés à l'aquaculture d'espèces « non exotiques » (Voir Tableau 7). De plus, la plupart des fermes d'élevage sont de petites tailles avec de faibles moyens techniques et les éleveurs se penchent plus facilement vers un traitement aux antibiotiques, largement disponible, que vers un traitement préventif. Enfin, le développement et la commercialisation de vaccins demande un tel investissement que très peu de compagnies, pour le moment, se sont spécialisées dans le secteur « asiatique » (Grisez et al., 2005).

Les probiotiques sont une autre alternative. Ce sont des micro-organismes non pathogènes, tels que *Bacillus* sp., qui entrent en compétition avec les bactéries pathogènes pour les nutriments et l'espace (Holström et al., 2003). Dans certains cas, ils peuvent même sécréter des antibiotiques naturels auxquels les autres bactéries ne sont pas résistantes (Moriarty, 1998).

4. Importance de la densité de stockage appliquée en aquaculture

La densité appliquée dans un élevage détermine largement la production cet élevage (Rahman et al., 2006). Une trop faible densité ne permet pas une optimisation de l'utilisation de l'espace alors qu'une densité trop élevée est un facteur de stress qui mène à une augmentation de la demande énergétique de l'espèce et donc, à une réduction du taux de croissance et de consommation de nourriture (Leathreland et Cho, 1985 dans Islam et al., 2006). Dans les deux cas, cela signifie une perte de rendement pour l'éleveur. Définir la densité de stockage optimale pour une espèce donnée est donc une étape critique dans l'établissement d'un système d'élevage rentable.

4.1. Conséquences d'une densité de stockage élevée

Diverses études ont mis en avant l'impact de densités élevées sur les poissons d'élevage. Ces derniers, soumis à des manipulations fréquentes et des densités plus élevées qu'en milieux naturels, sont soumis à des situations de stress répétées qui peuvent avoir des conséquences plus ou moins importantes sur leurs performances, aussi bien au niveau de leur croissance que sur la reproduction ou la résistance aux agents pathogènes (Vandeputte et al., 2002).

Chez les poissons, la partie centrale de la réponse de stress est constituée par l'activation du système sympathético – chromaffine (libération d'acétylcholine par les neurones du système nerveux sympathique et libération de sérotonine par les neurones innervant le tissu chromaffine de la médullosurrénale) et la stimulation concomitante de l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénale (HPA) qui conduit à une libération importante de cortisol (Wandelaar Bonga, 1997). Ce dernier, considéré comme un indicateur général de stress, induit différentes réponses physiologiques telles que l'augmentation du rythme cardiaque, de la capture et du transfert de l'oxygène ; la mobilisation des substrats énergétiques au détriment de la croissance et de la reproduction (modification du métabolisme des graisses par une

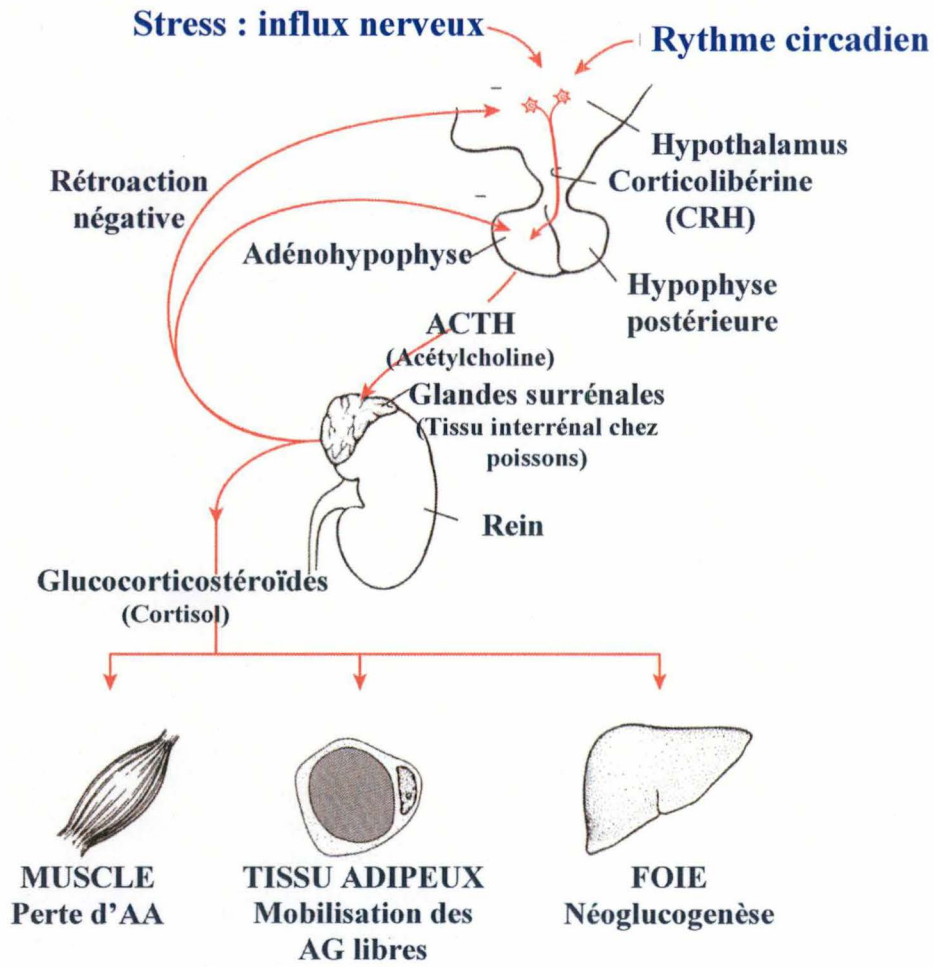


Figure 2 : Réponse de l'axe hypothalamus-hypophyse-interrénale (HPA). Synthèse de cortisol et ses effets au niveau musculaire, hépatique et lipidique.

Tableau 8 : Comparaison de la densité appliquée, du poids initial des juvéniles (fingerlings), du rendement et du taux de mortalité dans les différents modes d'élevage au Vietnam.

Structure	N [a]	Empoisson[t] [b]	Poids initial des fingerlings [c]	Rendement [d]	Mortalité
Etang peu renouvelé	5	18 f/m2	29 g (34 f/kg)	200-350 t/ha/an	-
Etang moyen[t] renouvelé	4	25 f/m2	11 g (88 f/kg)	500-600 t/ha/an	4-25 % (maladie)
Etang bien renouvelé	3	25-40 f/m2	5-100 g (200-10 f/kg)	600-650 t/ha/an	10-15 %
Enclos	2	50-75 f/m2	17-40 g (60-25 f/kg)	> 1000 t/ha/an	10%
Cage	4	110 f/m3	100 g (10 f/kg)	14-17 kg/m3/mois	10-30 %

Note : la durée moyenne de l'élevage de grossissement est de 7 mois.

[a] : nombre d'unités d'élevage considérées,

[b] : exprimé en nombre de fingerling « f » par unité de surface ou de volume,

[c] : poids unitaire des fingerlings (moyenne ou min-max), entre parenthèses : nombre de fingerling par kilo de fingerlings correspondant (unité utilisée localement).

[d] : rendement exprimé dans les unités conventionnelles pour les étangs et les cages.

Source : Cacot et Lazard 2005

mobilisation des triglycérides, la fonte des muscles par désamination des acides aminés et l'induction de la néoglucogenèse au niveau du foie pour faire face à la demande énergétique accrue associée au stress de densités élevées (Vijayan et al. 1990 et Leatherland et Cho, 1987 dans Islam et al., 2006) (voir Figure 2), mais le stress aurait également un effet immunosuppresseur (Wendelaar Bonga, 1997).

4.2. Influence de la densité sur *Pangasius hypophthalmus*.

Les effets de la densité de stockage sur la croissance, la survie et le rendement du *Pangasius hypophthalmus* ont été étudiés sur des juvéniles élevés en cages (Islam et al., 2006) et en étangs (Chowdhury et al., 2002). Une étroite corrélation entre la densité et le rendement de l'élevage en est ressortie. En effet, même si les poids individuels des poissons suivent une relation inverse, les biomasses les plus élevées sont atteintes dans les cages ou étangs les plus peuplés. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres espèces de poissons-chats (Teng et Chua, 1979, Hogendoom et Koops, 1983, Storck et Newman, 1988 et Engle et Valderrama, 2001 dans Chowdhury et al., 2002).
Les études ont aussi mis en évidence qu'il n'y avait pas de différence significative entre les taux de mortalité à faible et à haute densité (Islam et al., 2006). En 1983, Hogendoom et Koops (dans Hengsawat et al., 1997) ont rapporté que le taux de survie du poisson-chat africain *Clarias gariepinus* n'était pas influencé par la densité. Daungsawasdi et al. (1986) ont suivi en disant que la mortalité du tilapia du Nil *Clarias gariepinus* élevé en cages ne dépendait pas de la densité.
Nous pouvons penser que le la respiration aérienne du *Pangasius hypophthalmus* le rend probablement plus tolérant aux densités élevées et ainsi, moins sujets à des taux de mortalité élevés dans ces conditions. Cependant, il faut traiter cette information avec précaution car à des densités très élevées, les pathogènes virulents se répandent plus rapidement, le comportement des poissons peu changer brusquement,... ce qui résulterait en une mortalité sévère (Cruz et Ridha, 1991). Le Tableau 8 compare la densité, le rendement et le taux de mortalité des différents modes d'élevage.

5. Les biomarqueurs

5.1. Définition

Le suivi de la qualité de l'environnement fait appel à deux types de méthodes : *l'approche physico-chimique* qui se base sur des indices telles des valeurs seuil de pH, température, conductivité, taux de matière organique, taux de saturation en oxygène dissous,... et *l'approche biologique* qui tente d'évaluer l'exposition des organismes aux facteurs de stress et ses répercussion au niveau de l'individu, de la population et de la communauté (Lagadic, 2001). Tout comme l'approche physico-chimique, l'approche biologique possède ses propres indices et, en écotoxicologie, les chercheurs étudient de plus en plus souvent les réponses des organismes face à un ou plusieurs contaminants présents dans l'environnement.
Ces réponses, définies comme *biomarqueurs*, constituent un changement observable et/ou mesurable au niveaux 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 (Lagadic et *al.*, 2001).

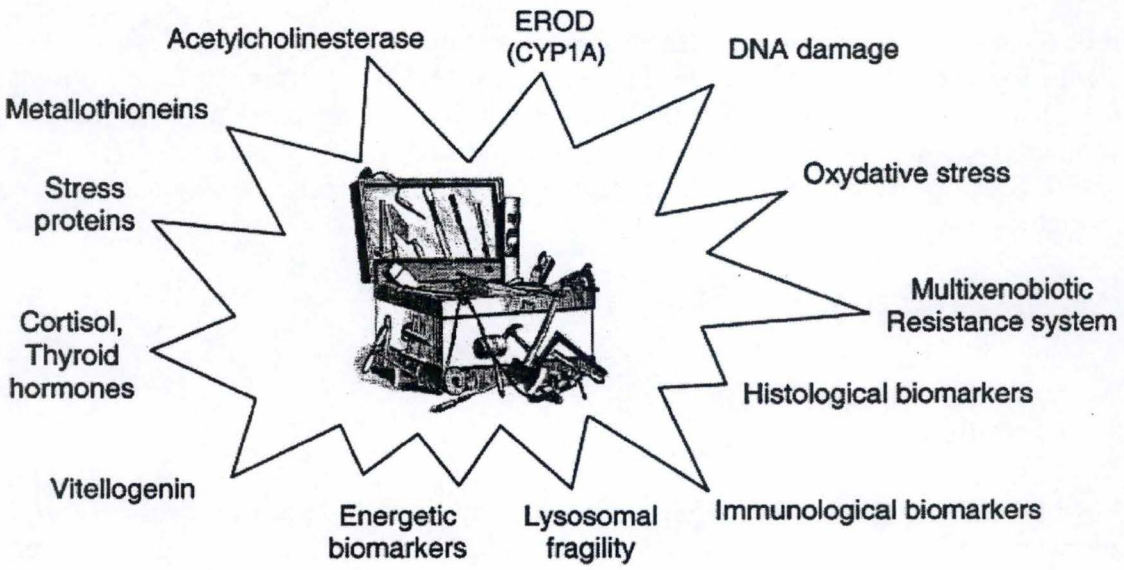


Figure 3 : Batterie de biomarqueurs disponible pour l'évaluation de la qualité de l'environnement.

Source : Lagadic, 2001

En tant que tels, les biomarqueurs décrivent la santé de l'individu et peuvent être considérés comme outils de diagnostic. Le fait que la toxicité d'un contaminant se fasse généralement remarquer en premier lieu à un niveau biochimique et moléculaire (ex : changement de l'activité enzymatique, expression génique,...) et seulement plus tard, au niveau des cellules, des tissus et des organismes, permet aux biomarqueurs d'être utilisés comme des indicateurs précoces de disfonctionnements ultérieurs au niveau des populations.

5.2. Les biomarqueurs d'effet, d'exposition et de sensibilité

On peut définir plusieurs types de biomarqueurs, ceux d'exposition, d'effets et de sensibilité ou susceptibilité.
Le biomarqueur d'*exposition* peut être le xénobiotique lui-même ou ses métabolites, dans l'organisme, isolé ou associé à un élément de l'organisme. Il renseigne sur l'exposition présente ou passée de l'organisme au polluant.
Le biomarqueur d'*effet* quant à lui, est un produit du métabolisme (ex : enzyme, hormone) utilisé pour « tracer » l'effet sur l'organisme de l'une ou l'autre substance étrangère.
Le biomarqueur de *susceptibilité* est un indicateur de la sensibilité (induite ou héréditaire) de l'individu à l'effet du xénobiotique. Il témoigne d'une variation de la sensibilité dans certains processus internes (ex : résistance croissante d'insectes à des produits insecticides).[12]

5.3. Importance des biomarqueurs en aquaculture

Avec le développement de l'aquaculture et l'utilisation fréquente de produits chimiques, les scientifiques deviennent de plus en plus conscients de la nécessité de développer des outils précis pour estimer les effets toxiques potentiels de ces produits. Prévoir les impacts potentiels de cette pollution chimique s'avère être d'une importance capitale pour le l'écotoxicologue qui, pour ce faire, a besoin d'outils précis et relativement faciles à utiliser. Puisque les risques ne peuvent être évalués uniquement sur base de données physico-chimiques qui n'apportent aucune information concernant les effets néfastes des contaminants sur le biotope, l'approche biologique semble un choix judicieux vers lequel se tourner (Cajaraville et al., 2000). La figure 3 nous présente quelques biomarqueurs disponibles pour l'évaluation de la qualité de l'environnement.

Cependant, les biomarqueurs ne sont pas toujours spécifiques à une molécule et il est donc nécessaire de mener des études pour comprendre les mécanismes mis en place au niveau métabolique de l'espèce étudiée lors de l'exposition à différents produits chimiques pour pouvoir développer des biomarqueurs moléculaires et cellulaires de plus en plus précis et sensibles. Il est déjà établi que certains biomarqueurs réagissent plus spécifiquement à l'un ou l'autre polluant (exemple : l'activité acétylcholinestérase est modifiée par les organophosphorés et les carbamates (Bertrand et al., 1998)) et même si ils n'indiquent pas toujours univoquement la nature du contaminant, cela permet aux chercheurs de limiter les tests analytiques et de la sorte, réduire le coût de l'étude.

[12] http://www.corata.org/v1/bibliotheque/polycopies/poly_xenobiotiques_seta_abstract.htm

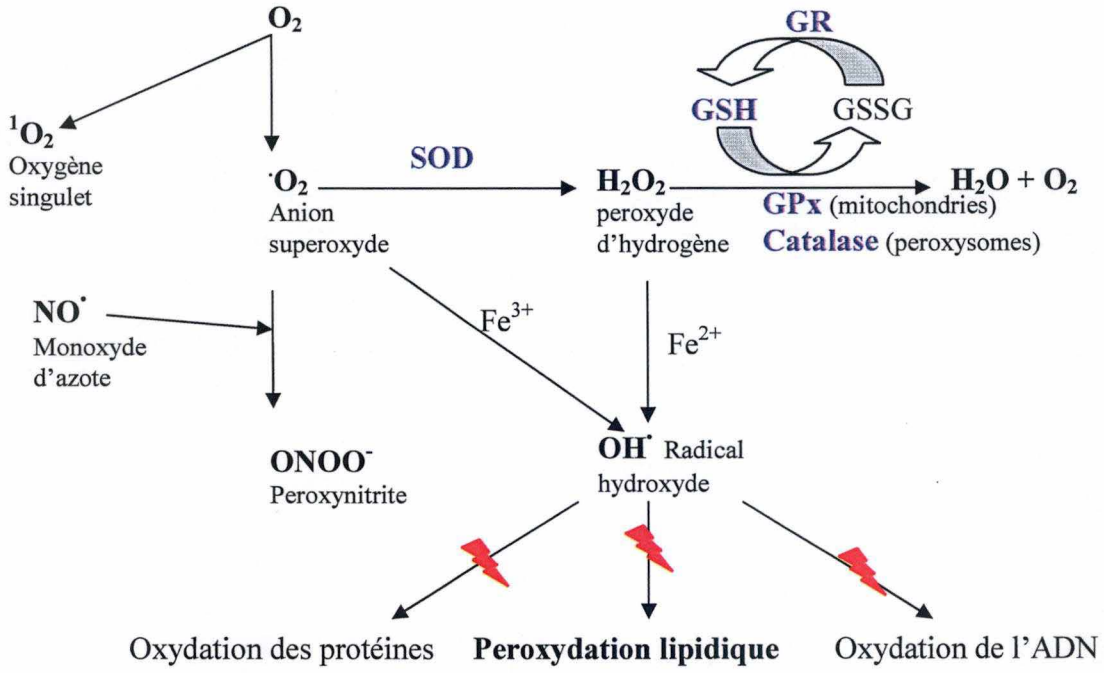


Figure 4 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie et dommages dus au stress oxydant (d'après Favier, 2003).

5.4. Biomarqueurs couramment utilisés en aquaculture

Plusieurs systèmes, parmi ceux à l'étude chez les organismes aquatiques comme indicateurs possibles d'intoxication, font l'objet de tentatives d'applications courantes.
Nous citerons ici : le système antioxydant et la peroxydation des lipides (LPO), l'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) pour ce qui est du dispositif enzymatique de détoxification et l'activité acétylcholinestérase (AChE), qui n'entre pas dans le cadre de fonctions de détoxication, mais qui constitue la cible privilégiée de nombreuses contaminants neurotoxiques et dont l'inhibition constitue un excellent marqueur d'exposition aux polluants.

5.4.1. Le système antioxydant et la peroxidation des lipides (LPO)

Les espèces réactives oxygénées ou reactive oxygen species (ROS), de petites molécules très réactives comprenant des ions d'oxygène, des radicaux libres et des peroxydes, sont le produit naturel du métabolisme de l'oxygène dans les cellules aérobies (Gutteridge, 1995).
En temps normal, la production de ROS ne constitue pas un problème pour la cellule. Bien au contraire, elles participent, entre autre, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense de l'organisme en détruisant les bactéries prises au piège dans les cellules phagocytaires ou encore, à l'apoptose. Pour garder un équilibre entre molécules pro-oxydantes et oxydantes, la cellule dispose d'un système complexe de détoxification comprenant des *enzymes antioxydantes* telles les catalases, les superoxydes dismutases et les peroxydases mais également, de petites *molécules antioxydantes* tel le glutathion et les vitamines E et C qui piègent les radicaux en captant leur électron libre et en les transformant en molécule ou ions stables (Carajaville et al., 2003).

Cependant, certains évènements, comme l'exposition à un xénobiotique, peuvent augmenter la production de ROS de façon critique. Si le déséquilibre entre la production de ROS et le système antioxydant est trop important, la cellule subit ce que l'on appelle un *stress oxydant*. Les dommages les plus courants dus à ce stress se situent au niveau des membranes cellulaires par l'oxydation des acides gras poly-insaturés (peroxydation des lipides), au niveau de l'ADN, et au niveau des protéines par l'oxydation des acides aminés (Favier, 2003). La Figure 4 reprend les quelques radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène produites lors du métabolisme de l'oxygène et des dommages subit par l'organisme lors d'un stress oxydant. Dans cette étude, nous mesurerons l'activité de différentes enzymes de détoxification et la peroxydation des lipides après une exposition à l'enrofloxacine. Les différents mécanismes sont brièvement décrits ci-dessous.

- La Catalase (CAT)

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 4, la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), sont deux enzymes antioxydantes majeures pour la réduction des ROS. Alors que la SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la CAT, présente dans les peroxysomes de la plupart des cellules aérobies, réduit le H_2O_2 en eau et oxygène moléculaire selon l'équation suivante:

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + \tfrac{1}{2} O_2$$

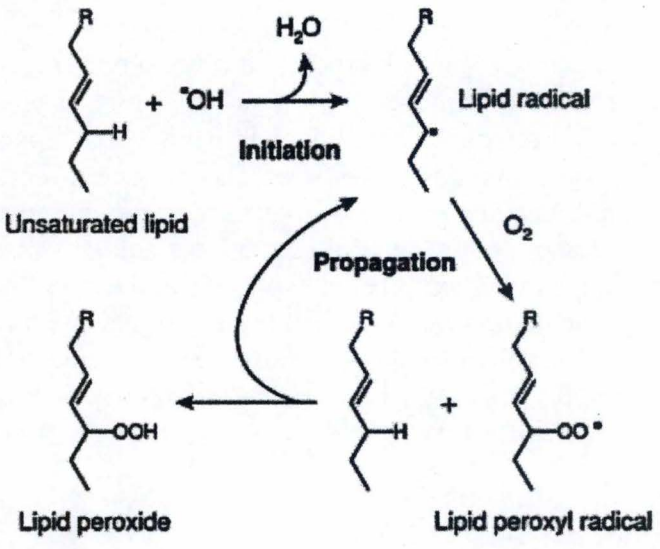


Figure 5 : Mécanisme de la peroxydation des lipides.
http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_peroxidation#Initiation

- La Glutathion S-transférase (GST)

Les glutathion-S-transférases représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles essentiellement hépatiques et cytosoliques, impliquées dans des opérations diverses de transports et de biosynthèses intracellulaires. Mais la fonction des GST la plus étudiée en ce qui concerne la prévention de la pollution dans l'environnement est leur protection de la cellule contre des effets mutagènes, carcinogènes et toxiques de certaines molécules en conjuguant le groupe thiol du glutathion (GSH) à ces xénobiotiques (X) électrophiles selon l'équation :

$$X + GSH \xrightarrow{GST} GS\text{-}X + H^+$$

La catalyse de cette conjugaison du glutathion avec certains substrats représente une étape dans la formation de composés GS-X qui seront moins toxiques et plus hydrosolubles que les molécules de départ (Chatterjee & Bhattacharya, 1984).

- Le glutathion total (GSH + GSSG)

Le glutathion GSH, un tripeptide γ glutamyl-cystéinyl-glycine, agit comme réducteur ou capteur de radicaux et vient renforcer l'action de enzymes antioxydantes. C'est le thiol non protéique le plus abondant dans les organismes vivants. On le retrouve majoritairement à l'état réduit (GSH) et une diminution de sa concentration cellulaire traduit un stress oxydant et peut donc être utilisé comme biomarqueur. Le GSH intervient comme donneur d'électrons permettant de désactiver les ROS mais il sert surtout de substrat aux glutathion peroxydases (GPx) pour la réduction des peroxydes selon l'équation suivante :

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

Comme nous l'avons déjà vu, ce thiol intervient également dans la conjugaison de substances électrophiles, lesquelles sont catalysées pas les glutathion S-transférases (Lagadic et al., 1997).

- La peroxydation lipidique (LPO)

Les membranes biologiques sont d'excellentes cibles pour les attaques des ROS, car elles sont majoritairement constituées d'acides gras polyinsaturés particulièrement sensibles à l'oxydation. En effet, ces molécules sont constituées d'un bon nombre de doubles liaisons entre lesquelles sont liés des groupements méthylène ($-CH_2-$) dont l'hydrogène est hautement réactif et en présence de ROS, une réaction radicalaire *s'initie* (Valavanidis et al., 2006). La Figure 5 reprend les différentes étapes de la peroxydation des lipides. Un radical hydroxyde ($OH^·$) peut, par exemple, se lier à l'hydrogène réactif de l'acide gras polyinsaturé et ainsi, le premier acide gras radicalaire est formé. La réaction *se propage* par la liaison instantanée de cet acide gras radicalaire instable avec de l'O_2 ce qui crée un radical peroxyl également instable qui va soit réagir avec lui même, soit avec un nouvel acide gras polyinsaturé membranaire ce qui résulte en la formation de lipides radicalaires et de lipides « peroxydés ». La réaction en chaîne *se termine* lorsque 2 radicaux réagissent entre eux pour former une molécule non radicalaire.

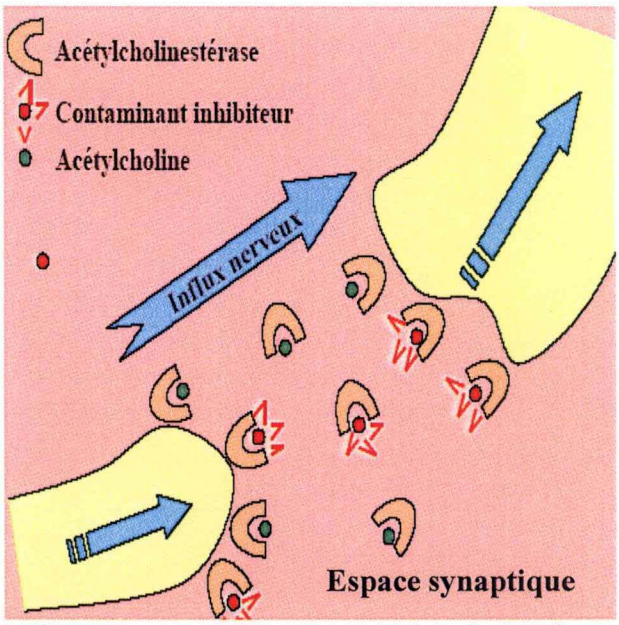


Figure 6 : Action des cholinestérases dans la transmission de l'influx nerveux et inhibition par un contaminant (Burgeot et al., 1999). Le contaminant inhibiteur (rouge) rentre en compétition avec le substrat naturel de l'enzyme, l'acétylcholine (vert). L'enzyme inhibée par le contaminant maintient en permanence la transmission de l'influx ce qui aboutit à la paralysie et à la mort.

Différentes études ont mis en évidence que plusieurs xénobiotiques pouvaient modifier l'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants. La deltaméthrine (insecticide de la famille des pyréthrinoïdes), certains effluents industriels contenant des métaux lourds mais également la qualité de l'eau (modification du pH, de la concentration en O_2 dissous,...) sont quelques exemples de situations où la production d'enzymes antioxydantes fut stimulée (Sayeed et al., 2003 ; Pandey et al., 2003 ; Parvez et al., 2006). La détermination du stress oxydant sur les espèces aquatiques est dès lors utilisée comme un biomarqueur d'effet *non spécifique*.

5.4.2. L'activité EROD

Grand nombre de xénobiotiques, l'enrofloxacine inclue, présentent un caractère lipophile qui leur permet de s'accumuler au sein des réserves lipidiques des organismes et des membranes cellulaires. La présence de tels composés dans l'organisme induit la mise en route de systèmes de détoxification qui rendent les xénobiotiques hydrosolubles afin de faciliter leur excrétion (Ioannides et Parke, 1990). La plus étudiée des réactions de détoxification est catalysée par une famille d'enzymes appelées cytochrome P450. Plus particulièrement, chez les poissons, c'est l'isoenzyme cytochrome P4501A (CYP1A) qui est impliquée dans ces réactions (Goksøyr et Förlin, 1992) et son activation peut être mesurée en déterminant l'activité 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD). (La 7-éthoxy-O-résorufine (RF) est dééthylée en résorufine, une molécule chromophore, par une monooxygénase dépendant du cytochrome P450.)

5.4.3. L'activité acétylcholinestérase

Dans les jonctions neuromusculaires, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine, qui permet la transmission de l'influx nerveux. L'acétylcholine est ensuite, inactivée par l'acétylcholinestérase (AChE), ce qui permet au système de revenir immédiatement à son état de repos. L'inhibition de l'AChE par certaines substances polluantes provoque l'accumulation de l'acétylcholine dans l'espace synaptique ce qui maintient la transmission permanente de l'influx nerveux qui conduit à la tétanie musculaire et à la mort de l'organisme (Figure 6).
Contrairement aux indicateurs de stress oxydants qui sont non spécifiques, l'activité de l'acétylcholinestérase est un biomarqueur spécifique de neurotoxicité (Bocquené, 1996) causée notamment par des pesticides organophosphorés, les carbamates et les métaux lourds.

Si les quelques biomarqueurs présentés ci-dessus sont couramment utilisés sur le terrain, il existe évidemment d'autres méthodes comme l'utilisation de biomarqueurs moléculaires tels que les altérations des acides nucléiques (ADN, ARN) par les xénobiotiques et les métaux et la caractérisation de certaines anomalies chromosomiques mais également, le dosage des métallothionines, protéines non enzymatiques impliquées dans la régulation des métaux circulant dans l'organisme et la révélation de la réponse immunitaire des organismes aux contaminants chimiques (Lafaurie et al., 1992) pour en citer quelques-uns.

Il ne faut cependant pas perdre de vue que quelle que soit la technique employée, aucune n'est appropriée à toutes les circonstances. C'est pourquoi il est important d'établir « un répertoire

de méthodes » qui peuvent répondre à des situations variées mais également appliquer les procédés déjà connus sur de nouvelles espèces car toutes ne réagissent pas de la même façon face à un stress, une pollution...
Par ailleurs, un biomarqueur ne peut être utilisé seul pour détecter ou prédire un risque de pollution ; plusieurs indicateurs sont au contraire nécessaires pour évaluer l'impact biologique d'un mélange de contaminants, qui constitue la situation la plus fréquemment rencontrée in situ.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il est certain que l'emploi des biomarqueurs dans la surveillance de l'environnement est encore limité à certains types de pollutions bien précis et à certaines espèces. Mais si nous admettons qu'un effet toxique est toujours lié à une expression biochimique, physiologique ou anatomique chez les êtres vivants, nous pouvons espérer développer dans le futur d'autres indicateurs biologiques et élargir ainsi le spectre des contaminations décelées.

6. Objectifs du mémoire

L'objectif de ce mémoire est d'étudier les réponses biochimiques du poisson-chat *Pangasius hypophthalmus* suite à un traitement à l'enrofloxacine dans des conditions de laboratoire les plus proches possibles de celles pratiquées dans les fermes d'élevages au Vietnam.
La densité étant un facteur déterminant pour la productivité et la rentabilité d'une entreprise, nous avons décidé d'inclure ce paramètre à notre étude en acclimatant les poissons à 3 densités différentes avant de les exposer à l'antibiotique et de commencer nos prélèvements.
Notre but est dès lors de mettre en évidence une potentielle influence de la densité d'élevage sur les réponses biochimiques du *P. hypophthalmus* suite à un traitement d'une semaine à l'enrofloxacine.

Seront dosées dans ce mémoire, le cortisol, indicateur général de stress chez les poissons et les activités de différentes enzymes antyoxidantes et de détoxification telles la catalase, la glutathion-S-transférase, la peroxydation des lipides, le glutathion total, l'activité EROD mais également l'acétylcholinestérase qui renseigne sur la neurotoxicité d'un xénobiotique.

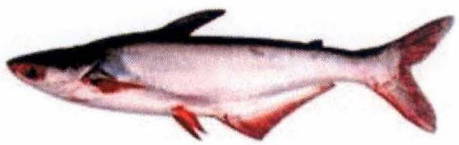
Si les réponses biochimiques étudiées sont significativement différentes entre les individus traités à l'antibiotique (contrôles) et les individus non traités (tests), nous aurons mis en évidence des biomarqueurs d'effet de l'exposition à l'enrofloxacine.

Deuxième partie : Matériel et méthodes



Figure 1 : Arrivée des *Pangasius hypophthalmus* au College of Aquaculture and Fisheries à l'université de Can Tho. Acclimatation d'une semaine en grand bassin avant l'acclimatation de 3semaines dans les tanks de 20, 40 et 60ind/m^2.

1. Prélever organes



↓

2. Homogénéiser

~200mg de tissus dans 1,5ml de tampon phosphate 0,5M pH 7,5
Poids total de l'organe = A
Poids total de l'homogénat = B
(Dilution = B/A)

↓

1. Préparer l'échantillon

DOSAGES SUR L'HOMOGENAT TOTAL
Échantillons prêts pour congélation (500µl *LPO* ; 500µl *GSH*)

Ou

DOSAGE SUR LE SURNAGEANT
Le reste de l'homogénat total est centrifugé 10min à 10000g (4°C) et le surnageant aliquoté pour congélation. (*GST ; CAT ; AChE)*

Figure 2 : Homogénéisation des échantillons et leurs différentes préparations en vue des dosages enzymatiques.

II. Matériel et méthodes

1. Schéma expérimental

1.1. Les poissons

Pour cette étude, nous avons utilisé des *Pangasius hypophthalmus* juvéniles de 12,91g ± 1,44 provenant d'une ferme commerciale de Thot Not dans la province de Can Tho, delta du Mékong au Vietnam et l'expérience fut menée au « College of Aquaculture and Fisheries » de l'université de Can Tho. Après une semaine passée dans un grand bassin (Figure 1), les poissons furent distribués au hasard dans de plus petits tanks, selon 3 densités différentes (24, 40 et 60 individus/m^2). Pendant les 3 semaines d'acclimatation, ils furent nourris manuellement 2x/jour de granulés ordinaires (à 7h30 et 17h00) jusqu'à satiété. Pendant ces périodes de nourrissage et jusqu'à 3h après, le renouvellement d'eau était interrompu pour éviter la perte de granulés via les sorties d'eau.
La température, le pH et la concentration en oxygène dissous ($[O_2]$) de l'eau étaient relevés quotidiennement 2x/jour juste avant le nourrissage tandis que des échantillons d'eau furent collectés 3 fois sur toute la durée de l'expérience pour pouvoir, par la suite, contrôler la qualité de l'eau en dosant les NO_2, NO_3 et NH_4.

1.2. Les tanks

Pour notre expérience, nous avons utilisé 18 tanks d'une capacité de 500l répartis au hasard, le long d'un même mur et recouverts d'un filet protecteur.
Comme le montre le tableau ci-dessous, nous avons travaillé en triplicats pour les différentes densités (24 ; 40 et 60ind/ tank) avec chaque fois un groupe contrôle et un groupe test exposé à l'enrofloxacine.

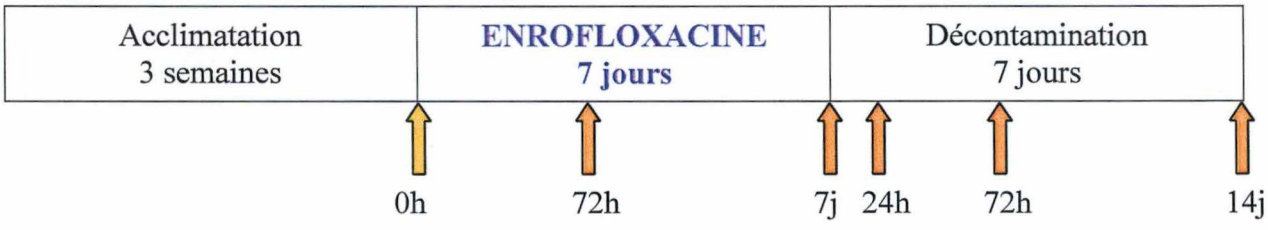
Tanks	Densité (ind/500l)	Traitement
1	24	*Contrôle*
2	24	*Contrôle*
3	24	*Contrôle*
4	24	Test
5	24	Test
6	24	Test
7	40	*Contrôle*
8	40	*Contrôle*
9	40	*Contrôle*
10	40	Test
11	40	Test
12	40	Test
13	60	*Contrôle*
14	60	*Contrôle*
15	60	*Contrôle*
16	60	Test
17	60	Test
18	60	test

2. Période d'exposition

Après une période d'acclimatation de 3 semaines, nous avons soumis les poissons « tests » à une exposition de 7 jours à l'enrofloxacine 99% via la nourriture, à raison de 1g d'antibiotique/kg de granulés alors que les poissons « contrôles » continuaient de recevoir des granulés « ordinaires ». L'enrofloxacine, gardée à -20°C, fut vaporisée de façon homogène sur les granulés ordinaires utilisés pendant la période d'acclimatation (70% enrofloxacine – 30% H_20) puis fixée grâce à de l'huile d'arachide.

3. Echantillonnage

Les prélèvements furent effectués aux périodes suivantes : "0h", "72h" et 7 jours pendant la période d'exposition et "24h", "72h" et 7 jours après la période d'exposition (décontamination).



Pour chaque jour d'échantillonnage, nous avons prélevé 3 poissons par tank que nous avons directement sacrifiés, pesés et disséqués. Nous avons collecté leurs branchies, foie, cerveau et du muscle sur glace (à 4°C).
Après dissection, les organes et muscle des 3 poissons furent mélangés pour constituer un « pool branchies » un « pool foie», un « pool cerveau » et un « pool muscle » au jour d'échantillonnage donné. Les carcasses des 3 poissons furent mixées ensembles, dans le but d'analyser les résidus d'enrofloxacine de retour en Belgique, et conservées à -80°C.
Pour notre expérience, nous avons donc manipulé 432 échantillons (6 jours de prélèvements*18 tanks*4 échantillons). Les échantillons qui n'ont pu être homogénéisés tout de suite ont été conservés à -80°C.

4. Homogénéisation et préparation des échantillons pour les différents dosages.

Les différents échantillons furent homogénéisés (4°C), à l'aide d'un Ultraturax, dans 1,5ml de tampon phosphate K_2HPO_4/KH_2PO_4 0,5M pH 7,5 (~200mg d'échantillon pour 1,5ml de tampon) contenant également des inhibiteurs de protéases (pastilles Roche®) et de l'acide sulfosalycilique (SSA) 5%. Le surplus d'organe est congelé à -80°C pour être ramené en Belgique. Les échantillons furent ensuite préparés différemment selon les dosages que nous allions effectuer (Figure 2) puis placés à -80°C pour éviter la dégradation des enzymes.

5. Les dosages[13]

5.1. Réalisés au Vietnam (College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University)

5.1.1. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry

Pour doser les protéines de nos échantillons, nous avons utilisé la méthode de Lowry et al. (1951). La réaction se déroule en 2 phases, la première étant la complexation d'ions Cu^{2+}, provenant du mélange réactif, avec les atomes d'azote des liens peptidiques de la protéine dans des condition de pH alcalin. Le Cu^{2+} est ainsi réduit en Cu^{+} selon les équations suivantes :

Cu^{2+}/OH^{-} + protéine → complexe [Cu^{2+}- protéine]
Cu^{2+} + (acides aminés polaires, Trp, Tyr)$_{réduits}$ → Cu^{+} + (acides aminés)$_{oxydés}$

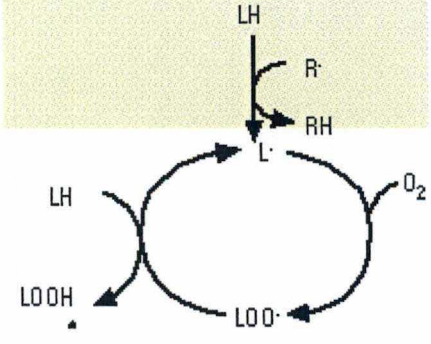
La deuxième étape concerne l'obtention de la couleur bleue nécessaire à la lecture à 660nm au spectrophotomètre. Le réactif de Folin, originellement jaune, vire au bleu quand il est réduit par le cuivre selon l'équation :

Cu^{+} + [(Folin)$_{oxydé}$] **jaune** → Cu^{2+} + [(Folin)$_{réduit}$] **bleu**

Pour ce faire, nous avons utilisé 0,5ml de notre échantillon dilué (10µl dans 490µl de tampon d'homogénéisation) auquel nous avons ajouté 0,5ml de NaOH 1N. Chaque tube fut passé au Vortex et incubé à température ambiante pour 30min avant d'y ajouter 5ml de mélange réactionnel Na_2CO_3 2% ; $CuSO_4$ 1% ; Tartrate de Na^{+}-K^{+} 2%. Après 10 à 15 min de temps de réaction, 0,5ml de réactif de Folin dilué 2x sont ajoutés. La courbe d'étalonnage est réalisée avec des concentrations croissantes de BSA 1mg/ml. La lecture se fait au spectrophotomètre à 660nm après 30min de repos. La quantité de protéines est exprimée en mg de protéines/ml de surnageant.

5.1.2. Peroxydation des lipides (LPO)

La peroxydation des lipides est un processus majeur de dommages cellulaires causé par un stress oxydant. Le mécanisme comprend une oxydation des lipides polyinsaturés par des radicaux libres oxygénés et résulte en la création de radicaux peroxyl ($LOO^{\cdot}$). Ces radicaux peuvent à leur tour capter un atome d'hydrogène provenant d'autres acides gras insaturés pour former des hydroperoxydes de lipides (LOOH) selon la réaction suivante :



LH : acide gras polyinsaturé ; R· : radical libre oxygéné ; LOO· : radical peroxyl, LOOH : hydroperoxyde de lipide
Source: www.ehponline.org

[13] Sauf indications contraires, tous les produits utilisés pour nos dosages proviennent de la firme Sigma®.

Les LOOH, relativement instables, génèrent du malondialdéhyde (MDA) lors de leur décomposition et le principe de détection d'une peroxydation des lipides est basée sur la détection de ce produit secondaire.
La technique utilisée consiste à ajouter du TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) à l'échantillon analysé. Le TBA réagit avec le MDA et le produit est lu au spectrophotomètre à 535nm (Fatima et al., 2000).
La procédure expérimentale consiste à mélanger 500µl d'homogénat à du TCA 5% (acide trichloroacétique dilué dans H_2O) selon un ratio 1:1 et de laisser incuber 15min (4°C). La solution est ensuite mélangée à du TBA 0,67% selon un ratio 2:1 (67mg TBA dans 1ml DMSO + 9ml H_2O) et centrifugée 10min à 2200g (4°C). Le surnageant est récupéré et incubé à 100°C pendant 10min. Une fois refroidi à température ambiante, l'échantillon est passé au spectrophotomètre pour une lecture à 535nm.
Une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations de plus en plus importantes de MDA (sous forme de 1,1,2,3 methylmalonaldehyde ou TMOP) nous permet de calculer la LPO, exprimée en nmol MDA/g de tissus.

5.1.3. Glutathion-S-transférase (GST)

Les Glutathion-S-transférases (GSTs) sont un groupe d'enzymes important dans la détoxification de xénobiotiques. Elles protègent la cellule des effets mutagènes, carcinogènes et toxiques de certaines molécules en conjuguant le groupe thiol de la glutathion (GSH) à ces xénobiotiques électrophiles selon l'équation :

$$X + GSH \xrightarrow{GST} GS\text{-}X + H^+$$

La détermination de l'activité GSH consiste à mesurer l'augmentation d'absorbance à 340nm due à la conjugaison de la GSH avec du 1-chloro-2,-dinitrobenzène (CDNB) pendant 3min à température ambiante (Habig et al., 1974).
La réaction est lancée en ajoutant 20µl d'échantillon à 700µl de tampon Hepes 33mM pH 7,5 ; 15µl de CDNB 2,15mM (dilué dans éthanol) ; 10µl de GSH 2,15mM (diluée dans Hepes) et 255µl H_2O.
Un « Blanc » (tous les réactifs sauf notre échantillon) nous sert de référence « 0 » due à la conjugaison immédiate de la GSH au CDNB. L'activité est exprimée en nmol CDNB/min/mg Prot en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $9{,}6.10^3$/M cm.

5.1.4. Catalase (CAT)

La catalase, présente dans les peroxysomes de la plupart des cellules aérobies, est un système de défense contre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un puissant agent oxydant. L'enzyme catalyse la réaction de décomposition du H_2O_2 selon l'équation :

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + \tfrac{1}{2}\, O_2$$

L'oxysulfate de titane ($TiOSO_4$) réagit avec le H_2O_2 qui n'a pas été réduit par la catalase après 6min d'incubation. Nous avons donc pu déterminer l'activité catalase de façon colorimétrique en mesurant le changement d'absorbance à 420nm (Baudhuin et al., 1964).
Les différentes solutions stocks sont préparées la veille du dosage. La « Blanc mixture » (BC) contient 1g BSA pour 100ml de tampon Imidazol 0,2M pH 7.0 et 900ml H_2O.

La solution de $TiOSO_4$ est préparée en dissolvant 1,7g de $TiOSO_4$ dans 500ml de H_2SO_4 2N et en portant à ébullition pendant 10min. Après avoir laisser reposer jusqu'au lendemain, on dissout la solution 1,5x avec du H_2SO_4.
La solution « Sample mixture » (SC) est préparée à partir de BC en ajoutant de l' H_2O_2 à cette dernière. Il faut ajuster la quantité de H_2O_2 à ajouter à BC, on teste d'abord avec 40µl H_2O_2 30% pour 250ml de BC, c'est notre «SC_{essai} ». Ensuite, on ajoute 0,75ml de $TiOSO_4$ à 1,3ml de SC_{essai}. Lire à 420nm. L'absorbance doit être comprise entre 0,75 et 0,95 ce qui correspond à l'absorbance maximale possible (pas de réduction de H_2O_2 par la catalase) pour accepter SC_{essai}. Sinon, on réessaye avec d'autres volumes de H_2O_2.
Pour le dosage en lui-même, les tubes « tests » contiennent 5µl d'échantillon ; 25µl de triton X-100 2% ; tampon phosphate 50mM pH 7.5 et 1250µl SC alors que dans les tubes « blanc test », la SC est remplacé par la BC. On prépare un tube référence « blan-blanc » qui ne contient ni échantillon ni H_2O_2. Les différentes séries de tubes sont incubées 6min à 0°C puis on ajoute 750µl de $TiOSO_4$. L'absorbance est lue à 420nm après 5 à 10min.

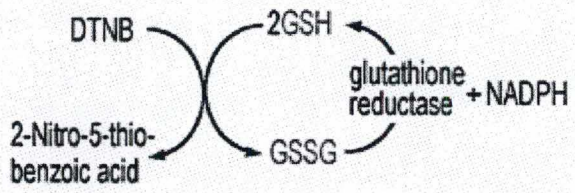
5.1.5. Acétylcholinestérase (AChE)

La méthode de détermination de l'activité acétylcholinestérase emploie l'acétylthiocholine iodine (ATChI) comme substrat synthétique pour l'AChE. L'ATChI est décomposée en thiocholine et acétate par l'AChE et la thiocholine peut ensuite réagir avec du dithiobisnotrobenzoate (DNTB) pour produire un produit de coloration jaune. La production de ce produit coloré en fonction du temps traduit l'activité AChE et peut être mesurée grâce à un spectrophotomètre (Ellman et al., 1961). Le DNTB réagit en fait avec les groupements sulfhydryl, sous conditions légèrement alcalines, ce qui produit du 5-thio-2-nitrobenzoate, molécule chromogène, qui absorbe à 412nm (coefficient d'absorbance de 13600/M cm).
L'activité de l'enzyme s'exprime en nmol/min/mg Prot.
La réaction est lancée en ajoutant 50µl d'ATChI 30mM à 900µl de DNTB 167mM et 50µl d'échantillon. Pour les blancs, l'échantillon est remplacé par du tampon Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 50mM pH 7.4. La lecture s'effectue à 412nm pendant 10min.

5.2. Réalisés en Belgique (Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, URBO)

5.2.1. Glutathion total (GSH + GSSG)

Le glutathion (gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine ou GSH) est un tripeptide dont les propriétés réductrices jouent un rôle central dans le système antioxydant de la plupart des cellules aérobies. Pour évaluer le GSH, on utilise la réaction suivante :

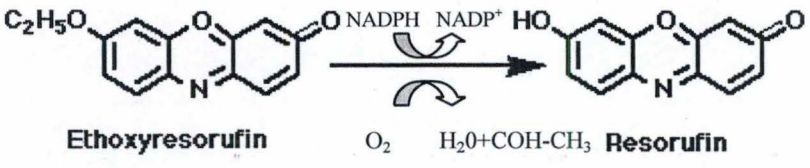


Le GSH réagit avec le réactif d'Ellman, le 5,5'-dithiobi(2-nitrobenzoic acid) ou DTNB, pour produire du 2-nitro-5-thio-benzoic acid ou TNB (molécule chromophore avec une absorbance maximale à 412nm) et du gluthation oxydé (GSSG). Le glutathion est régénéré grâce à la glutathion réductase (GR) et du NADPH.

La procédure expérimentale consiste à ajouter 40µl de GR 50U/ml à 740µl de tampon phosphate (KH_2PO_4 200mM ; EDTA 0,1mM ; pH 7,5), 100µl NADPH 2mM, 100µl DTNB 1,5mM et 20µl d'échantillon. Pour les « blancs », l'échantillon est remplacé par 20µl de l'acide 5-sulphosalicylique (SSA) 5%. L'absorbance est lue au spectrophotomètre pendant 5min à 412nm.

5.2.2. Mise au point de l'EROD

Nous avons tenté de mettre au point le dosage de l'EROD (7-éthoxyrésorufine-O-dééthlase) pour le *Pangasius hypophthalmus* sur des échantillons de foie ramenés du Vietnam et conservés dans le la carboglace (dioxyde de carbone à l'état solide, -78°C) durant le voyage.
Le principe de l'EROD est la dééthylation de la 7-éthoxy-O-résorufine (RF) en résorufine par une monooxygénase dépendant du cytochrome P450 selon le shéma suivant :



La fluorescence de l'hydroxyrésorufine est déterminée à 585nm avec une longueur d'onde d'excitation à 530nm.

Différents protocoles sont disponibles quand à la marche à suivre pour doser l'activité EROD chez les poissons, mais aucun n'a encore été adapté aux *Pangasius spp.*. C'est ce que nous avons tenté de faire en nous inspirant de 3 protocoles différents et en faisant varier différents paramètres tels que les tampons d'homogénéisation, les temps de réaction et les concentrations. N'ayant pas assez d'échantillons pour effectuer tous les tests sur du foie de *P. hypophthalmus*, nous avons utilisé, sauf mention contraire, des carassins (*Carassius carassius*). Toutes les homogénéisations se sont effectuées avec un homogénéisateur de type « Potter El Vehjem » avec un piston en téflon lui-même monté sur une foreuse dont l'axe tourne à une vitesse de 2800rpm, pendant 2 fois 20 secondes avec un intervalle de 10 secondes et sur un bain de glace à 4°C. Toutes les lectures en fluorescence ont été réalisées à 585nm et longueur d'onde d'excitation de 530nm dans des microplaques de 96 puit à fond plat (Greiner®) grâce à un spectrofluorimètre Thermo Fluoroskan Ascent®.
Les protéines ont été dosées par la méthode dite « de Bradford », une méthode colorimétrique dans laquelle un colorant, le bleu de coomassie G250, de couleur brune en milieu acide (absorbance à 465nm) devient bleu en se fixant quantitativement aux protéines (absorbance à 595nm). La réaction, quasi instantanée, se mesure à 595nm (Bradford et al., 1976). Etant limité dans le temps, nous avons préféré cette technique simple et plus rapide que celle de Lowry. Du Bio-Rad Protein Reagent® (fournit par la firme Biorad Laboratories GmbH), un dérivé commercialisé du réactif de Bradford, fut utilisé pour ce dosage. Une droite d'étalonnage fut réalisée avec des concentrations croissantes de sérum albumine bovine (BSA) à 1mg/ml. Pour les tests, 2ml de réactif B (Bio-Rad Protein Reagent dilué 1/5x dans de l'eau distillée) furent ajouté à 2µl d'échantillon. La courbe d'étalonnage et les échantillons furent réalisés en duplicats. Après 5min de repos à température ambiante, l'absorbance est lue par un spectrophotomètre à 595nm. La quantité de protéines est exprimée en mg de protéines/ml de surnageant.

Courbe étalonnage	échantillon	éthoxyRF	NADPH	Tampon	Total
	µl				
1	10	2,5	4,7	232,8	250
	25	2,5	4,7	217,8	250
	50	2,5	4,7	192,8	250
2	10	2,5	10	227,5	250
	25	2,5	10	212.5	250
	50	2,5	10	187,5	250
3	10	2,5	25	212,5	250
	25	2,5	25	197.5	250
	50	2,5	25	172,5	250
4	10	2,5	30	207,5	250
	25	2,5	30	192.5	250
	50	2,5	30	167,5	250
5	10	50	4,7	185,3	250
	25	50	4,7	170.3	250
	50	50	4,7	145,3	250
6	10	50	10	180	250
	25	50	10	165	250
	50	50	10	140	250
7	10	50	25	165	250
	25	50	25	200	250
	50	50	25	125	250
8	10	50	30	160	250
	25	50	30	145	250
	50	50	30	120	250

Tableau 1 : différentes conditions testées en vue du dosage de l'activité EROD sur la fraction microsomale d'homogénat de foie de Carassin.

Les deux premières méthodes utilisées (protocole utilisé en routine à l'ULG au laboratoire d'écologie animale et écotoxicologie et protocole utilisé à l'URBO (FUNDP) pour doser l'activité EROD sur la perche *Perca fluviatilis* aux travaux pratiques d'écotoxicologie) ne nous ont pas fourni de résultats concluants. En effet, la lecture en fluorescence de nos échantillons ne nous donnait que des valeurs d'absorbance plus faible que le blanc. Néanmoins, le tableau ci dessous reprend les différentes conditions testées et inclut le troisième protocole utilisé, tiré de l'article « Confinement stress and starvation modulate the induction of EROD activity after exposure to PCB 126 in the Mozambique tilapia (Oreochromis mossambicus) » (Quabius et al., 2002).

	Protocole ULG	**Protocole URBO**	**Protocole Quabius**
Tissus	500mg foie	200mg foie	500mg foie
Tampon	NaH2PO4/KH2PO4 100mM	Tris-HCl 50mM	Saccharose 0,25M
pH	7,8	7,4	7,4
Centrifugation	20min - 9000g - 4°C	30min - 100 000g - 4°C	20min - 10000g - 4°C et 60min - 100 000g - 4°C
Fraction	cytosolique (surnageant)	microsomale (culot resuspendu)	microsomale (culot resuspendu)
EthoxyRF	25µl 20µM	0,1ml 5µM	(voir Tableau suivant)
Echantillon	25µl	0,1ml	
Tampon	125µl	0,7ml tampon	
NADPH	25µl 2,5mM	0,1ml 2mM	

Pour le dosage de l'EROD d'après le protocole de Quabius et al. en lui même, nous avons utilisé du tampon (80mM Na_2HPO_4 ; 20mM KH_2PO_4 ; 150mM KCl ; pH 7,4) et fait varier les concentrations d'échantillon, de NADPH et de substrat (éthoxyRF).
Les 24 conditions et leurs différents courbes d'étalonnages reprises dans le Tableau 1 ont été testées et lues au spectrofluorimètre Fluoroskan Ascent® à 530nm pour une longueur d'onde d'émission de 585nm.
Pour rappel, nous avons effectué les tests sur des foies de carassins (*Carassius carassius*) dans le but de préserver et économiser nos échantillons de *Pangasius hypophthalmus* rapportés du Vietnam. Notre but était de trouver la ou les conditions nous donnant une valeur d'absorbance assez élevée pour se trouver dans la droite d'étalonnage ce qui signifierait que nous détecterions l'activité 7-éthoxy-O-résorufine dééthylase (EROD).
Sur les 24 conditions testées avec le protocole tiré de l'article de Quabius et al. (2002), seulement six d'entre-elles répondaient à ce critère.

Cependant, quand nous avons testé ces six conditions différentes sur les foies de nos *Pangasius hypophthalmus*, nous avons malheureusement obtenu des valeurs d'absorbance hors champ c'est-à-dire plus faibles que le blanc de notre courbe d'étalonnage.

6. Traitement statistique des données

Les données brutes ont été encodées dans le logiciel Microsoft Office Excel 2003™ et les résultats analysés en utilisant les outils de statistique descriptive (calcul de la moyenne, écart-type, variance). L'analyse a ensuite été effectuée grâce au logiciel STATISTICA 5.5™.

Un test paramétrique a été réalisé par la méthode de l'analyse de la variance à 2 dimensions ANOVA II à mesures répétées dans le temps. Les paramètres intervenant dans l'analyse sont l'exposition ou non à l'enrofloxacine et les différentes densités. Les mesures sont répétées six fois dans le temps et le poids des poissons est placé en covariable.
Un seuil de probabilité significatif de 5% est utilisé. Afin de déterminer les interactions des différents facteurs (densité x exposition à l'antibiotique), un test LSD est employé.

Troisième partie : Résultats

III. Résultats

Dans cette troisième partie, nous allons présenter les résultats obtenus pour les différents dosages effectués au Vietnam et en Belgique.
Pour rappel, notre objectif était d'étudier les réponses physiologiques et biochimiques du *Pangasius hypophthalmus* après un traitement de 7jours à l'enrofloxacine et ce, pour 3 densités différentes.

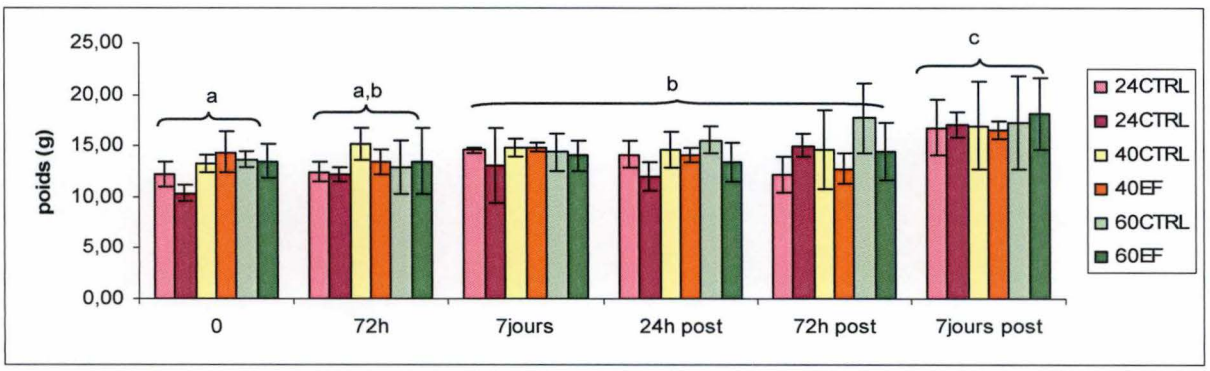
Le protocole expérimental adopté et décrit dans la deuxième partie (matériel et méthodes) correspond autant que possible aux conditions réelles rencontrées dans les élevages en étangs à bon renouvellement d'eau de *Pangasius hypophthalmus* au Vietnam : les éleveurs utilisent des antibiotiques mélangés à la nourriture à raison de 1g d'antibiotique par kg de nourriture et les traitements durent en moyenne 7jours.

Nous commencerons par une description du déroulement général de l'expérience, aborderons ensuite les résultats relatifs à la qualité de l'eau et nous terminerons en présentant les réponses biochimiques du *Pangasius hypophthalmus* à un stress de densité suivi d'une exposition à l'enrofloxacine. Pour chaque dosage, les résultats obtenus dans le foie, le cerveau et les branchies s'il y a lieu, seront décris ci-dessous et discutés dans le chapitre suivant.

1. Déroulement général de l'expérience réalisée au College of Aquaculture and Fisheries de l'Université de Can Tho au Vietnam.

Des *Pangasius hypophthalmus* juvéniles ont été acclimatés, pendant 3 semaines, à des densités de 24, 40 et 60 ind/m^2 (en triplicats), conditions représentatives des pratiques adoptées au Vietnam pour l'élevage en étang de ce poisson-chat. Au terme de cette période d'acclimatation, les poissons « tests » ont été traités par de l'enrofloxacine 99% à raison de 1g/kg de nourriture. Nous avons effectué un prélèvement avant le traitement (« 0h ») ensuite, après 3 et 7 jours pendant l'exposition à l'enrofloxacine et enfin, après 1, 3 et 7 jours de la période de décontamination dans le but de doser différentes activités enzymatiques.
Pendant toute la durée de l'expérience, les poissons ont été nourris manuellement et à satiété, à 7h30 et 17h00.

A chaque prélèvement, nous avons pesé les poissons et pouvons observer, sur le graphe ci-dessous, que le poids augmente au cours de l'expérience. Cependant, ni la densité, ni le traitement à l'antibiotique ne perturbent la croissance du *Pangasius hypophthalmus*. Dans notre modèle statistique, le poids est inclus en tant que covariable.



Evolution du poids des poissons au cours de l'expérience. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c,) ne sont pas significativement différents.

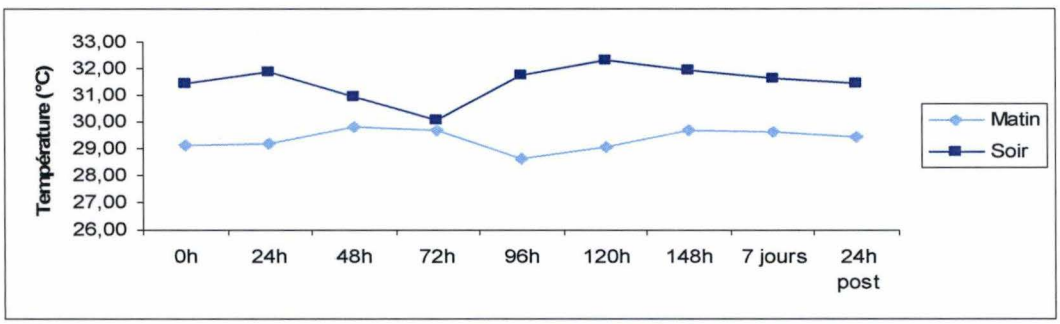
Nous noterons que le comportement des *Pangasius* était très changeant au cours de l'expérience. En dehors des périodes de nourrissage ou lorsque nous nous éloignions des bassins, les poissons nageaient en banc serré dans le fond du bassin, mais, dès que quelqu'un s'en approchait, cette organisation était immédiatement brisée et les poissons adoptaient alors une nage désordonnée et très rapide. Ces changements de directions brusques le rendent très difficile à attraper et nous avons éprouvé quelques difficultés pour effectuer nos prélèvements. Ce comportement traduit une certaine nervosité du pangasius, stress que nous devons garder à l'esprit lorsque nous discuterons de nos résultats.
Nous n'avons déploré aucune perte pendant toute la durée de l'expérience, le taux de survie est donc de 100%.

2. Contrôle de la qualité de l'eau

Pour rappel, la température, le pH et la concentration en oxygène dissous (O_2) de l'eau ont été relevés matin et soir (7.30am et 5.00pm) pendant 7jours, et nous avons également effectué des prélèvements d'eau aux jours « 0h, 7jours et 7jours post» pour y doser la concentration en azote sous formes $N\text{-}NH_4$, $N\text{-}NO_2$ et $N\text{-}NO_3$.

2.1. La température de l'eau

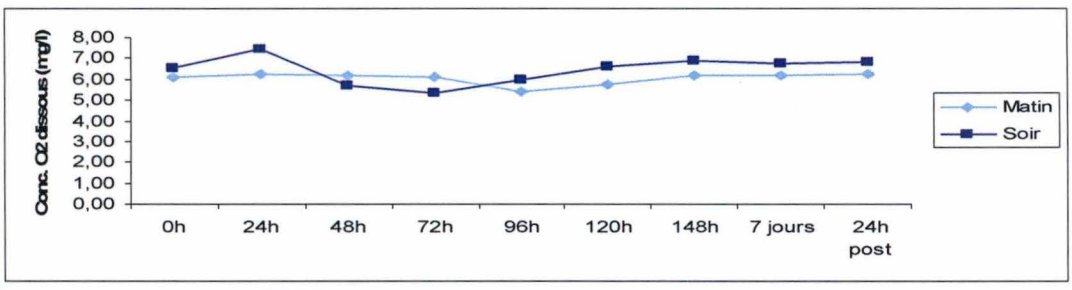
La température de l'eau des tanks est restée assez stable tout au long de l'expérience (du jour « 0h » jusqu'à 24h après l'arrêt du traitement à l'enrofloxacine) se situant entre 29,35±0,42°C tous les matins et 31,50±0,75°C en fin d'après midis. L'ANOVA n'a pas révélé une fluctuation significative de jour en jour (p=0,14) cependant la température est significativement plus élevée à 5.00pm qu'à 7.30am avec un ΔT° d'environ 3°C.
Nous remarquons également que la température des tanks est supérieure à la température optimale du *Pangasius hypophthalmus* qui se situe entre 22 et 26°C.



Variations de température de l'eau des tanks (°C) au cours de l'expérience selon les relevés matinaux à 7.30am ou en fin de journée à 5.00pm.

2.2. La concentration en oxygène dissous

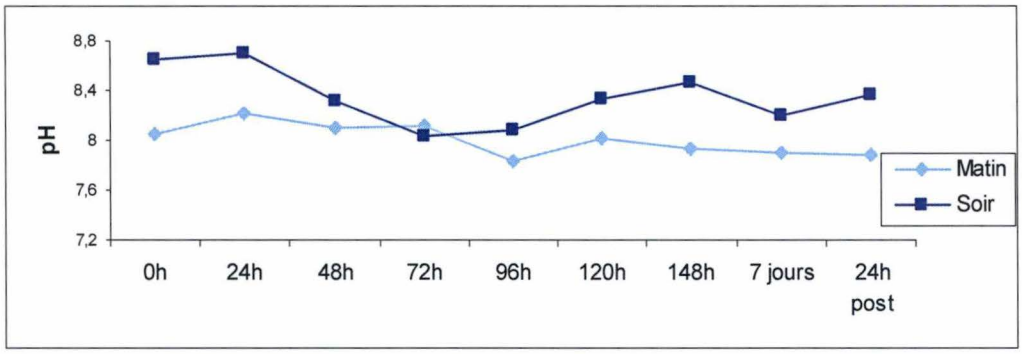
La concentration en oxygène est assez stable dans le temps et se situe, en moyenne, entre 5,43±0,0155 et 6,27±0,19 mg/l le matin et 5,35±0,31 et 7,44±0,26 mg/l le soir. Nous remarquons que les deux premiers jours (0h et 24h), la $[O_2]$ est plus élevée le soir alors que c'est le contraire pour les deux jours suivants (48h et 72h). À partir du troisième jour, la concentration en oxygène est toujours plus élevée le soir.



Evolution de la quantité d'oxygène dissous en mg/l au cours de l'expérience selon les relevés matinaux (7.30am) ou en fin de journée (5.00pm).

2.3. Le pH

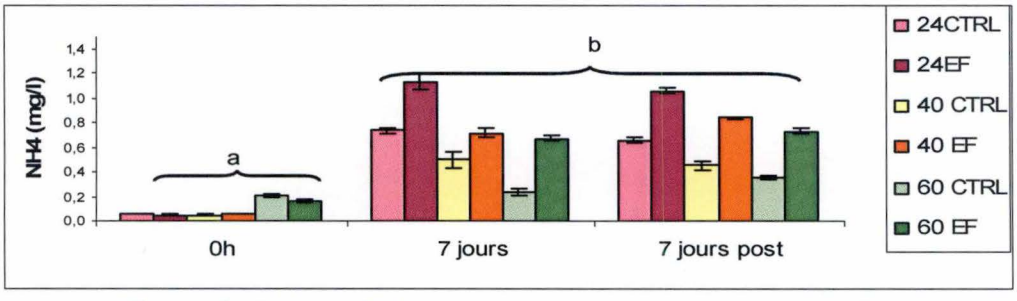
Les valeurs de pH restent constantes tout au long de l'expérience mais elles sont légèrement plus élevées en fin de journée avec un pH 8,4±0,25 alors que le matin, elles sont de 8,0±0,38 en moyenne. Le pH optimal de l'eau pour le *Pangasius hypophthalmus* se situe entre pH 6,5-7,5 soit neutre à légèrement acide alors que nos valeurs de pH sont alcalines.



Variations de pH de l'eau des tanks au cours de l'expérience selon les relevés matinaux (Matin) à 7.30am ou en fin de journée (Soir) à 5.00pm.

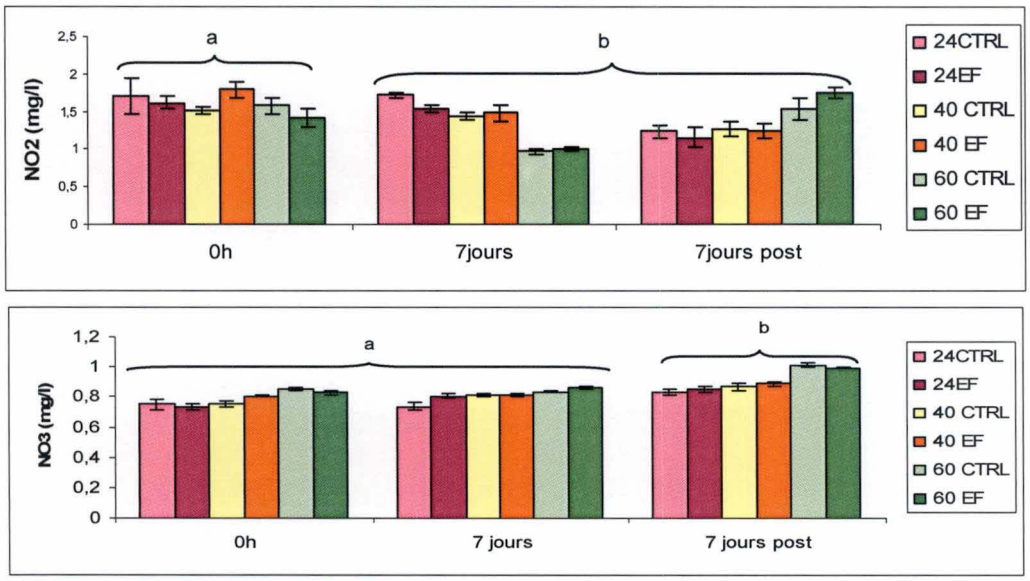
2.4. Les formes azotées: $N\text{-}NH_4$, $N\text{-}NO_2$ et $N\text{-}NO_3$

La concentration en NH_4 subit une élévation très hautement significative du jour « 0h » aux jours « 7 » et « 7post » (p=0,0005) en passant de 0,097±0,008mg/l à 0,677±0,031mg/l en moyenne, tous groupes confondus.
Au jour « 0h », soit avant le début du traitement à l'antibiotique, la concentration en NH_4 est significativement plus élevée dans les bassins contenant 60ind/m^2 que celle des autres (p=0,04). A partir du 7ème jour d'exposition, les test LSD révèlent un effet très hautement significatif de la densité et du traitement sur l'élévation de la concentration en NH_4. Les tanks de 24 individus (20ctrl et 20EF) viennent en tête de la [NH_4] la plus élevée, suivis des groupes 40ind/m^2 et enfin 60ind/m^2. Pour ces différentes densités, les tanks contenant les poissons exposés à l'enrofloxacine (« EF ») sont ceux dont la concentration en NH_4 est significativement la plus élevée.



Concentration en NH_4 (exprimée en mg/l). Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b) ne sont pas significativement différents.

Pour les nitrites et nitrates, la concentration varie également dans le temps sous l'influence très hautement significative de la densité de stockage et du traitement à l'antibiotique.
Pour les nitrites, celle-ci diminue de 1,6±0,11mg/l à 1,3±0,07mg/l aux jours « 7 » et « 7post » alors que pour les nitrates, elle augmente à « 7jours post » avec une concentration moyenne de 0,91±0,016mg/l contre 0,79±0,014mg/l aux autres périodes de prélèvement.



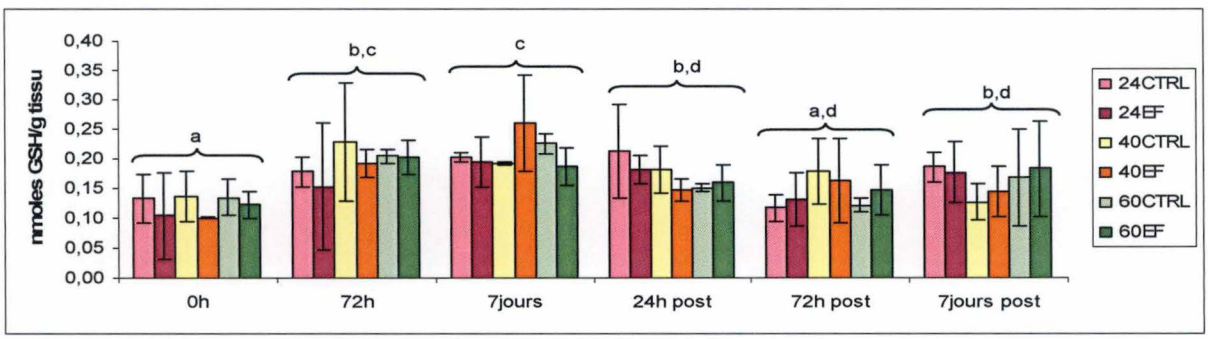
De haut en bas : Concentration en NO_2 (exprimée en mg/l) et Concentration en NO_3 (exprimée en mg/l) aux temps de prélèvements « 0h », « 7jours » et « 7jours post » traitement pour les différentes conditions. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b) ne sont pas significativement différents.

3. Dosages des biomarqueurs enzymatiques

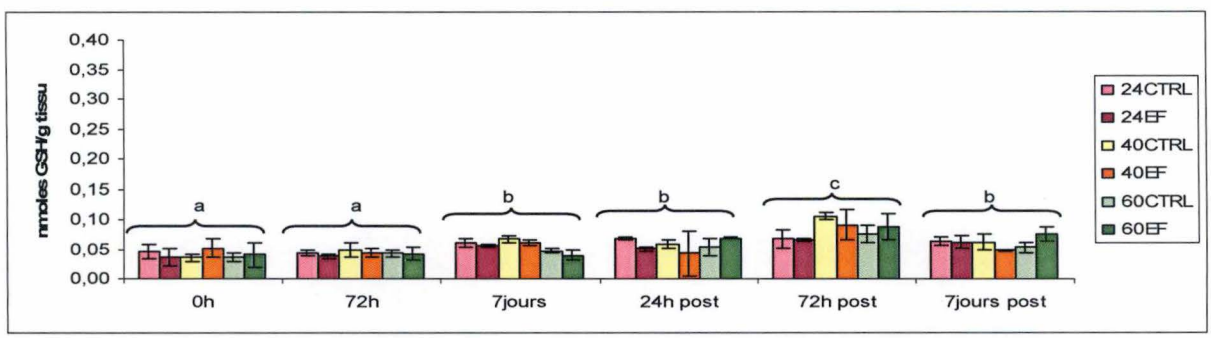
Pour rappel, nous avons travaillé sur les 6 conditions différentes et ce, en triplicats : 24CTRL et 24EF, 40CTRL et 40EF et 60CTRL, et 60EF (CTRL = contrôles ; EF = exposés à l'enrofloxacine ; 24, 40 et 60 représentent le nombre de poissons/m^2).
Pour chaque jour de prélèvement, 3 poissons étaient collectés par tank et nous avons donc effectué les différents dosages sur des pools de 3 individus. Comme nous avons travaillé en triplicats, nous avons obtenu 3 valeurs pour une même condition.
Les graphiques et l'analyse statistique sont réalisés à partir des moyennes et écarts-types de ces 3 valeurs.

3.1. Dosage du glutathion (GSH)

Les taux de GSH, qui n'a été dosé que sur les échantillons de foie et de branchies, se situent entre 0,12±0,04 et 0,21±0,03 nmol de GSH/g de tissu dans le foie et 0,041±0,013 et 0,082±0,014 nmol de GSH/g de tissu dans les branchies. La concentration du glutathion total est donc environ 3 fois plus élevée dans le foie que dans les branchies.
L'ANOVA n'a révélé aucun effet significatif, ni du traitement à l'enrofloxacine (les groupes contrôles possède un taux de GSH similaire aux groupes exposés à l'antibiotique, p=0,90 pour le foie et p=0,071 pour les branchies), ni de la densité. L'activité GSH varie de manière hautement significative selon les différents jours de prélèvements mais cela n'est pas dû aux deux facteurs étudiés.



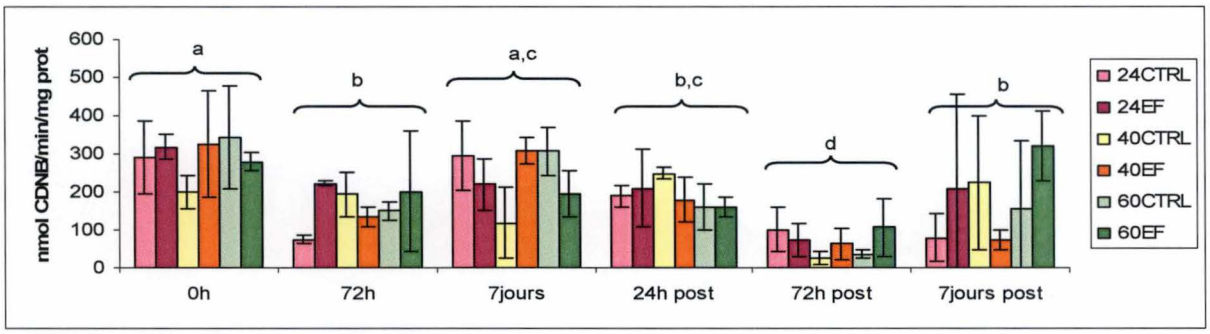
Taux de glutathion total dans le foie de *Pangasius hypophthalmus*, exprimé en nmoles de glutathion par g de tissu, au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c, d) ne sont pas significativement différents.



Taux de glutathion total dans les branchies de *Pangasius hypophthalmus*, exprimé en nmoles de glutathion par g de tissu, au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c,) ne sont pas significativement différents.

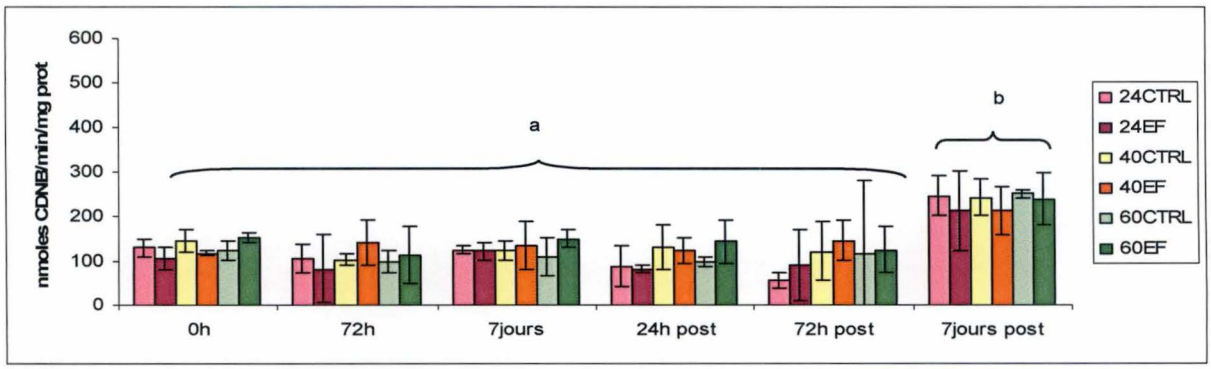
3.2. Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase

L'activité de la Glutathion S-transférase a été dosée sur le foie et le cerveau.
Pour le foie, l'allure générale semble, encore une fois, indiquer que les groupes contrôles et les groupes tests des différentes densités suivent la même tendance, ce qui signifierait que ni l'exposition à l'enrofloxacine, ni la densité n'auraient d'influence sur l'activité GST. L'analyse statistique confirme cette absence de différence significative entre les contrôles et les tests ($p=0,24$) et entre les groupes à 24 ; 40 et 60individus/bassin ($p=0,42$). Cependant, l'activité de la GST varie de manière hautement significative dans le temps ($p<0,01$) ce qui signifie que d'autres facteurs que la densité et le traitement à l'antibiotique auraient une influence sur la réponse biochimique.



Activité de la glutathion S-transférase exprimée en nmoles de CDNB par min et par mg de protéines dans le foie du *Pangasius hypophthalmus* au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c, d) ne sont pas significativement différents.

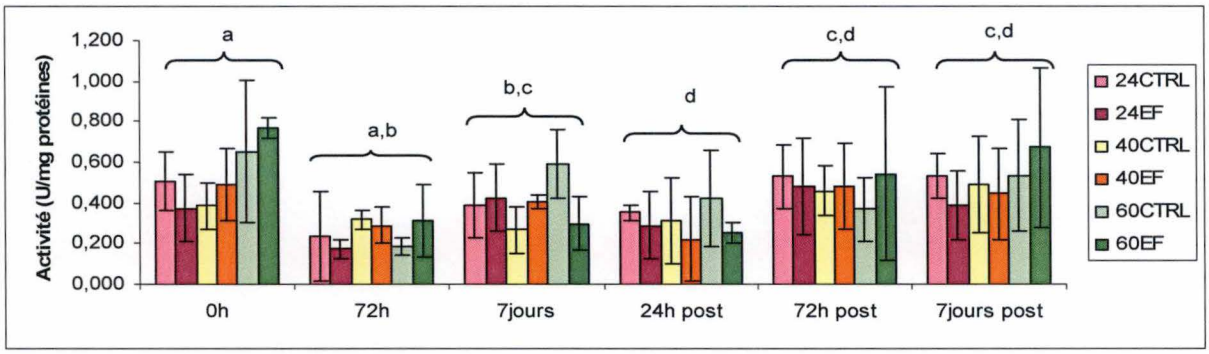
Pour ce qui est de l'activité GST dans le cerveau, l'analyse statistique a révélé qu'elle était assez stable jusqu'à 72h après l'arrêt du traitement à l'enrofloxacine (72h post) en se situant entre 108,7±43,2 et 130,0±17,9 nmoles CDNB/min/mg prot mais significativement plus élevée 7 jours après l'arrêt du traitement en se situant à 235,95±49,1 nmoles CDNB/min/mg prot ($p<0,01$). Cependant, ni l'ANOVA ni les test LSD n'ont révélé d'influence du traitement et de la densité sur l'activité GST dans le cerveau ($p=0,80$ et $p=0,92$ respectivement). Cette variation de l'activité GST devrait donc également dépendre d'autres facteurs.



Activité de la glutathion S-transférase exprimée en nmoles de CDNB par min et par mg de protéines dans le cerveau du *Pangasius hypophthalmus* au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b) ne sont pas significativement différents.

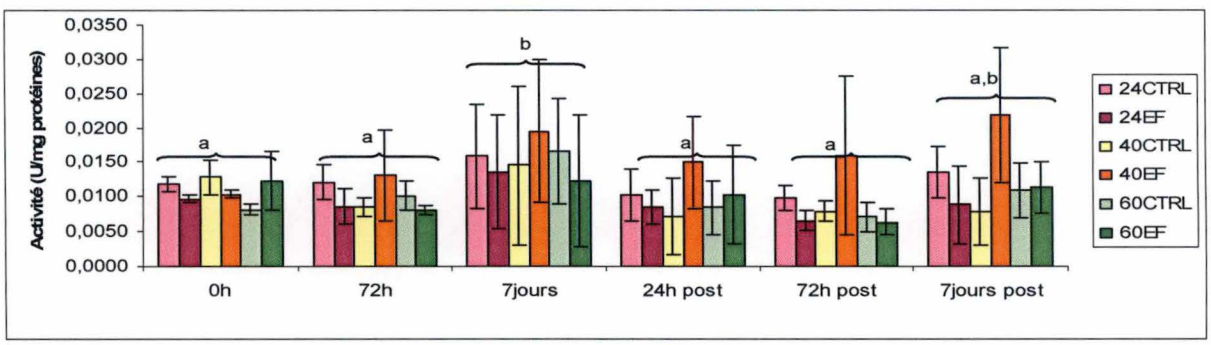
3.3. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase, dosée sur le foie et le cerveau, se situe entre 0,254±0,10 et 0,530±0,17 Unité de catalase par mg de protéines pour le foie et 0,009±0,003 et 0,0154±0,009 U/mg protéines pour le cerveau. Elle est donc environ 30 fois plus élevée dans le foie.
Pour ce qui est du dosage de la catalase dans cet organe, l'ANOVA révèle que l'activité de l'enzyme varie de façon hautement significative dans le temps (p=0,0002) avec une diminution importante de l'activité de la CAT à 72h, mais que ni le traitement à l'enrofloxacine, ni la densité n'ont d'impact significatif sur son activité (p=0,54 et 0,68 respectivement), en d'autres mots, les contrôles et tests des différentes densités sont tous statistiquement semblables et les fluctuations de l'activité de l'enzyme sont probablement dues à d'autres facteurs.



Activité de la catalase exprimée en unités de catalase par mg de protéines dans le foie du *Pangasius hypophthalmus* au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c, d) ne sont pas significativement différents.

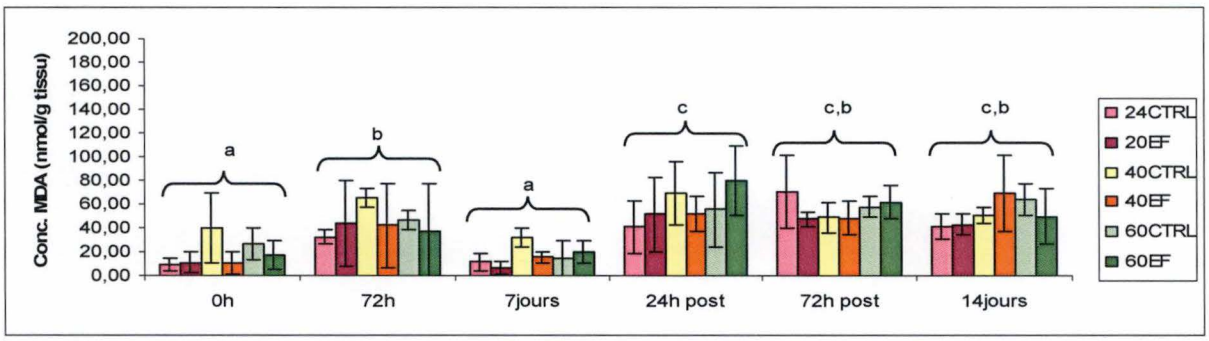
Tout comme pour le foie, l'ANOVA a décelé un effet significatif du temps de prélèvement (p=0,018) sur l'activité de la catalase dans le cerveau et on constate que celle-ci est significativement plus élevée au 7ème jour de l'expérience toutes conditions confondues (p<0,01). L'ANOVA révèle également l'absence d'effet significatif de la densité (p=0,60) et du traitment à l'enrofloxacine (p=0,57) sur l'activité catalase dans le cerveau des *P. hypophthalmus*.



Activité de la catalase exprimée en unités de catalase par mg de protéines dans le cerveau du *Pangasius hypophthalmus* au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b) ne sont pas significativement différents.

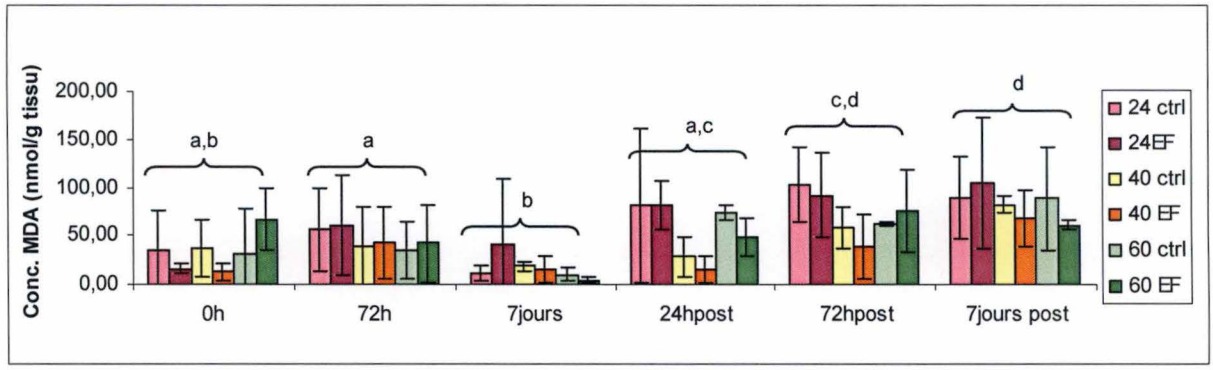
3.4. Dosage de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides a été déterminée par la mesure de la quantité de TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) dans le foie et le cerveau du *Pangasius hypophthalmus*. Nous avons déjà observé l'absence d'effet significatif de la densité et de l'exposition à l'enrofloxacine sur l'activité des enzymes du stress oxydant (catalase et GST) dans le foie, et c'est donc logiquement que nous constatons la même tendance pour la peroxydation lipidique. Le traitement à l'enrofloxacine et la densité de stockage n'ont aucun effet significatif sur la l'oxydation des lipides dans cet organe (p=0,25 et p=0,12 respectivement). La fluctuation significative de la LPO hépatique dans le temps dépend donc d'autres facteurs.



Evolution de la LPO exprimée en nmoles de MDA/g tissu dans le foie du *Pangasius hypophthalmus* au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c) ne sont pas significativement différents.

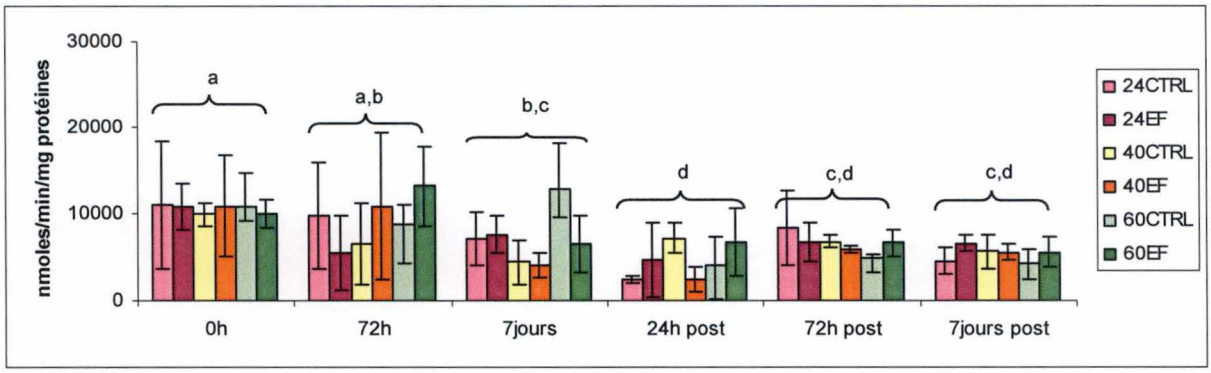
Pour ce qui est de l'évolution de la LPO dans le cerveau, on constate également une fluctuation des taux de TBARS dans le temps avec une peroxydation lipidique significativement plus faible dans le cerveau au 7ème jour et ce, toutes conditions confondues. Les 3 derniers jours de prélèvements sont caractérisés par une LPO significativement en hausse. L'ANOVA ne décèle toujours pas d'influence significative du traitement à l'enrofloxacine (p=0,97) ni de la densité (p=0,57).



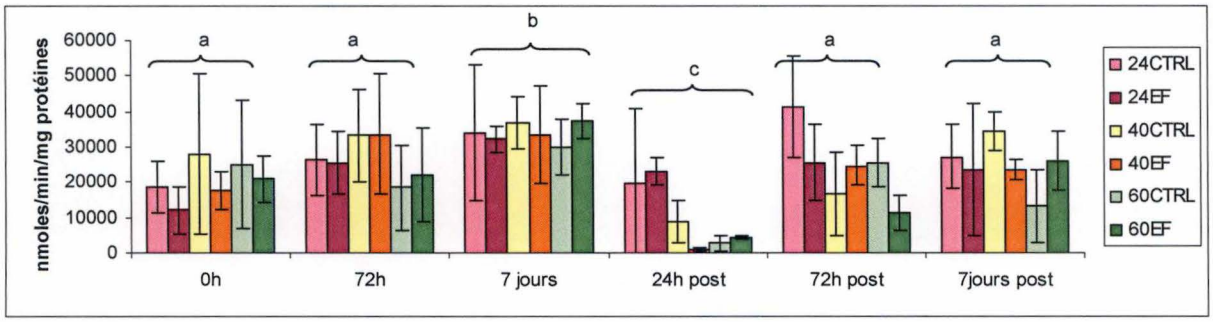
Evolution de la LPO exprimée en nmoles de MDA/g tissu dans le cerveau du *Pangasius hypophthalmus* au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c, d) ne sont pas significativement différents.

3.5. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase a été dosée sur le foie et le cerveau. Bien que l'allure générale du graphe reprenant la variation de l'activité AChE selon différentes densités et traitements au cours du temps ne soit pas identique pour les deux organes, on constate néanmoins que seul le jour de prélèvement a une influence hautement significative ($p<0,01$) sur l'activité acétylcholinestérase. L'ANOVA n'a révélé aucun effet de l'exposition à l'enrofloxacine ($p=0,46$ pour le foie et 0,22 pour le cerveau), ni de la densité ($p=0,067$ pour le foie et $p=0,071$ pour le cerveau) sur l'activité de l'enzyme.



Dosage de l'acétylcholinestérase exprimé en nmoles d'acétylcholinestérase par min et par mg de protéines dans le foie du *Pangasius hypophthalmus* au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c, d) ne sont pas significativement différents.



Dosage de l'acétylcholinestérase exprimé en nmoles d'acétylcholinestérase par min et par mg de protéines dans le cerveau du *Pangasius hypophthalmus* au cours d'une période d'exposition à l'enrofloxacine (jusqu'à 7jours) suivie d'une période de récupération (jusqu'à 7jours post traitement à l'antibiotique) et ce, pour 3 densités différentes. Les groupes qui partagent au moins une lettre (a, b, c) ne sont pas significativement différents.

Quatrième partie : Discussion

IV. Discussion

Au vu des informations que nous ont apportées les réponses biochimiques des poissons en contamination expérimentale et l'analyse statistique de nos données, nous allons pouvoir déterminer si notre but initial qui, pour rappel, était de mettre en évidence des biomarqueurs d'effet de l'exposition à l'enrofloxacine chez le *Pangasius hypophthalmus*, a été atteint.
Nous allons également émettre des suggestions quant aux futures études à mener autour de ce sujet, en nous basant non seulement sur nos résultats, mais aussi, en plaçant notre étude dans un contexte plus général grâce aux expériences qui ont déjà été menées sur différents espèces et antibiotiques utilisés en aquaculture.

Taux de peroxydation lipidique

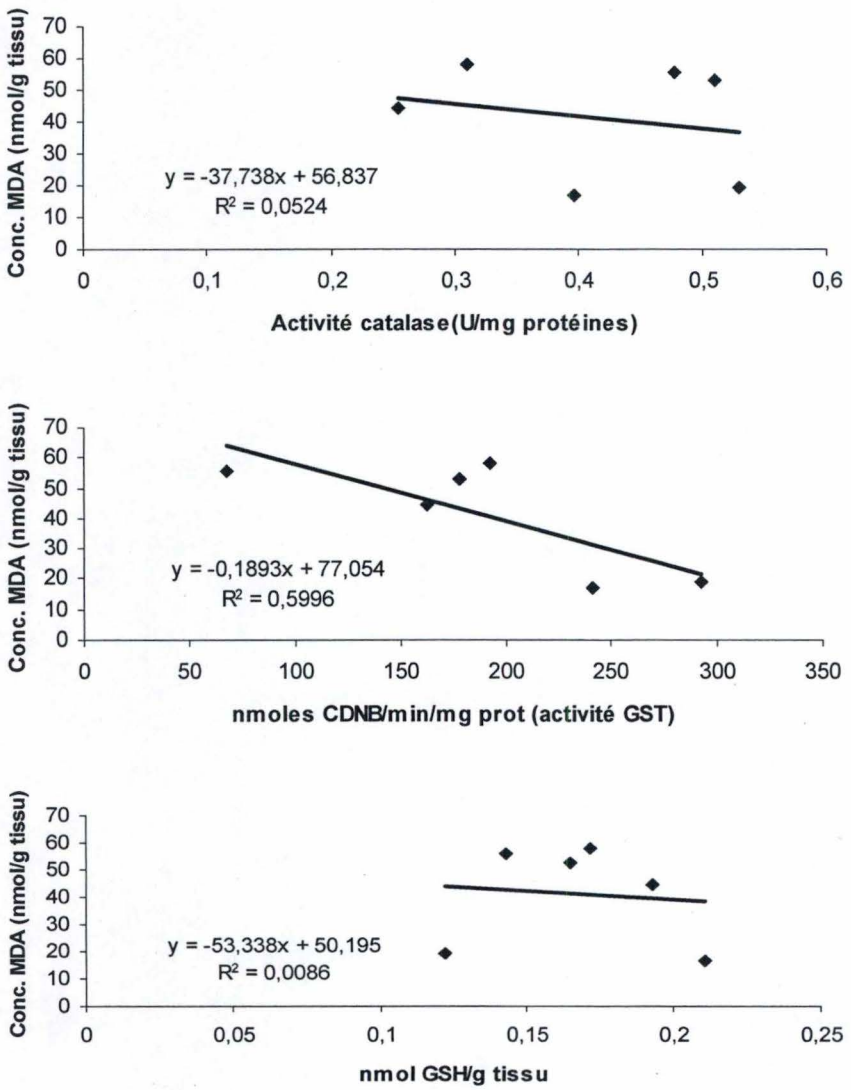
Les fluoroquinolones, telles l'enrofloxacine, sont oxydées par les enzymes microsomales hépatiques de la famille du cytochrome P450 (Stratton, 1998 dans Carreras et al., 2004). Leur métabolisme par le P450 génère des radicaux libres intermédiaires qui peuvent causer un stress oxydant (Gürbay et al., 2001). La formation d'espèces réactives (ROS) est une conséquence normale du métabolisme de l'oxygène dans les cellules aérobies, mais si elles sont produites en excès et que les systèmes antioxydants ne parviennent plus à les éliminer, ces ROS peuvent devenir nuisibles pour l'organisme.

Une des caractéristiques du stress oxydatif est la peroxydation des lipides membranaires par des radicaux hautement réactifs.
En 1988, Radi et Matkovics ont montré que des concentrations élevées en cuivre et en zinc, réduisaient significativement l'activité d'enzymes antioxydantes et augmentaient la peroxydation des lipides dans les tissus de différents poissons. La peroxydation lipidique fut également étudiée dans les branchies, reins et foie du poisson-chat hélicoptère *Wallago attu* par Pandey et al. en 2003. Les résultats suggéraient l'utilisation de la peroxydation des lipides comme biomarqueur du stress oxydant pour le monitoring de pollution des écosystèmes aquatiques.

Dans notre étude, nous avons observé une variation des taux de TBARS (nmoles MDA/g tissu) dans le foie du *Pangasius hypophthalmus* avec une augmentation significative de la peroxydation des lipides lors des prélèvements effectués 3 jours après une contamination à l'enrofloxacine ainsi qu'à 1, 3 et 7 jours de décontamination.
Le foie des poissons aurait donc subi un stress oxydant, mais, d'après nos résultats, ce dernier n'aurait pas été provoqué par l'exposition à l'enrofloxacine, ni par une densité trop élevée préalable à la contamination, puisque nous n'observons aucune différence significative entre les différentes conditions chez les poissons traités et non traités.

Pour ce qui est de la peroxydation de lipides dans le cerveau, nous constatons également un changement significatif des taux de TBARS dans le temps avec une diminution significative de la LPO le dernier jour de contamination suivie d'une peroxydation accrue des lipides à partir du deuxième jour de décontamination. L'ANOVA ne décèle toujours pas d'influence significative du traitement et de la densité. En 2004, Oberdörster observait une diminution de

la peroxydation lipidique dans le cerveau de l'achigan ou black-bass à grande bouche *Micropterus salmoides* due à l'induction d'enzymes antioxydantes dans cet organe.
Nous avons testé la corrélation entre la peroxydation des lipides du *P. hypophthalmus* et l'activité des enzymes antioxydantes dosées chez le poisson-chat du Mékong. Cette corrélation est illustrée par les graphiques ci-dessous.



Peroxydation lipidique moyenne du foie du *P. hypophthalmus* (exprimée en Concentration de nmol de MDA/g de tissu), en fonction des différentes enzymes antioxydantes.
De haut en bas: LPO en fonction de l'activité catalase moyenne (exprimée en Unité de catalase/mg de protéines); en fonction de l'activité GST moyenne (exprimée en nmol de CDNB/min/mg de protéines) et en fonction de la concentration en GSH dans le foie (nmol GSH/g de tissu).
L'équation des courbes de tendance ainsi que le coefficient de corrélation R^2 correspondant, sont indiqués sur les graphes.

Nous remarquons que la tendance des courbes traduit une légère corrélation inverse entre la peroxydation lipidique et les différentes activités, néanmoins, les coefficients de corrélation R^2 sont très faibles (5% LPO/CAT ; 59% LPO/GST ; 0,8% GSH).

En 2003, Carreras et al. n'observèrent aucun changement significatif de la peroxydation des lipides de poulets d'élevage exposés à une dose de 50mg d'enrofloxacine/l d'eau bien que l'activité de la catalase soit significativement plus élevée chez ces oiseaux. Quant à Bernard, en 2005, elle observa une diminution significative de l'activité GST dans l'hépatopancréas de crevettes *Penaeus monodon* exposées à 4g d'antibiotique furazolidone/kg de nourriture sans que cela n'influence la peroxydation lipidique.

La peroxydation des lipides du pangasius n'étant pas influencée par le traitement à l'enrofloxacine, il est envisageable qu'à la dose d'antibiotique administrée, le système antioxydant soit à même de détruire les ROS produits lors du métabolisme de la molécule.

Nous pouvons également émettre l'hypothèse que la peroxydation lipidique des poissons-chats ait été influencée par la qualité de l'eau, plus particulièrement, de la teneur en azote.
Nos analyses révèlent que la teneur en $N\text{-}NH^4$ dans les bassins du *P. hypophthalmus*, situées entre 0,097 mg/l avant traitement et 0,67mg/l pendant traitement, sont relativement élevées. Chez les poissons *Catla catla*, la DL^{50} [14] du $N\text{-}NH^4$ est de 0,036 mg/l (Tilak et al., 2002). Il en est de même pour la concentration en nitrites dont les concentrations avoisinent 1,6mg/l dans les bassins du poisson-chat alors que le taux de mortalité de saumons chinooks *Oncorhynchus tshawitsha* exposés à des concentrations de 0,5mg/l de $N\text{-}NO^2$ pendant 24h est de 40% (Smith et al., 1974). Chez ces saumons, les chercheurs mirent également en évidence une oxydation de l'hémoglobine et méthémoglobine.
Des études menées en 2005 par Ogur et al. sur des rats Sprague-Dawley ont rapporté qu'une exposition à des concentrations accrues en nitrites et nitrates influençait significativement l'augmentation de la peroxydation lipidique. Les stress oxydant causé par les formes azotées affecte significativement les érythrocytes en augmentant la fragilité de leur membrane. Chez le poisson *Clarias lazera* exposé pendant 4 jours à 32mg/l de N-NO2, on constate une oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine ce qui résulte en une capacité réduite du sang à transporter suffisamment d'oxygène vital jusqu'aux cellules de l'organisme (Hilmy et al., 1987).
Ainsi, le traitement à l'enrofloxacine pourrait avoir un effet indirect sur la santé des poissons-chats, car ces derniers rejettent significativement plus d'azote lorsqu'ils sont exposés à l'antibiotique. Une attention toute particulière doit donc être portée sur la qualité de l'eau des élevages.

Nous allons à présent nous pencher sur la réponse des différentes enzymes antioxydantes dosées lors de ce mémoire.

[14] DL^{50} ou Dose Létale^{50} : relation mortalité-dose déterminant la dose du toxique à laquelle 50% des individus d'une population meurent.

Les taux de glutathion total (GSH + GSSG)

Le glutathion est un tripeptide (γ glutamyl-cystéinyl-glycine) qui fait partie du système de défense antioxydant non enzymatique cellulaire. On le retrouve majoritairement sous sa forme réduite (GSH), avec laquelle il peut capter les ROS et autres radicaux et ainsi renforcer l'action des enzymes antioxydantes.
Généralement, la concentration en glutathion total (GSH + glutathion oxydé GSSG) augmente quand les organismes vivants sont exposés à une pollution et ce, pour contrecarrer le déséquilibre entre les espèces pro-oxydantes et antioxydantes (Winston et Di Giulio, 1991). Cependant, une diminution du taux de GSH peut également indiquer que le système de défense est surpassé par la quantité de ROS et donc, traduire un stress oxydant (Oberdörster, 2004). Cela dépend de la vitesse du métabolisme du glutathion chez l'espèce étudiée.

En 1992, Gallagher et al. ont étudié le métabolisme du glutathion dans le foie d'*Ictalurus punctatus* et n'ont observé aucune diminution du taux de GSH hépatique après avoir exposé les poissons à différentes doses de BSO (L-buthionine-S,R-sulfonixine), un inhibiteur de la biosynthèse du GSH, indiquant que le turnover du GSH hépatique est relativement lent chez cette espèce de poisson-chat.
En 2006, Ahmad et al. ont observé les effets d'une exposition de 24h au chrome sur le taux de GSH, l'intégrité de l'ADN, la LPO et les différentes enzymes antioxydantes sur les branchies et les reins de l'anguille *Anguilla anguilla*. Ils ont constaté ***une diminution*** de la concentration en GSH corrélée avec l'augmentation de la peroxydation des lipides et de la dégradation de l'ADN montrant ainsi l'importance de ce tripeptide dans la protection cellulaire contre un stress oxydatif.
Par contre, Hasselberg et son équipe (2004) ont, quant à eux, mis en évidence ***une augmentation*** de la teneur en glutathion dans le foie de la morue de l'Atlantique *Gadus morhua* après une semaine d'exposition à des alkyphénols rejetés en mer par l'exploitation pétrolière off-shore. En 1995, Nashimoto et al. avaient déjà observé *une augmentation* du taux de GSH hépatique du carlottin anglais *Pleuronectes vetulus* après 3jours d'exposition à des sédiments d'une rivière située en zone urbaine et contenant des contaminants chimiques.
Dans leurs travaux, Peña-Llopis et al. (2001 et 2002) ont opté pour l'observation du rapport GSH/GSSG comme indicateur de stress oxydant plutôt que d'utiliser les valeurs en GSH total et montrèrent que les anguilles *Anguilla anguilla* capables d'induire une augmentation du taux de GSH tout en maintenant le rapport GSH/GSSG survivent plus longtemps à un stress oxydant généré par le molinate (un herbicide) que les anguilles dont le ratio a été modifié. Ces mêmes auteurs ont montré que la mortalité de la moule *Mytilus galloprovincialis* exposée à du fenitrothion (un insecticide organophosphoré) augmentait significativement avec une diminution du rapport GSH/GSSG et en conclurent qu'un déséquilibre de ce ratio en faveur de la forme oxydée GSSG pourrait mener à un stress oxydant accru induisant la mort cellulaire par nécrose et finalement la mort de l'organisme.

Bien que nous observions une augmentation significative de la teneur en glutathion total jusqu'au 7ème jour dans le foie de nos poissons, nous n'avons mis en évidence aucun effet significatif du traitement à l'enrofloxacine sur ces taux de GSH.
Le taux de GSH dans les branchies, environ trois fois plus faible que dans le foie, est assez constant. Il serait intéressant d'analyser l'évolution du rapport GSH/GSSG dans de futures études en mesurant également les taux de glutathion oxydé dans les branchies.
Dans notre étude, il est possible que le ratio GSH/GSSG ait été modifié sans que la valeur du glutathion total n'ait subi de changement. De plus, le fait que les branchies contiennent moins

de glutathion que le foie les rend plus vulnérables à un stress oxydant car elles ont une capacité plus faible à se débarrasser des ROS. Il serait donc également intéressant de vérifier l'état de peroxydation lipidique des branchies du *Pangasius hypophthalmus*.
On peut aussi penser que le rapport GSH/GSSG ait été maintenu constant chez les poissons exposés à l'enrofloxacine et qu'il ait été suffisant pour combattre les radicaux libres libérés lors du métabolisme de l'antibiotique administré à raison de 1g/kg de granulés.

Activité de la glutathion S-transférase (GST)

Les glutathion S-transférases (GST) sont un groupe majeur d'enzymes de détoxification et leur niveau d'expression est un facteur crucial et déterminant quant à la sensibilité de la cellule à un large spectre de produits chimiques (Hayes et Pulford, 1995). Les GST catalysent l'attaque nucléophile du GSH sur ces différents produits xénobiotiques et, ainsi, jouent un rôle important dans les systèmes de détoxification des organismes et de protection contre le métabolisme des ROS.
En 1986, Ankley et son équipe constatèrent une augmentation significative de l'activité GST dans le foie du poisson-chat *Ictalurus punctatus* exposé à des doses d'au moins 100mg d'Aroclor 1254®/kg de poids corporel (l'Aroclor est une mixture de PCBs). Les études de Jebali et al. (2005) mirent également en évidence une augmentation de l'activité GST dans le foie de daurades *Sparus aurata* après une exposition au parquât 1,1'-diméthyl-4-4'-bipyridinum, un herbicide.

L'activité de la GST observée dans le foie et le cerveau du *Pangasius hypophthalmus* varie significativement dans le temps sans que cette fluctuation ne dépende de l'exposition à l'enrofloxacine car les poissons traités n'ont pas une activité GST significativement différente de ceux non exposés à l'antibiotique.
Nos résultats rejoignent les observations faites par Bernard (2005) lors de son étude sur la crevette tigrée *Penaeus monodon* exposée à un traitement de 7jours à de l'enrofloxacine selon les doses appliquées en élevage. La réponse de l'activité glutathion S-transférase de l'hépatopancréas et des branchies de la crevette n'était pas influencée par le traitement à la fluoroquinolone alors qu'elle diminuait significativement lors d'un traitement à la furazolidone, un autre antibiotique.

La Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme antioxydante majeure trouvée dans les peroxysomes en tant que catalyseur de la réduction d'un puissant agent oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en eau et oxygène moléculaire.

En 2003, Carerras et al. investiguèrent les effets d'une exposition à l'enrofloxacine sur l'activité d'enzymes antioxydantes de poulets d'élevage destinés à la distribution en grandes surfaces. L'activité CAT était significativement plus élevée dans le foie des oiseaux après une exposition de 5 jours à 50mg d'enrofloxacine/l d'eau alors qu'aucune variation significative ne fut détectée dans les muscles des volatiles. Ils attribuèrent cette différence au fait que le foie est un organe clé dans le métabolisme de l'antibiotique et que le turnover des différentes enzymes s'y fait plus rapidement. En revanche, les lipides des poulets exposés à l'enrofloxacine ne subirent pas de peroxydation significativement différente de celle des oiseaux contrôles, les enzymes antioxydantes étant capables de gérer les ROS produits par le métabolisme de l'enrofloxacine administrée à 50mg/l.

Tout comme les autres mécanismes antioxydants déjà cités dans notre étude, l'activité de la catalase dans le foie et le cerveau des *Pangasius hypophthalmus* n'a pas été influencée par l'exposition à l'enrofloxacine ni par la densité d'élevage. Nos résultats corroborent donc ceux obtenus lors de l'étude sur la crevette tigrée *Penaeus monodon*, exposée à un traitement de 7jours à 4g d'enrofloxacine/kg de nourriture, où aucun effet significatif de l'exposition à l'antibiotique sur l'activité de la catalase n'avait été décelé (Bernard, 2005).

Néanmoins, l'activité hépatique de la catalase au troisième jour d'exposition à l'enrofloxacine et un jour après l'arrêt du traitement est significativement plus faible que l'activité de l'enzyme avant l'exposition à l'antibiotique. Il est fort probable que l'activité de la CAT ait été influencée par d'autres facteurs que la densité et l'antibiotique. Des études menées par Khessiba et al. sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (2005) rapportent que l'activité de la catalase était significativement influencée par des facteurs environnementaux tels que la température de l'eau, la salinité, la photopériode et la disponibilité en nourriture.
En 2002, Pandey et son équipe ont comparé la réponse biochimique de poissons-chats hélicoptères *Wallago attu* vivant soit en amont soit en aval d'une zone industrielle en Inde. L'augmention de l'activité catalase était également corrélée à des facteurs environnementaux comme une hausse de pH, une baisse de la concentration en oxygène dissous et à une demande biologique en oxygène accrue ainsi que la concentration en nitrites et nitrates.

L'activité acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine, neurotransmetteur impliqué dans la transmission cholinergique. L'inhibition de l'AChE conduit à une accumulation d'acétylcholine au niveau des synapses, phénomène susceptible de provoquer des perturbations comportementales affectant plus particulièrement la locomotion et l'équilibre (Zinkl et al., 1991 ; Saglio et al., 1996 dans Bretaud et al., 2001).
L'inhibition de l'activité AChE est utilisée comme biomarqueur sensible d'exposition à des substances neurotoxiques.

En 2001, Bretaud et al. ont montré que l'exposition au carbofuran (un insecticide de la famille des carbamates) induit une inhibition de l'activité AChE dans le cerveau de *Carassius auratus* et ce, de manière dépendante de la dose appliquée.
Springer et al., en 1976, ont mis en évidence un effet inhibiteur de différents antibiotiques (puromycine aminonucléoside, puromycine, cycloheximide et acetoxycycloheximide) sur l'activité acétylcholinestérase de *Carassius auratus* mais à notre connaissance, aucune étude n'a encore été menée sur l'effet neurotoxique d'un traitement à l'enrofloxacine administré à des poissons.

L'analyse statistique de nos résultats n'a révélé aucun effet significatif de l'exposition à l'enrofloxacine sur l'activité de l'enzyme ni dans le foie, ni dans le cerveau du *Pangasius hypophthalmus*.
Nous pouvons donc penser que cette fluoroquinolone, appliquée à la dose de 1g/kg de granulés comme cela est pratiqué dans les élevages, n'exerce pas d'activité neurotoxique.
Les études menées en 2005 sur la crevette tigrée vietnamienne *Penaeus monodon*, exposée à un traitement à l'enrofloxacine menaient à la même conclusion.

La variation significative de l'activité AChE dans le temps, tout comme celle des autres enzymes, suggère que les poissons élevés dans des tanks, en conditions de laboratoire, subissent une certaine dégradation de leur état de santé.

Cinquième partie : Conclusions et perspectives

V. Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail était d'étudier les réponses physiologiques et biochimiques du poisson-chat du Mékong *Pangasius hypophthalmus*, suite à un traitement à l'enrofloxacine selon la dose appliquée en élevages au Vietnam, et une acclimatation préalable à différentes densités.

Globalement, nous constatons que la concentration en glutathion total (GSH) et l'activité des différentes enzymes dosées (GST, CAT, LPO, AChE), varient significativement au cours de l'expérience. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence une quelconque influence du traitement de 7 jours à l'antibiotique ni de la densité. Pour les conditions testées, ces différentes réponses biochimiques ne sont donc pas recommandables en tant que biomarqueurs d'effet de l'exposition à l'enrofloxacine.
D'après nos résultats, nous pensons qu'il serait intéressant d'élucider, lors de travaux ultérieurs, les quelques points cités ci-dessous.

Les études menées sur la cinétique de contamination à l'enrofloxacine chez différentes espèces de poissons et chez la crevette tigrée *Penaeus monodon*, ont montré que la fluoroquinolone était rapidement distribuée dans les différents organes, relativement lentement métabolisée par le foie (on retrouve rarement des traces de son métabolite, la ciprofloxacine) mais rapidement éliminée par les reins. Ainsi, chez le poisson-chat coréen *Silurus asotus*, exposé à une dose unique de 10mg/kg de poids corporel, la concentration plasmatique maximale d'enrofloxacine est atteinte après 3,44±0,81h et le $T_{1/2\ élimination}$ est de 34,13±11,5h. Pour le tilapia *Oreochromis niloticus*, on ne retrouve aucune trace de l'antibiotique ni même de son métabolite la ciprofloxacine 22 jours après l'administration orale de 50mg d'enrofloxacine/kg de poids corporel. Quant à la crevette tigrée *P. monodon* exposée deux fois par jour à 4g d'enrofloxacine/kg de nourriture pendant une semaine, 28jours après l'arrêt du traitement, on ne décèle plus que 2,4% de la concentration maximale atteinte pendant l'exposition (Kim et al., 2006 ; Weiha Xu et al., 2006 ; Bernard, 2005).

Au vu de nos résultats, nous pourrions en effet nous demander si la molécule n'a pas été directement excrétée par les reins, ce qui expliquerait que nous ne détections pas d'activité de détoxification chez les *Pangasius hypophthalmus* traités mais également que la concentration en NH_4 soit significativement plus élevée dans les bassins de poissons exposés à l'enrofloxacine.
Le degré de métabolisation de la fluoroquinolone différant considérablement selon les espèces (Cox et al., 2004), nous pensons qu'il est capital, lors de futures études menées sur ce sujet, de mettre au point le dosage de l'activité 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) pour le *P. hypophthalmus*. Nous savons que l'enrofloxacine est métabolisée en ciprofloxacine par le cytochrome P450, groupe d'enzymes catalysant les réactions de détoxification et dont l'activation peut être mesurée en déterminant l'activité EROD (Bergan et al., 1988).
Ainsi, si l'activité EROD augmente significativement chez les poissons-chats exposés à l'antibiotique, nous pourrons être certains que la molécule a été métabolisée en ciprofloxacine et donc, généré des ROS.

Dans le même sens, il serait judicieux d'établir la cinétique de contamination chez le *P. hypophthalmus* en dosant les résidus d'antibiotiques (enrofloxacine et ciprofloxacine) dans les muscles du poisson à différentes périodes de contamination et décontamination. Ainsi, nous serions également à même de confirmer si la molécule a subi une transformation générant des radicaux libres mais aussi, de déterminer à quel moment une dose de 1g d'antibiotique/kg de nourriture est métabolisée et respecte la juridiction en vigueur selon laquelle la LMR de l'enrofloxacine est de 100µg/kg de poisson.

Par la même occasion, nous trouvons intéressant d'effectuer des tests d'écotoxicité de l'antibiotique sur le poisson-chat du Mékong en évaluant le degré de sensibilité des *Pangasius hypophthalmus* confrontés à des doses plus élevées d'enrofloxacine et/ou des périodes d'exposition plus importantes. La toxicité aiguë du produit a été déterminée pour les rats, les souris et les lapins avec une DL_{50} orale de 5000mg/kg, 4336mg/kg et 500mg/kg respectivement alors qu'une intraveineuse de 200mg/kg tue 50% d'une population de souris (rapport 91/155/CEE et fiche de données de sécurité de l'enrofloxacine délivrée par la firme Sigma-Aldrich 2004) mais aucune donnée relative à l'écotoxicité du produit n'est disponible à ce jour, particulièrement chez les poissons.

Remarquons également que cette expérience a été menée sur des *Pangasius hypophthalmus* en bonne santé, sous des conditions de laboratoire ce qui, même si nous avons essayé de recréer un environnement proche de celui retrouvé en élevage, diffère grandement de la situation réelle.
En 2003, Jacobson et al. ont étudié les effets cumulés d'un stress naturel (une infection au trématode *Nanophytus salmincola*) et d'un stress anthropogénique (l'exposition à une mixture de PCB appelée aroclor 1254) sur la réponse immune et la résistance aux maladies (longévité) de saumons chinooks *Onchorhynchus tshawytscha* juvéniles. Ils ont montré que les poissons stressés par *N. salmincola* d'une part et par l'aroclor de l'autre, étaient plus vulnérables à une infection par la bactérie *Listonella anguillarum* (anciennement *Vibrio anguillarum*) que les poissons contrôles. Ils ont ensuite mis en avant le fait que ces stress naturels et anthropogéniques combinés avaient un effet immunosuppresseur significativement plus élevé que quand ils étaient investigués isolément.
Dans les fermes d'élevage de *P. hypophthalmus*, l'enrofloxacine n'est administrée que lorsqu'il y a infection. Il serait donc intéressant de mener cette expérience *in vivo*, ou du moins, sur des poissons malades pour ainsi constater si la combinaison « infection/traitement aux quinolones » a un effet significatif sur la réponse biochimique des poissons-chats.

Enfin, l'enrofloxacine est un antibiotique à large spectre d'action qui détruit aussi bien l'ADN des bactéries $Gram^+$ que celui des bactéries $Gram^-$. Elle pourrait donc avoir une influence sur la composition et l'abondance de la flore bactérienne des *Pangasius hypophthalmus*.
Les intestins sont l'habitats d'une large et dynamique communauté bactérienne qui intervient dans différents processus telle la digestion et réabsorption de certains nutriments, mais également la protection contre les microbes étrangers. En effet, certaines bactéries sont des probiotiques, c'est-à-dire, des microorganismes non pathogènes qui entrent en compétition avec les bactéries pathogènes pour les nutriments et l'espace (Holström et al., 2003) et certaines d'entre-elles peuvent même sécréter des antibiotiques naturels auxquels les autres bactéries ne sont pas résistantes (Moriarty, 1998).

Une destruction, même partielle de la flore bactérienne, peut résulter en l'affaiblissement de l'organisme hôte et le rendre plus vulnérable à certaines infections.
En 2005, Sasmal et al., ont comparé la résistance de la flore bactérienne de la crevette *Penaeus monodon* à différents antibiotiques et selon différents modes d'élevages (semi-intensifs et extensifs). Ils constatèrent que les bactéries isolées de différents organes de crevettes, étaient très sensibles à une exposition à la cirpofloxacine alors que d'autres antibiotiques, tels le chloramphénicol et l'oxytétracycline, induisaient plutôt une résistance bactérienne. Les valeurs de sensibilité ou de résistance étant toujours significativement plus élevées dans les élevages semi-intensifs.
Il serait intéressant de voir comment évolue la communauté de la flore bactérienne du *P.hypophthalmus* confrontée à un traitement à l'enrofloxacine. Il est en effet envisageable que l'antibiotique affecte la symbiose entre les bactéries et leur hôte. Ahmed et al. (2003), ont proposé d'utiliser le suivi de la composition et abondance de la flore bactérienne d'un tilapia hybride (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) comme indicateur général de la qualité de vie du poisson. Une connaissance des bactéries préférentiellement touchées par un traitement à l'enrofloxacine pourrait être utilisée comme bioindicateur de l'exposition à cette fluoroquinolone.

Sixième partie : Références bibliographiques

VI. Références bibliographiques

1. AHMAD I., HAMID T., FATIMA M. CHAND H.S., JAIN S.K., ATHAR M., RAISUDDIN S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1523**(1), 37-48. 2000.

2. AL-HARABI A., NAIM UDDIN M. Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*

3. ANDRIOLE V.T. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clinical Infectious Diseases* **41**, 113-119. 2005

4. ANKLEY G.T., BLAZER V.S., REINERT R.E., AGOSIN M. Effects of Aroclor 1254 on cytochrome P450 dependent monooxygenase, glutathione S-transfserase, and UDP-glucuronosyltransferase activities in channel catfish liver. *Aquatic Toxicology* **9**(2-3), 91-103. 1986.

5. ARCHAMBAUD M. Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques. Dans *Brûlures1*. 2001.

6. BEASLEY V. Introduction to the toxicology of the liver. Dans *Veterinary Toxicology*. 1999.

7. BERGAN T., DALHOFF A., ROHWEDDER R. Pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Infection* **16**(1), 3-13. 1988.

8. BERNARD A. Evaluation du stress oxydant chez la crevette tigrée *Penaeus monodon* Fabricius (1798) suite à l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages au Vietnam. Mémoire de licence en Science Biologiques Facultés universitaires Notre-Dame de la paix 2005, promoteur Kestemont P.

9. BERTRAND, COUSIN, HAUBRUGE, TOUTANT & CHATONNET. L'acétylcholinestérase des poissons, cible des organophosphorés et des carbamates. Caractérisation du gène et des formes moléculaires de l'enzyme chez *Danio rerio*. *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture* **71**(350-51), 535-546. 1998.

10. BOCQUENE B. L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Thèse de Doctorat, école pratique des Hautes études. 250p. 1996.

11. BOWSER P.R., HOUSE M. In vitro sensitivity of some fish pathogens to the quinolones naladixic acid and the oxolinic acid and the fluoroquinolone enrofloxacin. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **10**, 48-49. 1990.

12. BRETAUD S., SAGLIO P. & TOUTANT J-P. Effet du carbofuran sur l'activité de l'acétylcholinestérase cérébrale et sur l'activité de nage chez *Carassius auratus* (cyprinidae). *Cybium* **25**(1), 33-40. 2001.

13. BROWMAN & KRAMER. *Pangasius sutchi* (Pangasiidae), an air-breathing catfish that uses the swimbladder as an accessory respiratory organ. *Copeia* **1985**(4), 994-998. 1985.

14. BROWN S.A. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **19**, 1-14. 1996.

15. BURGEOT T., MINIER C., BOCQUENE G., VINCENT F., CACHOT J., LOIZEAU A., JAOUEN A., MIRAMAND P., GUYOT T., LESUEUR P., ROCHARD E., BOET P., BESSINETTON C., ABARNOU A., MUNSCHY C., LEBOULENGER F., FICHT A. Des organismes sous tress. Fascicule N°14 du programme scientifique Seine-Aval. Editions Ifremer. Plouzané (France). 36 pages.

16. CACOT P. & LAZARD J. Etude du cycle sexuel et maîtrise de la reproduction de *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880) et *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) dans le delta du Mékong au Viêt-Nam. 1999. Institut national agronomique Paris-Grignon.

17. CACOT P. & LAZARD J. Domestication d'espèces de poissons-chats du Mékong de la famille des Pangasiidae. *INRA Productions Animales.* **17** (3), 195-198. 2004.

18. CACOT P. & LAZARD J. Au fil du Mékong. UPR 20 « Aquaculture et gestion des ressources aquatiques ». CIRAD. 2005.

19. CAJARAVILLE M.P., BEBIANNO M.J., BLASCO J., PORTE C., SARASQUETE C., VIARENGO A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments ot the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment* **247**(2-3), 295-311. 2000.

20. CAJARAVILLE M.P., CANCIO I., IBABE A., ORBEA A. Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique* **61**(2), 191-202. 2003.

21. CARRERAS I., CASTELLARI M., GARCIA REGUEIRO J.A., GUERRERO L., ESTEVE-GARCIA E. & SARRAGA C. Influence of enrofloxacin administration and α-tocopheryl acetate supplemented diets on oxidative stability of boiler tissues. *Poultry Science* **83**, 796-802. 2004.

22. CHATTERJEE S., BHATTACHARYA S. Detoxication of industrial pollutants by the glutathione-S-transferase system in the liver of *Anabas testudineus* (Bloch). *Toxicology Letters* **22**(2), 187-198. 1984.

23. CHLENG P., BARAN E. & TOUCH B.T. Synthesis of all published information on Sutchi catfish *Pangasius hypophthalmus* ("trey pra") based on FishBase 2004. World Fish Center and Inland Fisheries Research and Development Institute, Phnom Penh Cambodia. 1-17. 2004.

24. CHO, HYNES, WOOD & YOSHIDA. Development of high-nutrient-dense, low-pollution diets and prediction of aquaculture wastes using biological approaches. *Aquaculture* **124**(1-4), 293-305. 1994.

25. CHOWDHURY, SAHA, ISLAM & DAS. Production of Thai catfish (*Pangasius sutchi*, Fowler) in the coastal impoudments of Cox's Bazaar at different stocking densities. *Journal of Aquaculture in the Tropics.* **17**(231), 240. 2002.

26. COX S.K., COTTRELL M.B., SMITH L., PAPICH M.G., FRAZIER D.L. BARTGES J. Allometric analysis of ciprofloxacin and enrofloxacin pharmacokinetics across species. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics.* **27**, 139-146. 2004. Blackwell Publishing Ltd.

27. CRUZ, RIDHA. Production of the tilapia, Oreochromis spilurus (Günther), stocked at different densities in sea cages. *Aquaculture* **99**, 95-105. 1991.

28. DELLA ROCCA G., SALVOA A., MALVISIA J., SELLOB M. The disposition of enrofloxacin in seabream (*Sparus aurata L.*) after single intraveinous injection or from medicated feed administration. *Aquaculture* **232**, 53-62. 2004.

29. ENG, PAW & GUARIN. Environmental impact of aquaculture and the effects of pollution on coastal aquaculture development in Southeast Asia. *Marine Pollution Bulletin* **20**(7), 335-343. 1989.

30. EUZET L. & PARISELLE A. Le parasitisme des poissons Siluroidei : un danger pour l'aquaculture ? *Aquatic Living Resources* **9**(h.s.), 145-151. 1996.

31. FAVIER A. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* **novembre-décembre 2003**, 108-115. 2003.

32. FERGUSON H.W., TURNBULL J.F., SHINN A., THOMPSON K., DUNG T.T., CRUMLISH M. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, *Vietnam. Journal of Fish Diseases* **24**, 509-513. 2001.

33. FROMARD & LE CONG. Les mangroves du Vietnam du Sud: histoire récente, dynamique actuelle et perspectives. *Bois et forêts des tropiques* **273**, 31-41. 2002.

34. FUHR U., WOLFF T., HARDER S., SCHYMANSKI P., STAIB A.H. Quinolone inhibition of cytochrome P450 dependent caffeine metabolism in human liver microsomes. *Drug Metaolism and. Disposition* **18**, 1005-1010. 1990.

35. GALLAGHER E.P., HASSPIELER B.M., DI GIULIO R.T. Effects of buthionine sulfoximine and diethyl maleate on glutathione turnover in the channel catfish. *Biochemical pharmacology* **43**(10), 2209-2215. 1992.

36. GRISEZ & TAN. Vaccine development for Asian aquaculture. *Diseases in Asian Aquaculture* **5**, 483-494. 2005.

37. GUARNER F., MALAGELADA J.-R. Gut flora in health and disease. *The Lancet* **361**(9356), 512-519. 2003.

38. GÜRBAY A., GONTHIER B., DAVELOOSE D., FAVIER A. & HINCAL F. Microsomal metabolism of ciprofloxacin generates free radicals. *Free radical biology & medicine* **30**(10), 1118-1121. 2001.

39. GUTTERIDGE F. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry* **41**(12), 1819-1828. 1995.

40. HASSELBERG L., MEIER S., SVARDAL A. Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cad (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* **69**(1), 95-105. 2004.

41. HAYES J.D., PULFORD D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Biochemistry and molecular biology* **30**(6), 445-600. 1995.

42. HENGSAWAT K., WARD F.J., JARURATJAMORN P. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture* **152**, 67-76. 1997.

43. HILMY A.M., el-DOMIATY N.A., WERSHANA K. Acute and chronic toxicity of nitrite to *Clarias lazera*. *Comparative biochemistry and physiology* **86**(2), 247-253. 1987.

44. HOLMSTRÖM K., GRÄSLUND S., WAHLSTRÖM A., POUNGSHOMPOO S., BENGTSSON B.-E., KAUTSKY N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International journal of food science & technology* **38**(3), 255-266. 2003.

45. HUET. A-C., CHARLIER C., TITTLEMIER A.S., SINGH G., BENREJEB S., DELAHAUT P. Simultaneous determination of (fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal Agriculture and Food Chemistry.* **54**(8), 2822-2827. 2006.

46. HUNG L.T., NGUYEN A.T., LAZARD J. Effects of frequency and time of feeding on growth and feed utilization in two asian catfishes, Pangasius bocourti (Sauvage, 1880) and Pangasius hypophthalmus (Sauvage, 1878). *Journal of Aquaculture in the Tropics* **16**(2), 171-184. 2001.

47. INTORRE L., CECCHINI S., BERTINI S., COGNETTI VARRIALE A.M., SOLDANI G., MENGOZZI G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **182**, 49-59. 2000.

48. ISLAM M.S., RAHMAN M.M., TANAKA M. Stocking density positively influences the yield and farm profitability in cage aquaculture of sutchi catfish, *Pangasius sutchi*. *Journal of Applied Ichthyology* **22**, 441-445. 2006.

49. JACOBSON K.C., ARKOOSH M.R., KAGLEY A.N., CLEMONS E.R., COLLIER T.K., CASILLAS E. Cumulative effects of natural and anthropogenic stress on immune function and disease resistance in juvenile chinook salmon. *Journal of aquatic animal health* **15**(1), 1-12. 2003.

50. JEBALI J., GUERBEJ H., BANNI M., BOUSSETTAH. Effet du paraquat sur les activités catalase, glutathion S-transférase et l'accumulation de malondialdéhyde (MDA) chez la daurade *Sparus aurata*. *MHA* **17**(49), 12-16. 2005.

51. KHESSIBA A., ROMEO M., AÏSSA P. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to Lindane. *Environmental Pollution* **133**(2), 275-281. 2005.

52. KIM M.S., LIM J.H., PARK B.K., HWANG Y.H., YUN H.I. Pharmacokinetics of enrofloxacin in Korean catfish (*Silurus asotus*). *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics* **29**, 397-402. 2006.

53. KLESIUS P.H., SHOEMAKER C.A. Development and use of modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia of catfish. *Advances in veterinary medicine* **45**, 523-537. 1999.

54. LAFAURIE M., NARBONNE JF. & GALGANI F. Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Analyst Magazine* **20**(6), 27-33. 1992.

55. LAGADIC L. Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Revue de Médecine Vétérinaire* **153**(8-9), 581-588. 2001.

56. LAZARD J. Le *Pangasius*. *AFSSA*. 2007.

57. LAZARD J. & CACOT P. Domestication des poissons-chats du Mékong du genre Pangasius. Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. 2003.

58. LECOMTE S., MOREAU N.J., CHENON M-J. NMR investigation of pefloxacin-cation-DNA interactions: the essential role of Mg^{2+}. *International Journal of Pharmaceutics* **164**(1-2), 57-65. 1998.

59. LEWBART G., VADEN S., DEEN J., MANAUGH C., WHITT D., DOI A., SMITH T., FLAMMER K. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics.* **20**, 124-128. 1997.

60. LIVINGSTONE D.R. Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Pollution and Aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire* **154**(6), 427-430. 2003.

61. LUCCHETTI D., FABRIZI L., GUANDALINI E., PODESTA E., MARVASI L., ZAGHINI A., CONI E. Long Depletion Time of Enrofloxacin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**(10), 3912-3917. 2004.

62. MACLEAN. Developing country aquaculture and harmful algal blooms. 1993.

63. MAYEAUX M.H., WINSTON G.H. Antibiotic effects on cytochrome P450 content and mixed-function oxygenase (MFO) activities in the American alligator *Alligator mississippiensis*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **21**, 274-281. 1998.

64. MONTERO D., IZQUIERDO M.S., TORT L., ROBAINA L. & VERGARA J.M. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata,* juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**, 53-60. 1999.

65. MORIARTY D.J.W. Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* **164**(1), 351-358. 1998.

66. MOUTOU K.A., BRAUNBECK T., HOULIHAN D.F. Quantitative analysis of alterations in liver ultrasrtucture of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after administration of the aquaculture antibacterials oxolinic acid and flumequine. *Diseases of aquatic organisms* **29**, 31-34. 1997.

67. NISHIMOTO M., LE EBERHART B.-T., SANBORH H.R., KRONE C., VARANASI U., STEIN J.E. Effects of a complex mixture of chemical contaminants on hepatic glutathione, L-cysteine and gamma-glutamylcysteine synthetase in English sole (*Pleuronectes vetulus*). *Environmental toxicology and chemistry* **14**(3), 461-469. 1995.

68. OBERDÖRSTER E. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile Largemouth Bass. *Environmental health perspectives* **112**(10), 1058-1062. 2004.

69. OGUR R., COSKUN O., KORKMAZ A., OTER S., YAREN H., HASDE M. High nitrate intake impairs liver functions and morphology in rats; protective effects of α-tocopherol. *Environmental toxicology and pharmacology* **20**(1), 161-166. 2005.

70. OTERO J.L., MESTORINO N., ERRECALDE J.O. Enrofloxacina: una fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Quimica, mecanismo de accion, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. *Analecta Veterinaria* **21**(1), 31-41. 2001.

71. PANDEY S., PARVEZ S., SAYEED I., HAQUE R., BIN-HAFEEZ B. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The Science of the Total Environment* **309**, 105-115. 2003.

72. PARVEZ S. Biomarkers of oxydative stress in *Wallago attu* (Bl. And Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. *Science of the Total Environment* **368**(2-3), 627-636. 2006.

73. PENA LLOPIS S., PENA J.B., SANCHO E., FERNANDEZ-VEGA C., FERRANDO M.B. Glutathione-dependent resistance of the eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere* **45**(4-5), 671-681. 2001.

74. PENA LLOPIS S., FERRANDO M.B., PENA J.B. *Chemosphere* **47**(5), 485-497. 2002.

75. PHUONG N.T. Brief information on catfish production in the Mekong River Delta, Viet Nam. 2007.

76. PHUONG N.T., YI Y., Le Bao NGOC, GRIFFITHS D. A case study of environmental management of catfish farming in the Mekong River Delta of Viet Nam. 2007.

77. QUABIUS, NOLAN, SEGNER & WENDELAAR BONGA. Confinement stress and starvation modulate the induction of EROD activity after exposure to PCB 126 in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* **25**, 109-119. 2002.

78. RADI A.A., MATKOVICS B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comparative biochemistry and physiology* **90**(1), 69-72. 1988.

79. RAHMAN M.M., HALDER G.C., TANAKA M. Cage culture of sutchi catfish, *Pangasius sutchi* (Fowler 1937): effects of stocking density on growth, survival, yield and farm profitability. *Aquaculture Research* **37**, 33-39. 2006.

80. SAMUELSEN O.B. Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review. *Aquaculture* **255**, 55-57. 2006.

81. SARTER S., NGUYEN H.N.K., HUNG L.T., LAZARD J., MONTET D. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish: soumis à la revue *Food Control*. 2006.

82. SASMAL D., QURESHI T.A., JAWAHAR ABRAHAM T. Comparison of antibiotic resistance in bacterial flora of shrimp farming systems. *The internet journal of microbiology* **1**(1). 2005.

83. SAYEED I., PARVEZ S., PANDEY S., BIN-HAFEEZ B., HAQUE R., RAISUDDIN S. Oxidative stress of exposure to deltamethrine in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**(2), 295-301. 2003.

84. SCHLOSBERG A., ERSHOV E., BELLAICHE M., HANJI V., WEISMAN Y., SOBACK S. The effects of enrofloxacin on hepatic microsomal mixed function oxidase in boiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **18**, 311-313. 1995.

85. SMITH C.E., WILLIAMS W.G. Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. *Transaction of the American Fisheries Society* **103**, 389-390. 1974.

86. SPRINGER A.D., SCHACHT J., AGRANOFF B.W. The effect of memory blocking antibiotics and their analogs on acetylcholinseterase. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **5**(1), 1-3. 1976.

87. STOFFREGEN D.A., WOOSTER G.A., BUSTOS P.S., BOWSER P.R., BABISH J.G. Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* **20**, 111-123. 1997.

88. TILAK K.S., LAKSHIMI S.J., SUSAN T.A., The toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the fish *Catla catla* (Hamilton). *Journal of environmental biology* **23**(2), 147-149. 2002.

89. VACCARO E., GIORGI M., LONGO V., MENGOZZI G., GERVASI P.G. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology* **62**, 27-33. 2003. .

90. VALAVANIDIS A., VLAHOGIANNI T., DASSENAKIS M., SCOULLOS M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**, 178-189. 2006.

91. VANCUTSEM & BABISH J.G. In vitro and in vivo study of the effects of enrofloxacin on hepatic cytochrome P450. Potential for drug interactions. *Veterinary and Human Toxicology* **38**(4), 254-259. 1996.

92. VANDEPUTTE M. & PRUNET P. Génétique et adaptation chez les poissons: domestication, résistance au stress et adaptation au condition de milieu. *INRA Productions Animales* **15**(5), 365-371. 2002.

93. WEIHAI X., XIAOBIN Z., XINTING W., LIPING D., GAN Z. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **254**(1-4), 1-8. 2006.

94. WENDELAAR BONGA. The stress response in fish. *Physiological reviews* **77**, 591-625. 1997.

95. WINSTON G.W., DI GIULIO R.T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology* **19**(2), 137-161. 1991.

96. ZASLOFF. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395. 2002.