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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

L'influence de l'atrazine sur le développement des gonades de cyprinidés

El Hajjaji, Hafida

Award date:
1995

Awarding institution:
Universite de Namur

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: 02. May. 2026

0 1 DEC. 1995

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX

FACULTE DES SCIENCES

L'influence de l'ATRAZINE sur le développement des gonades de cyprinidés

Mémoire présenté pour l'obtention du certificat en
écotechnologie des eaux continentales
Diplôme d'études complémentaires

par

Hafida EL-HAJJAJI

Décembre 1995

Unité d'Ecologie des Eaux Douces

Promoteur : Prof. **J.-C. MICHA**
Co-promoteur : **P. KESTEMONT**

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - telex 59222 Facnam-b - telefax 081/72.44.20

Influence de l'atrazine sur le développement des gonades de cyprinidés

Hafida EL-HAJJAJI

Résumé

Le but de notre travail était d'étudier l'effet de l'atrazine sur le développement des gonades de cyprinidés. Les paramètres d'évaluation de la toxicité de l'atrazine sur la reproduction sont : la qualité des gamètes (nombre, diamètre et poids des oeufs, motilité, viabilité et concentration des spermatozoïdes), les niveaux hormonaux des stéroïdes sexuels (la testostérone, la 17β-oestradiol et le 11-kétotestostérone) et la concentration plasmatique en vitellogénine.

Pour ce fait, les goujons, qui ont été capturés par pêche électrique en milieu naturel (Ourthe) ont été répartis dans trois aquariums (28 individus par aquarium dont 50 % mâles et 50 % femelles) traités par trois concentrations différentes d'atrazine (Bac témoin = 0 mg/l, Bac 0,1 = 0,1 mg/l et Bac 1 = 1 mg/l). Des problèmes de régression ovocytaire sont apparus dans tous les lots, probablement suite à une mauvaise accommodation des poissons aux conditions expérimentales (bassin et alimentation). Cette hypothèse se renforce par le fait que même les individus du groupe témoin présentaient les ovocytes en atrésie. Par ailleurs, les niveaux d'hormones sexuelles telles que la testostérone et la 17β-oestradiol ont fortement chuté, ce qui s'est marqué par une diminution très nette du phosphore protéique plasmatique dans tous les lots. Nous avons été amené à sélectionner une seconde espèce (le tilapia *Oreochromis aureus*) habituée aux conditions d'élevage artificiel, provenant d'une station de recherche en pisciculture pour réaliser une nouvelle expérience par les mêmes traitements. Nous les avons divisés en trois lots (8 individus par lot dont 6 femelles et 2 mâles). Ces poissons étaient habitués aux conditions artificielles d'élevage.

Lors de notre deuxième expérience, au vu de nos résultats, mis à part l'obtention de concentrations en phosphore protéique et en 17β-oestradiol plasmatique légèrement inférieures chez les deux groupes contaminés par rapport au groupe témoin, et la légère diminution du diamètre et du nombre des oeufs chez les mêmes groupes, aucune influence significative des traitements n'a pu être observée. Malheureusement, des problèmes pathologiques sont à nouveau apparus durant cette seconde expérience. Ces problèmes, même s'ils ont été rapidement maîtrisés dans les deux lots (témoin et le moins contaminé), ont probablement limité la portée de nos résultats.

MOTS CLES: Poissons, Gonades, Hormones stéroïdes, Atrazine.

Mémoire de Certificat en Ecotechnologie des Eaux Continentales
Diplôme d'Etudes Complémentaires
Décembre 1995
Promoteur : Prof. *J.-C. MICHA*
Co-promoteur : Dr. *P. KESTEMONT*

Remerciements

Au terme de ce travail qui m'a été confié, je voudrais remercier l'ensemble des personnes qui ont fait mon quotidien. Parmi celles-ci:

J'exprime ma grande gratitude au professeur MICHA qui m'a ouvert aimablement les portes de son unité.

Merci au docteur KESTEMONT pour tous ses conseils judicieux, et sa grande disponibilité à répondre à toutes les questions, sa rigueur scientifique et son soutien ont été de précieux enseignements pour l'entreprise de ce travail.

J'adresse une reconnaissance spéciale au professeur P. DEVOS qui m'a permis de réaliser toutes mes expériences dans son Laboratoire.

Merci également au Professeur R. LELOUP de m'avoir accueillie dans son département d'Histologie-Embryologie, au professeur R.PAQUAY pour avoir mis son matériel à notre disposition, ainsi qu'à Ch. MELARD du CERER pour m'avoir gracieusement fourni les tilapias nécessaires à nos expériences.

Je remercie également Jacques RINCHARD pour son aide précieuse dans l'acheminement de ce travail.
Merci à Gilles GOORMANS pour ses conseils et son expérience dont j'ai tiré profit.

J'adresse un grand merci à Véronique GOSSELAIN pour sa sympathie et son soutien durant cette année académique.

Je m'en voudrais d'oublier les membres de l'Unité d'Ecologie des Eaux Douces pour leur collaboration et leur soutien.

Je n'oublierai certainement pas, tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin à accomplir ce travail dans les moments les plus difficiles .
Enfin c'est envers mes parents, mes frères et soeurs et tous les amis que je suis la plus reconnaissante, pour leur soutient et leurs encouragements qu'ils n'ont jamais cessé de me manifester.

Remerciements

Au terme de ce travail qui m'a été confié, je voudrais remercier l'ensemble des personnes qui ont fait mon quotidien. Parmi celles-ci:

J'exprime ma grande gratitude au professeur MICHA qui m'a ouvert aimablement les portes de son unité.

Merci au docteur KESTEMONT pour tous ses conseils judicieux, et sa grande disponibilité à répondre à toutes les questions, sa rigueur scientifique et son soutien ont été de précieux enseignements pour l'entreprise de ce travail.

J'adresse une reconnaissance spéciale au professeur P. DEVOS qui m'a permis de réaliser toutes mes expériences dans son Laboratoire.

Merci également au Professeur R. LELOUP de m'avoir accueillie dans son département d'Histologie-Embryologie, au professeur R.PAQUAY pour avoir mis son matériel à notre disposition, ainsi qu'à Ch. MELARD du CERER pour m'avoir gracieusement fourni les tilapias nécessaires à nos expériences.

Je remercie également Jacques RINCHARD pour son aide précieuse dans l'acheminement de ce travail.
Merci à Gilles GOORMANS pour ses conseils et son expérience dont j'ai tiré profit.

J'adresse un grand merci à Véronique GOSSELAIN pour sa sympathie et son soutien durant cette année académique.

Je m'en voudrais d'oublier les membres de l'Unité d'Ecologie des Eaux Douces pour leur collaboration et leur soutien.

Je n'oublierai certainement pas, tous ceux qui m'ont aidé de près et de loin à accomplir ce travail dans les moments les plus difficiles .
Enfin c'est envers mes parents, mes frères et soeurs et tous les amis que je suis la plus reconnaissante, pour leur soutient et leurs encouragements qu'ils n'ont jamais cessé de me manifester.

Table des matières

INTRODUCTION 4

PREMIERE PARTIE : **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE** 7

1. RAPPEL DES DONNEES RELATIVES A L'ATRAZINE 8

1.1. PROPRIETES ET DOMAINES D'UTILISATION DE L'ATRAZINE 8
1.2. MODE D'ACTION DE L'ATRAZINE 8
1.3. QUELQUES NOTIONS SUR LA TOXICITE DE L'ATRAZINE 8
1.3.1. Toxicité aiguë 9
1.3.2. Toxicité chronique 9

2. PRINCIPAUX EFFETS DES POLLUANTS SUR LA REPRODUCTION DES TELEOSTEENS AVEC UNE ATTENTION PARTICULIERE SUR L'ACTION DES HERBICIDES. 10

2.1. EFFETS SUR LES OVAIRES 10
2.1.1. Effets sur la morphologie de l'ovaire 11
2.1.2. Effets sur la synthèse de vitellogénine 11
2.1.3. Effets sur la vitellogenèse 13
2.1.4. Effets sur la maturation ovocytaire, l'ovulation et la ponte 13
2.1.5. Effets sur le nombre et la viabilité des œufs 14
2.2. EFFETS SUR LA MORPHOLOGIE DES TESTICULES ET LA SPERMATOGENESE 15
2.3. EFFETS SUR LES NIVEAUX HORMONAUX 15
2.3.1. Effets sur les hormones hypothalamiques et pituitaires 15
2.3.2. Effets sur les stéroïdes ovariens 16
2.3.3. Effets sur les stéroïdes testiculaires 17
2.4. EFFETS SUR LE CATABOLISME HEPATIQUE 18

3. AUTRES EFFETS DES POLLUANTS SUR LA REPRODUCTION DES POISSONS 18

4. CONCLUSION 19

DEUXIEME PARTIE : **MATERIEL ET METHODES** 20

1. LES ESPECES CIBLES 21

1.1. LE GOUJON *GOBIO GOBIO* 21
1.2. LE TILAPIA DORE *OREOCHROMIS AUREUS* 21

2. PRODUIT HERBICIDE 21

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES 22

3.1. EXPERIENCE 1, LE GOUJON (*GOBIO GOBIO*) 22
3.1.1. Schéma expérimental 22
3.2. EXPERIENCE 2, LE TILAPIA DORE (*OREOCHROMIS AUREUS*) 22

4. PRECAUTIONS METHODOLOGIQUES 23

5. MESURE DES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES 24

5.1. LES GOUJONS 24
5.2. LES TILAPIAS 24

6. EXAMEN ENDOCRINOLOGIQUE 24

6.1. LES DOSAGES DE LA 17β-OESTRADIOL, DE LA TESTOSTERONE ET DE LA 11-KETO-TESTERONE 24
6.1.1. Extraction de la 17β-oestradiol, de la testostérone et de la 11-ketotestostérone 24
6.1.2. Dosage proprement dit de la 17β-oestradiol, de la testostérone et de la11-ketotestostérone 25

7. LE DOSAGE DU PHOSPHORE PROTEIQUE PLASMATIQUE 25

8. ANALYSE DU SPERME 27

8.1. LA CONCENTRATION DES SPERMATOZOIDES 27
8.2. LA MOTILITE DES SPERMATOZOIDES 27
8.3. LA VIABILITE DES SPERMATOZOIDES 27

9. HISTOLOGIE DES OVAIRES 28

9.1. COUPES ET COLORATION 28
9.2. OBSERVATIONS DES COUPES 28

10. TRAITEMENT DES DONNEES 29

TROISIEME PARTIE : **RESULTATS ET DISCUSSION** 30

1. EXPERIENCE 1, LE GOUJON (*GOBIO GOBIO*) 31

1.1. CONDITIONS DE STOCKAGE 31
1.2. EFFETS DE L'ATRAZINE SUR LA MATURITE DES POISSONS 31
1.2.1. Effets de l'atrazine sur l'évolution du rapport gonadosomatique 31
1.2.2. Effets de l'atrazine sur l'évolution des hormones sexuelles circulantes 32
1.2.2.1. Evolution de la 17β-oestradiol 32
1.2.2.2. Evolution de la testostérone 32

1.2.2.3. Evolution de la 11-kétotestostérone chez les mâles 32
1.2.3. Effets sur l'évolution du phosphore protéique plasmatique 32
1.2.4. Histologie des ovaires 32
1.3. DISCUSSION 35

2. EXPERIENCE 2, LE TILAPIA (*OREOCHROMIS AUREUS*) 36

2.1. LES CONDITIONS DE STOCKAGE 36
2.2. EFFETS DE L'ATRAZINE SUR L'EVOLUTION DES PARAMETRES ENDOCRINOLOGIQUES CHEZ LES FEMELLES 36
2.2.1. Evolution de la 17β-oestradiol (E2) 36
2.2.2. Evolution de la testostérone (T) 37
2.3. EFFETS DE L'ATRAZINE SUR L'EVOLUTION TEMPORELLE DE LA TENEUR EN PHOSPORE PROTEIQUE PLASMATIQUE (PPP) 37
2.4. EFFETS DE L'ATRAZINE SUR L'EVOLUTION DES PARAMETRES ENDOCRINOLOGIQUES CHEZ LES MALES 37
2.4.1. Effets de l'atrazine sur l'évolution de la testostérone (T) 37
2.4.2. Effets de l'atrazine sur l'évolution de 11-ketotestostérone (11-KT) 43
2.5. EFFETS DE L'ATRAZINE SUR L'ABONDANCE ET LA QUALITE DES GAMETES 43
2.5.1. Effets de l'atrazine sur la laitance 43
2.5.2. Effets de l'atrazine sur la qualité des ovules 43
2.5.2.1. Effets de l'atrazine sur le nombre d'ovules pondus 43
2.5.2 2. Effet de l'atrazine sur le poids moyen des ovules 45
2.5.2.3. Effet de l'atrazine sur le diamètre moyen des oeufs 45
2.6. DISCUSSION 45

QUATRIEME PARTIE : **RESUME ET CONCLUSIONS** 47

REFERENCES 50

ANNEXES 57

INTRODUCTION

L'environnement est de plus en plus transformé par les activités humaines, au point qu'il n'existe pratiquement plus de milieux réellement naturels. C'est particulièrement vrai dans les pays industrialisés, où les cours d'eau sont trop souvent utilisés à des fins difficilement compatibles avec un bon fonctionnement biologique.

Bien des actions humaines concourrent à la dégradation des rivières et des plans d'eau. La construction de barrages (production d'électricité, réserves d'eau ou plans d'eau à vocation touristique), les captages d'eau, les aménagements hydrauliques et la canalisation des cours d'eau navigables et non navigables (curages et rectification des berges), l'assèchement des zones humides et l'enrésinement des bassins versants sont autant de phénomènes dont l'impact se révèle extrêmement préjudiciable envers la faune et la flore dulçaquicoles.

Le problème est d'autant plus complexe que, non seulement l'homme rejette des produits nocifs, mais il invente, fabrique et utilise sans cesse des substances chimiques nouvelles, dont les propriétés et les effets sur les différents compartiments des écosystèmes ne sont pas nécessairement connus. Ce n'est parfois que bien longtemps après la mise en circulation de telles substances dans le circuit commercial et industriel que se révèle leur nocivité.

D'ailleurs, divers types de pollution existent et représentent de loin la cause principale du déclin de la faune ichtyologique (PHILIPPART et VRANKEN, 1983). On peut les classer de diverses manières, que ce soit selon leur durée, leur origine, ou l'agent qui en est responsable; il faut cependant toujours garder à l'esprit que l'altération du milieu par un type de polluant induit souvent plusieurs effets négatifs cumulés.

La culture intensive moderne est un des exemples les plus marquants montrant que l'activité humaine affecte l'écosystème. Les triazines rencontrées le plus fréquemment dans le milieu aquatique sont celles utilisées comme herbicides dans l'agriculture et l'horticulture. Les émissions résultants des pulvérisations et des lessivages conduisent à des apports importants. En effet les concentrations en atrazine les plus élevées (0,4 à 1 µg/ml), ont été mises en évidence de mai à juillet dans la Meuse. Bien qu'une bonne correspondance puisse être observée entre le débit de la Meuse et la concentration en atrazine, il est intéressant de relever que les crues hivernales de la Meuse provoquent une charge importante en atrazine (BARTINCHAMPS et SAVOIR, 1991, 1993).

Par le processus de bioaccumulation, les organismes qui occupent les niveaux supérieurs des chaînes alimentaires sont soumis à des concentrations importantes de toxiques rémanents. En conséquence, dans le milieu aquatique, les populations de poissons sont parmi les plus affectées; c'est la raison pour laquelle nous avons choisi de nous y intéresser.

Intérêt et justification de l'étude

Ainsi le milieu aquatique fait l'objet de multiples agressions, qui entraînent à plus ou moins long terme une diminution de certaines populations de poissons, voire leur disparition complète de fait, et pour ne citer que le cas de l'Amérique du nord, on a constaté au cours des 100 dernières années l'extinction d'au moins 3 genres, 27 espèces et 13 sous-espèces de poissons, disparition parmi lesquelles 40 sont imputables à la pollution (MILLER *et al.,* 1989).

La contamination des milieux aquatiques par divers polluants d'origine industrielle ou agricole se manifeste par la diminution de la fécondité des poissons. La quasi-dispersion de certaines espèces peuplant de vastes territoires ne résultent pas d'intoxication aiguë, provoquant la mortalité spectaculaire chez les adultes (HUGLA, 1994). Elle provient des désordres physiologiques plus discrets qui affectent le potentiel biotique des individus contaminés. Ainsi les ovaires de quelques anguilles jaunes et argentées présentent des anomalies relatives aux ovocytes provenant de milieux littoraux saumâtres (étang de Canet) et de milieux continentaux (lac du Soler) (BRUSLE et BRUSLE, 1992). Aucune cause précise ne peut être avancée mais les agents étiologiques suspectés peuvent être d'origine exogène (polluants divers contaminant les milieux naturels). En Asie, une diminution de la reproduction annuelle des poissons est causée par une utilisation excessive des pesticides et d'autres produits chimiques pour la culture du riz (HUGLA, 1994).

Les émissions d'atrazine, qui constitue la triazine la plus utilisée, sont les plus importantes, et se rencontrent en quantités non négligeables dans les eaux. Cette molécule est toujours menacée d'interdiction; elle a été inscrite sur une liste des molécules dont l'homologation va être réexaminée. Par exemple en 1992, l'Etat néerlandais a essayé de supprimer l'autorisation d'utiliser l'atrazine. Il était devenu évident qu'en de nombreux endroits les eaux souterraines et de surface étaient polluées d'une telle manière qu'elles ne pouvaient plus servir à produire de l'eau potable par des techniques d'épuration simples.

On a vu par ailleurs que les polluants peuvent être à l'origine de nombreuses lésions organiques qui, si elles n'entraînent pas la mort des individus intoxiqués, sont susceptibles d'induire des altérations profondes de voies métaboliques essentielles. Le risque apparait dès lors de voir diminuer la capacité de reproduction des individus contaminés, donc les chances de survie de leur descendance et, à terme, de la population voire de l'espèce.

Ce sont, dès lors, toutes ces raisons qui nous ont déterminé à mener la présente recherche. Nous avons simulé, en conditions contrôlées, l'action de l'atrazine sur la reproduction du poisson. Pour ce faire, nous avons contaminé des poissons expérimentaux par deux concentrations différentes susceptibles de les affecter en milieu naturel.

L'objetif de ce travail est de déceler l'action et d'expliquer, au niveau des différentes stratégies de croissance ovocytaire, l'effet spécifique de cette toxine sur la vitellogenèse, la réponse ovulatoire ou le déclenchement des phénomènes d'atrésie, la motilité, la viabilité, la concentration des spermatozoïdes, ainsi que sur la teneur plasmatique en stéroïdes sexuels : testostérone, 17β-oestradiol et 11-kétotestostérone et en vitellogénine.

La première partie de ce travail consistera à réaliser une synthèse bibliographique. Elle repose sur l'analyse de données de la littérature relatives aux différents polluants

responsables d'anomalies au niveau des différentes stratégies de la reproduction, et notamment des herbicides provoquant des lésions germinales et des perturbations des stéroïdes sexuels chez les poissons téléostéens.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous tenterons d'expliquer les observations et les résultats recueillis au cours de nos expériences, menées sur des poissons témoins et contaminés par de l'atrazine.

PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

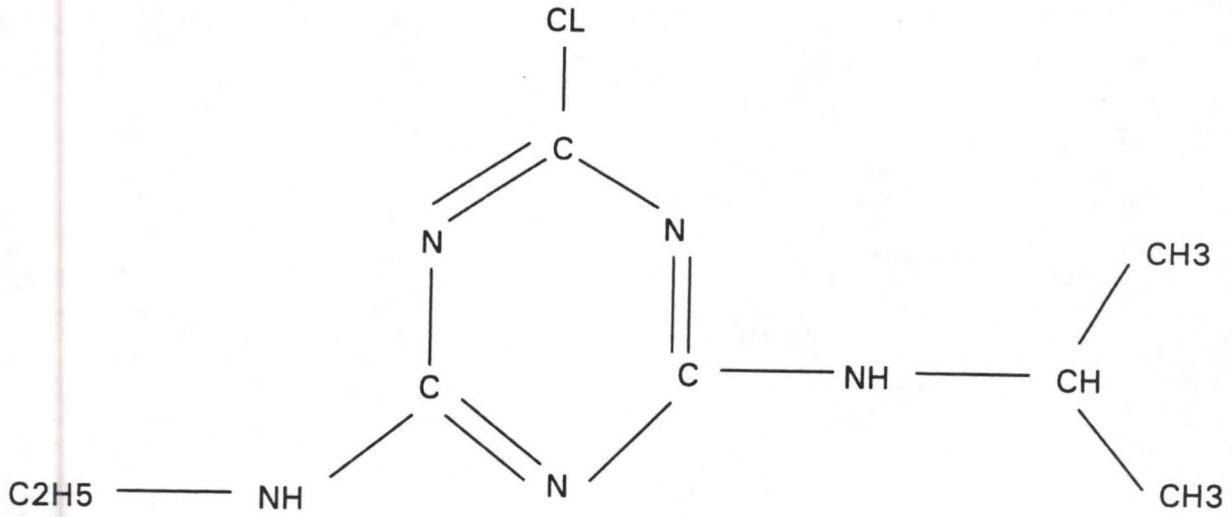


Figure 1.1 : Structure chimique de l'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-triazine) (LAUWERYS, 1990).

1. RAPPEL DES DONNEES RELATIVES A L'ATRAZINE

1. 1. PROPRIETES ET DOMAINES D'UTILISATION DE L'ATRAZINE

Les triazines, avec principalement l'atrazine (Figure 1.1), sont des herbicides très largement appliqué sur culture de maïs et de sorgho à raison de 1 à 1,5 kg/ha. L'atrazine inhibiteur de la photosynthèse, pénètre par voie racinaire. Il est véhiculé par la sève brute à travers les vaisseaux du xylème jusqu'aux feuilles grâce au flux d'eau transpiratoire. Au niveau du chloroplaste l'atrazine bloque le transfert électronique photodépendant par fixation au niveau de la protéine D1 (32KD) (MORELAND et HILL, 1959). Par métallisation de l'atrazine, maïs et sorgho résistent à cet herbicide. Certaines adventices sont capables de résister génétiquement à cet herbicide par mutation du gène psb A codant pour la protéine D1. C'est le cas de races de chénopodes, d'amarantes,de morelles, etc....

La persistance de l'atrazine est assez importante et dépend de plusieurs facteurs (température, humidité, pH, ...) (Tableau 1.1; COLUMA, 1983) et sa solubilité dans l'eau est faible 28 mg/l à 20°C.

1. 2. MODE D'ACTION DE L'ATRAZINE

- L'atrazine est absorbée par les racines et les feuilles (Figure 1.2).
- Elle agit sur les graminées et adventices et sur de nombreuses dicotylédones.
- Les triazines (atrazine et simazine) empêchent l'assimilation du gaz carbonique; la photosynthèse est bloquée; la plante utilise alors ses réserves nutritives jusqu'à épuisement, puis meurt.

1. 3. QUELQUES NOTIONS SUR LA TOXICITE DE L'ATRAZINE

Les données obtenues dans la littérature sont peu abondantes. Nous sommes dès lors limités à la présentation de quelques informations relatives au degré de toxicité de l'atrazine (Tableau 1.2).

L'atrazine est considérée comme dangereuse (mutagène, cancérogène) par l'Union Européenne et fait partie d'une liste de 90 substances actives qui devraient faire l'objet d'une réglementation très stricte. Elle est toxique pour les poissons et très toxique pour les algues (BUDIMER et al, 1987). Les produits de dégradation de l'atrazine sont aujourd'hui connus : l'atrazine peut se dégrader sous la forme de déséthylatrazine, déisopropylatrazine, hydroxyatrazine et acide isocyanurique.

La contamination des organismes aquatiques par l'atrazine peut s'effectuer suivant deux processus : soit par voie trophique, c'est-à-dire par absorption de nourriture contaminée, soit par voie directe, c'est-à-dire par passage du toxique à travers les surfaces d'échanges telles que la peau et les branchies (HUBER, 1992). Souvent quand le poisson est continuellement nourri par des micro-organismes contaminés, on n'observe pas d'accumulation du polluant à long terme, parce qu'il se produit un équilibre entre l'absorption du polluant et son élimination; ceci a été confirmé par une contamination directe de deux espèces du carpe (*Cyprinus carpio* et

Tableau 1.1 : Temps de demi-vie de l'atrazine en fonction de la température et de l'humidité..

HUMIDITE (% CR)	TEMPERATURE (°)	TEMPS DE ½ VIE (mois)
CR*	4	5,5
	8	3,5
	13	2,5
	20	1
CR	13	2
75		2
50		2,5
25		7,5

CR* = capacité de rétention.
CR = quantité maximale d'eau retenue par un sol après ressuyage c'est-à-dire après élimination de l'eau de gravité occupant les espaces lacunaires interagrégats.

Tableau 1.2 : Effets de l'atrazine sur l'homme et l'environnement.

	ATRAZINE
Homme	O O (*)
Poissons	O
Insectes	O
Animaux	O
DL 50 RAT mg/KG	3000
DJA mg/kg	—

(*) risques cancérigènes suspectés.

Légende

O Peu dangereux

O Modérément dangereux

Cyprinus fera) avec une faible dose de 100 µg/l pendant une durée de quatre mois (GUNKEL, 1981).

La toxicité, exprimée généralement en dose létale (LD 50) d'une manière active, est la quantité de celle-ci nécessaire pour tuer 50 % d'une population d'animaux (par exemple des poissons) dans des conditions bien déterminées de laboratoire.

1. 3. 1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est une exposition de courte durée caractérisée par une absorption rapide du toxique et des manifestations d'intoxication qui se développent rapidement.

L'atrazine est modérément toxique pour l'homme et d'autres animaux. Chez l'homme les symptômes d'empoisonnement comprennent des douleurs abdominales accompagnées de diarrhées et de vomissements, d'irritation des yeux et des membranes muqueuses (HALLENBECK, 1985). La contamination des rats à fortes doses provoque : stress, incoordination, difficultés respiratoires et diminution de la température corporelle (HAYES, 1990). En France, entre 1972 et 1984; 9,6% de la pollution provoquant des mortalités piscicoles importantes a été attribué à l'effet de l'atrazine (BELAMIE et GIROUD, 1986).

Les tests de toxicité de l'atrazine dissoute dans l'eau indiquent que les valeurs des concentrations létales (CL 50) varient en fonction du temps d'exposition et présentent des fluctuations qui dépendent de l'espèce, sont de 41 mg/l après 48 heures et de 18,8 mg/l après 96 heures chez la carpe (*Cyprinus carpio*) (NESCPVICET BUDIMIR, 1993); de 6,9 mg/l chez les crustacés (*Daphnia magna*). Chez les algues, la CL 50 est de 130 µg/l et pas de décontamination (BUDIMER *et al.*, 1993).

1. 3. 2. Toxicité chronique

La toxicité chronique est l'exposition répétée pendant une longue période de temps (en général pendant toute la durée de la vie de l'animal de laboratoire). Les signes d'intoxication se manifestent :

- soit parce que le poison s'accumule dans l'organisme, c'est-à-dire qu'à chaque exposition la quantité éliminée est inférieure à la quantité absorbée;
- soit parce que les effets engendrés par des expositions répétées s'additionnent sans que le toxique ne s'accumule dans l'organisme.

Les concentrations en atrazine les plus élevées qui aient été mesurées dans les zones naturelles, par exemple les valeurs maximales obtenues dans la Meuse, sont de 0,4 à 1 µg/l (Figure 1.3) n'ont jamais été suffisantes pour induire des mortalités chez les espèces appartenant aux écosystèmes pollués. Il semble par contre que de tels niveaux de contamination chez les organismes aquatiques soient responsables d'effets sublétaux :

- Des risques cancérigènes sont suspectés:
  - dermites de contact aczématiformes,
  - œdème généralisé, turgescence des tissus épithéliaux, noircissement du tégument (CABANE, 1977; QUIROS, 1978);
- Certaines enzymes changent d'activité : phosphatase-alcaline (PA), glutamino-pyrivique-transaminase (G.P.T.) (NESKOVIC *et al.*, 1992).

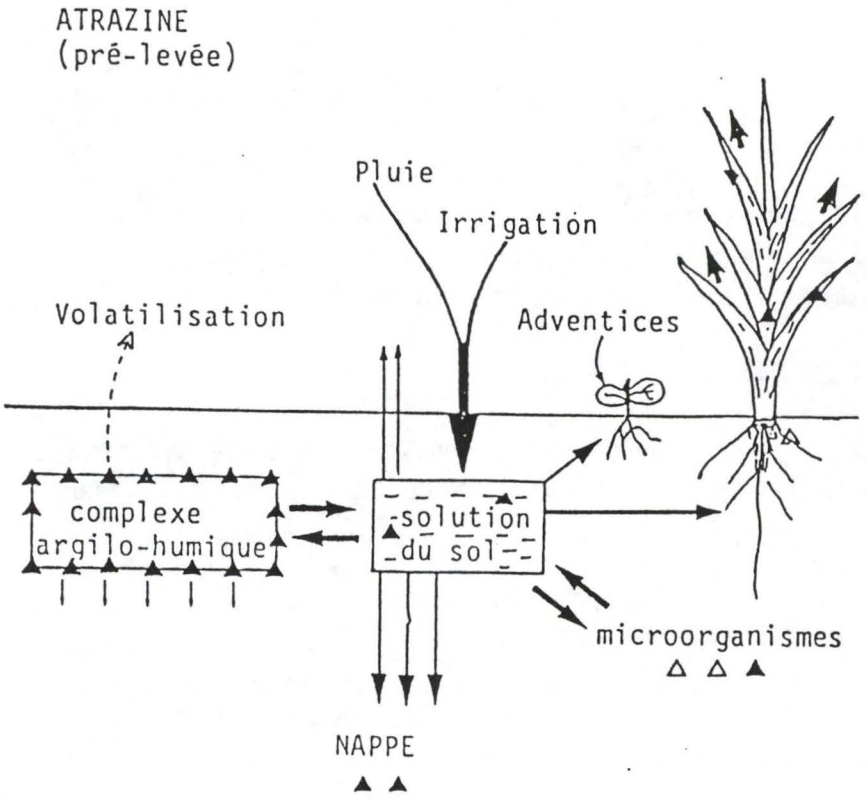


Figure 1.2 : Schéma montrant les différents compartiments capables d'intervenir sur la répartition et la disparition de l'atrazine dans une culture de maïs.

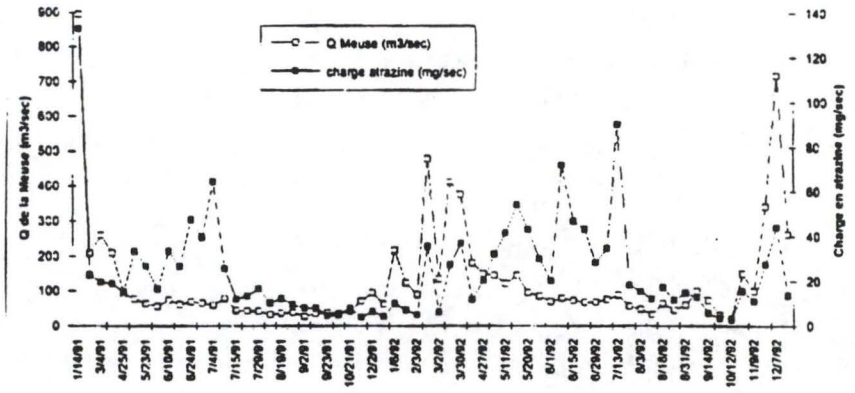


Figure 1.3 : Charge en atrazine en fonction du débit de la Meuse à Tailfer (1991-1992).

- Des lésions hépatiques sévères sont observées par RISBOURG (1992) (Figure 1.4).

Après exposition de carpes à différentes concentrations d'atrazine (Tableau 1.3), l'examen de l'activité enzymatique au niveau du sérum et de certains organes montre une variation significative de celle-ci (NESKOVIC *et al.*, 1993).

2. PRINCIPAUX EFFETS DES POLLUANTS SUR LA REPRODUCTION DES TELEOSTEENS AVEC UNE ATTENTION PARTICULIERE SUR L'ACTION DES HERBICIDES

Des nombreux facteurs environnementaux sont extrêmement nocifs sur le déroulement de la gamétogenèse et la reproduction des poissons (Figure 1.5) (BRUSLE et BRUSLE, 1992). Nous nous limiterons ici à rapporter les observations recueillies sur l'effet des pesticides sur le cycle reproducteur des poissons, est particulièrement l'atrazine étant donné que ce produit fut placé au centre de nos préoccupations tout au long de cette étude.

Les pesticides altérants ou inhibants les différentes phases du cycle reproducteur sont nombreux et variés : organochlorés, organophosphorés, biphényles polychlorés, etc.... (Annexe 1). Ils présentent généralement une forte concentration au niveau des ovaires. Leurs effets néfastes se marquent soit directement en inhibant complètement le cycle reproducteur, soit en agissant sur les stades ultérieurs comme l'embryogénèse, l'éclosion et l'élevage larvaire.

2. 1. EFFETS DES POLLUANTS SUR L'OVAIRE

Chez les téléostéens, le développement ovocytaire peut se subdiviser d'une façon schématique en cinq stades (Figure 1.6) :

1) La phase protoplasmique, durant laquelle on assiste à une multiplication des ovogonies et à la croissance d'ovocytes primaires dépourvus de vacuoles cytoplasmiques.
2) La vitellogenèse, incluant la majeure partie de la croissance ovarienne parmi laquelle on distingue :
   - prévitellogenèse endogène pendant laquelle la taille cellulaire augmente suite à l'accumulation entripète dans le cytoplasme de vésicule à résidus glycoprotéiques.
   - La vitellogenèse proprement dite ou la vitellogenèse exogène caractérisée par l'incorporation centrifuge de vitellogénine synthétisée par le foie.
3) La maturation ovocytaire, durant laquelle la vésicule germinative migre du centre vers la périphérie de l'ovocyte. Après cette migration, la vésicule germinative se disperse (germinal vésical break-down), sous la stimulation des gonadotropines (GtH) pituitaires et des progestagènes.
4) L'ovulation.
5) La période de repos sexuel (post-ovulation).

Des indices d'évaluation de la toxicité de polluants sont souvent réalisés, en relation avec la reproduction (JIMENES et STEGEMAN, 1990; in DONALDSON, 1990) prennent en considération, pour mesurer l'effet du stress induit par les polluants sur la reproduction, une corrélation entre : l'activité de monoxygénase (ou mixed-function oxidase) (enzymes de

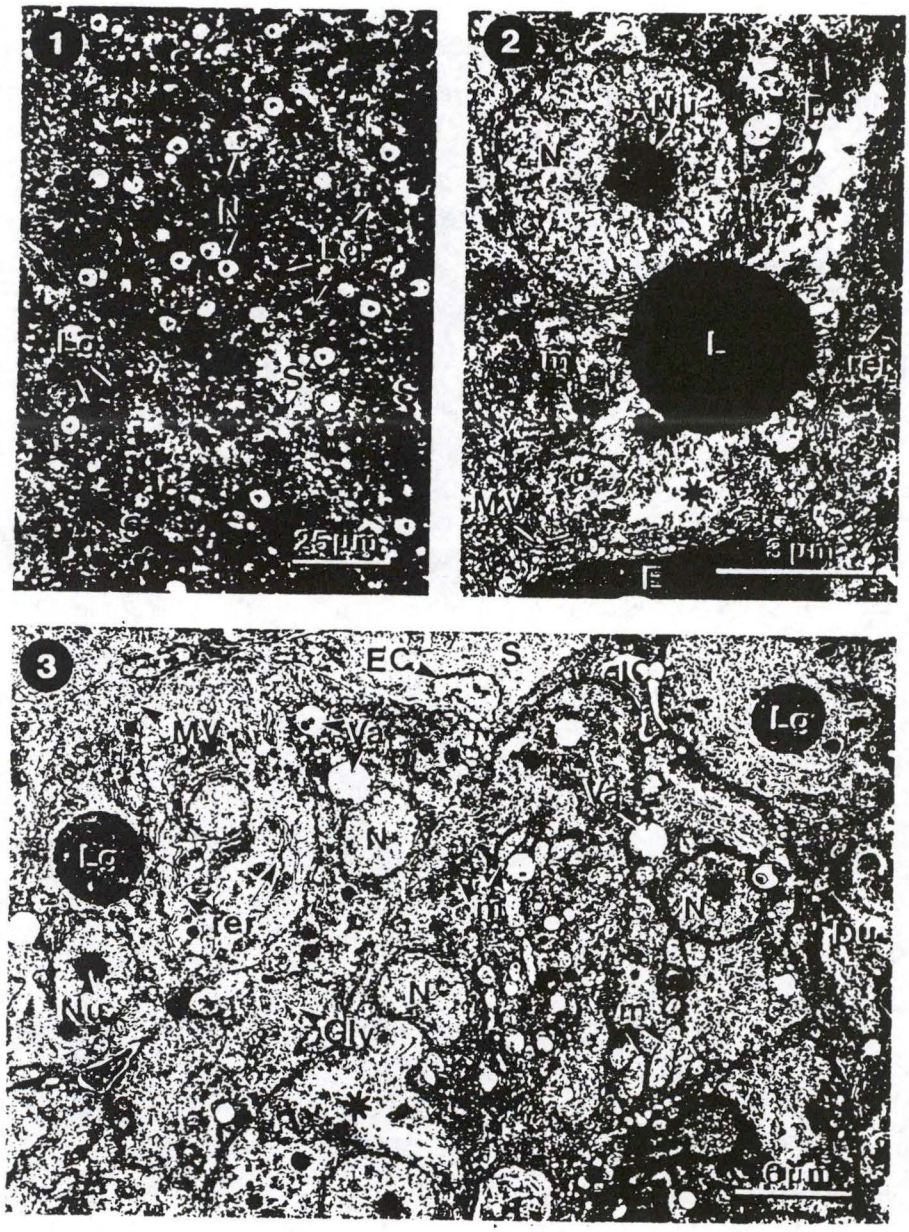


Figure 1.4 : Structure histologique du foie de lizaramada aprés 3 jours de contamination par l'atrazine. Perturbations ultrastructurales des hepatocytes, déplétion glycogénique, atrophie dictyosomes et des volumineux globules lipidiques, particulièrement des grands granules lipofuchsines présentent une même structure mince que chez le controle. Du = canalucule biliare; E = erythrocytes; EC = cellules endotheliales; Gly = glycogéne; IC = cellules de Ito; Lg = lipofuchsimes; m = mitochondries; Mv = microvilosités; N = noyeau; Nu = nucléole; rer = réticulum endoplasmique granulaire; S = sinusoïde; Va = vacuole .

détoxification), les concentrations plasmatiques d'androgènes, oestrogènes et vitellogénine ainsi que les stades de maturité des gonades.

2. 1. 1. Effets sur la morphologie de l'ovaire

Généralement l'exposition à long-terme des téléostéens aux pesticides (Tableau 1.4) induit une décroissance du rapport gonadosomatique (RGS), une abondance d'ovocytes moins développés et de follicules atrétiques (SUKUMAR et KARPAGAGANAPATHY, 1992).

MURUGESAN et HANIFFA (1992) observent, chez le *Mystus vitatus*, après la contamination par le malathion, une diminution du contenu protéique, des acides nucléiques ainsi que de l'activité de la phosphatase alcaline. Les pesticides organophosphorés provoquent une décroissance du contenu hépatique et ovarien en acide ascorbique (RAM et SATHYANISAN, 1986, 1987).

BRUSLE et BRUSLE (1992) observent chez deux espèces de muges (*Liza aurata* et *Chelon labrosus*), après deux à quatre mois de la contamination par deux herbicides : carbétamide (max. 3,5 g/l) et propyzamide (max. 15 g/l) au niveau des ultrastructurales cellulaires sexuelles :

- des lésions relativement bénignes (altérations membranaires et réduction du nombre des crêtes mitochondriales) des cellules germinales primordiales (C.G.P.).
- des altérations plus prononcées des gonies (spermatogonies et ovogonies) consistant en des lésions membranaires touchant les mitochondries (fortement vacuolisées), le reticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire ainsi qu'en un appauvrissement en ribosomes.
- des perturbations réduites des ovocytes prévitellogénétiques sous forme d'une réduction des crêtes mitochondriales, d'une vésiculisation des citernes du réticulum et de l'apparition de vésicules lytiques.

On peut conclure que les lésions observées sont variables selon les catégories de cellules germinales et ne sont pas spécifiques. La sensibilité des cellules sexuelles est fonction de leur degré de différenciation cellulaire : cellules germinales primordiales et cellules indifférenciées sont considérées comme les cellules souches et les cellules de réserves de la gonade apparaissent les plus résistantes (BRUSLE, 1982). Au contraire, les cellules en début de la différenciation spermatogoniale ou ovogoniale et en cours de maturation méiotique (spermatocytes et ovocytes) sont plus vulnérables. Les ovocytes prévitellogéniques sont, par ailleurs, moins sensibles que les ovocytes méiotiques. Quant aux cellules somatiques, elles apparaissent moins affectées que les cellules sexuelles par les herbicides.

Le dommage morphologique causé par les polluants n'est pas nécessairement permanent. En effet SHUKLA et PANDEY (1985) ont montré que le dommage morphologique et l'inhibition des enzymes stéroïdogéniques causés par l'exposition de tilapia à 0,001 mg/l de DDT pendant 20 jours sont réversibles 30 jours après leur retour en eau non contaminée.

2. 1. 2. Effet sur la synthèse de vitellogénine

Le foie joue un rôle très important dans la recrudescence de l'ovaire, en produisant les protéines vitellines sous la stimulation d'œstradiol ovarien (Figure 1.7). La vitellogénine est une grosse molécule dérivée des lipides hépatiques et par conséquent, l'effet des polluants sur

Treatment and organs	Concentration (mg/l)	Alkaline phosphatase[a]		GOT[a]		GPT[a]	
		U/l	% Control	mU	% Control	mU	% Control
Control	0.0						
Serum		26.0 ± 1.5	100.0	14.5 ± 0.7	100.0	26.4 ± 1.7	100.0
Heart		69.8 ± 6.3	100.0	29.5 ± 2.1	100.0	36.7 ± 2.3	100.0
Liver		397.9 ± 19.0	100.0	25.1 ± 1.9	100.0	75.7 ± 9.3	100.0
Kidneys		1055.6 ± 55.1	100.0	26.5 ± 1.5	100.0	38.2 ± 3.5	100.0
Atrazine	1.5						
Serum		52.0 ± 3.1	200.0**	15.6 ± 0.9	107.6	25.1 ± 1.2	95.1
Heart		48.2 ± 3.0	69.1**	29.1 ± 2.3	98.6	28.9 ± 2.0	94.1
Liver		103.9 ± 17.3	26.1**	26.6 ± 1.7	106.0	86.5 ± 9.7	114.3*
Kidneys		617.1 ± 29.2	58.4**	27.1 ± 2.0	102.3	45.6 ± 6.1	119.4*
Atrazine	3.0						
Serum		51.9 ± 2.9	199.6**	16.0 ± 0.7	110.3	27.8 ± 2.3	105.3
Heart		39.0 ± 2.0	55.9**	28.9 ± 1.9	98.0	28.7 ± 2.0	93.5
Liver		178.0 ± 20.3	44.9**	25.3 ± 0.9	100.8	83.1 ± 8.9	109.8
Kidneys		430.4 ± 27.7	40.8**	26.6 ± 1.3	100.4	39.7 ± 3.5	103.9
Atrazine	6.0						
Serum		45.5 ± 3.0	175.0**	15.5 ± 0.9	106.9	26.4 ± 2.0	100.0
Heart		43.8 ± 3.1	62.7**	29.3 ± 1.5	99.3	29.4 ± 2.1	95.8
Liver		199.8 ± 21.0	50.2**	23.4 ± 1.3	93.2	76.6 ± 8.5	101.2
Kidneys		625.2 ± 32.2	59.2**	26.1 ± 1.3	98.5	42.2 ± 4.1	110.5

Tableau 1.3 : Comparaison d'activité enzymatique, au niveau du sérum, du foie, des reins et du coeur entre la carpe témoin et la carpe contaminée par différentes concentrations de l'atrazine.

* = différence significative.

** = différence hautement significative.

AP = Alkaline phosphatase.

GOT = Glutamic-oxaloacetic.

GPT = Glutamic-pyruvic transaminase.

la synthèse des lipides hépatiques affecte le développement ovarien et le niveau de cholestérol qui est le précurseur de toutes les hormones stéroïdes. En général, les polluants ont un effet inhibiteur (Tableau 1.5) sur le taux de lipides hépatiques et ovariens, mais les effets des polluants sont particulièrement marqués durant la phase de maturation.

L'exposition de *Clarias batrachus* au malathion a provoqué une décroissance des acides gras libres hépatiques pendant la prévitellogenèse et la phase de régression, mais une augmentation de ceux-ci pendant la vitellogenèse et la postvitellogenèse en comparaison avec le témoin (LAL et SINGH, 1987). Des résultats similaires ont été trouvés durant la recrudescence gonadale chez *Heteropneustes fossilis* après une exposition au malathion (SINGH, 1992).

La mobilisation lipidique est maximale lors de la vitellogenèse, donc c'est fort probable que le polluant à cette période exerce son effet maximal. D'après LAL et SINGH (1987); SINGH (1992), le changement des contenus hépatique, plasmatique et ovarien en lipides résulte de l'inhibition de la mobilisation des lipides hépatiques dans le plasma et de l'incorporation dans les ovocytes.

Selon LAL et SINGH (1987), SINGH (1992) et SINGH et KIM, 1994, l'équilibre des différents composés lipidiques, tels que acides gras libres, mono, di et triglycérides, cholestérol estérifié et libre, et des phospholipides (phosphatidyle choline, phosphatidyle serine, phosphatidyle inositol et phosphatidyl ethanolamine), peut être affecté par le malathion (LAL et SINGH, 1987; SINGH, 1992; SINGH et KIM, 1994).

Les pesticides et beaucoup d'hydrocarbures sont liposolubles et peuvent se concentrer dans des tissus riches en lipides comme l'ovaire et le foie (KIME, 1995). Donc l'axe hepato-ovarien peut être particulièrement sensible à certains polluants pendant la croissance ovarienne. Ainsi BIAGIANTI et RISBOURG (1992), en exposant des muges à des doses sub-aiguës (0,025 et 0,170 mg/l pendant 5 à 9 jours) d'atrazine observent des modifications structurales hépatocytaires importants.

L'intoxication des muges par 0,025 mg/l d'atrazine induit :

- une nette augmentation du nombre d'inclusions lipidiques dans la région périsinusoïdale. Il est maintenant bien établi que les lipides hépatocytaires constituent le site principal de "stockage" des substances toxiques
- une hyperdéveloppement du réticulum endoplasmique dont les vésicules occupent la quasi-totalité du volume cytoplasmique. Or, les systèmes de détoxication (monooxygénases cyt.P450 dépendantes) sont localisées dans les membranes du réticulum. L'induction de ces systèmes enzymatiques par certaines substances xénobiotiques s'accompagne généralement d'une prolifération des citernes du réticulum (SCHOOR et COUCH, 1979; FABACHER, 1982; MAEMUR et OMURA, 1983). Celle-ci constitue donc également un mécanisme hépatocytaire bioprotecteur.
- une déplétion glycogénique, généralement associée à une élévation du taux de glucose sanguin (GLUTH et HANKE, 1984). L'intoxication des poissons par diverses molécules toxiques (pesticides, PCB, hydrocarbures,...) provoque classiquement une réduction des réserves glycogéniques hépatiques (HINTON *et al.,* 1978; SOLONGI et OVERSTRE et, 1982; ROJIK *et al.,* 1983) associée à une hyperglycémie qui constituent toutes deux une réponse non spécifique à la demande énergétique accrue induite par le stress.

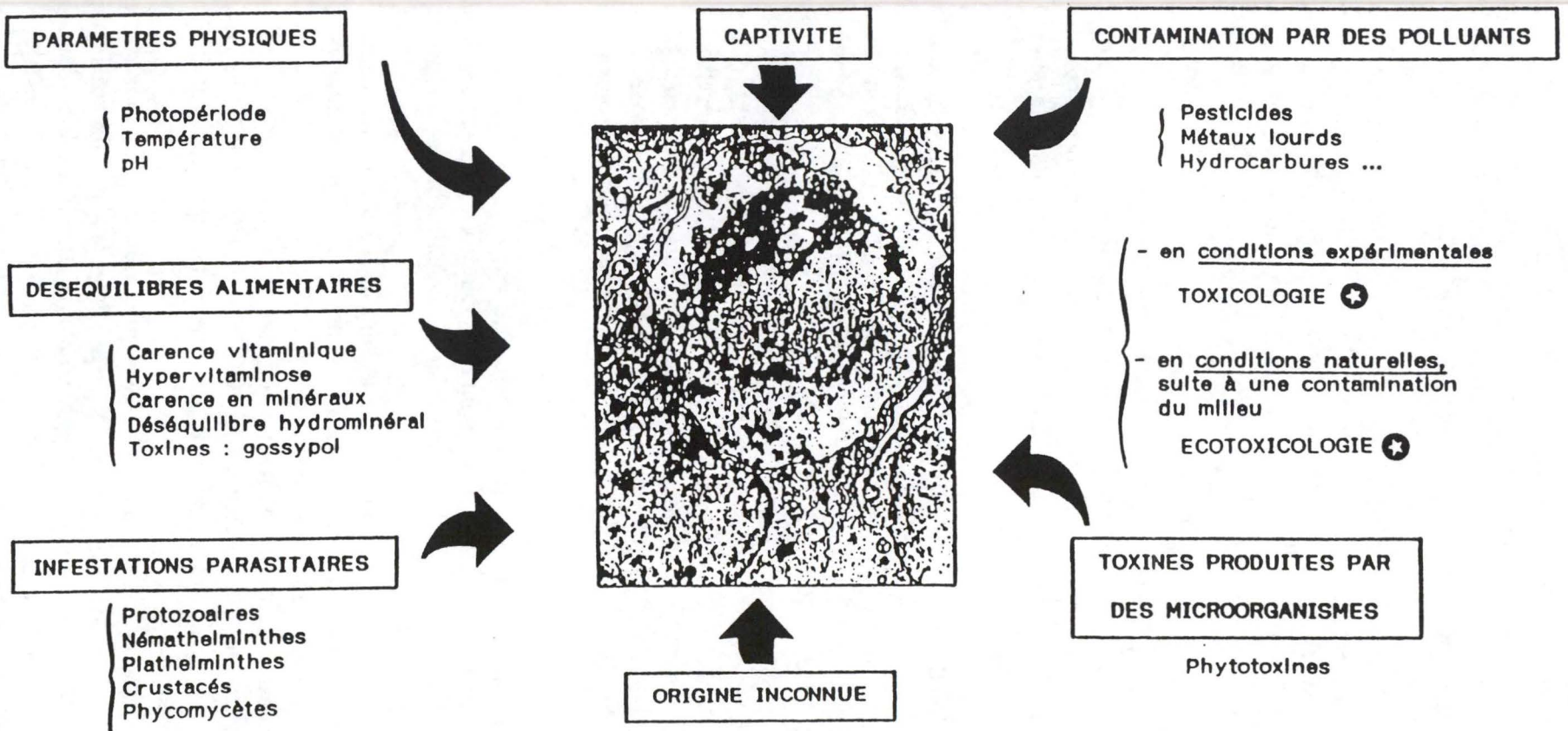


Figure 1.5 : Facteurs environnementaux responsables de la pathologie des gonades.

- une augmentation de la surface sinusoïdale et donc des échanges sang-hépatocytes. Ce mécanisme bioproducteur est corrélé à l'accroissement de l'activité métabolique hépatocytaire et probablement associé a une augmentation des processus d'épuration sanguine. L'ensemble de ces mécanismes de bioprotection appartient à la phase de résistance au stress, aucune mortalité significative des poissons en expérience n'étant observée.

L'intoxication des muges par 0,17 mg/l d'atrazine induit :
Dés le 5ème jour, alors que les mécanismes adaptatifs décrits précédemment sont également relevés chez 40% des poissons, ils ne le sont plus chez 60% d'entre eux. Ceux-ci, en effet présentent de très sévères lésions hépatocytaires. La disparition des microvillosités périsinusoïdales hépatocytaires révèle un arrêt de fonctionnement du pôle sanguin et donc des échanges sang-hépatocytes. Ceux-ci présentent de plus une importante dégénérescence de l'ensemble de leurs mitochondries qui évoluent en corps résiduels à lipofuchsines. L'accumulation de ces lipopigments résulte du catabolisme péroxydasique des lipides membraneux insaturés, particulièrement abondants chez les poissons (COWEY et SARGENT, 1977; LEGER et FREMONT, 1981). Les mécanismes de la peroxydation sont particulièrement complexes et aboutissent à la formation de complexes lipidiques peroxydés très faiblement métabolisables et toxiques pour la cellule (DONATO, 1981; BOUR, 1988). Le très grand accroissement du nombre de corps résiduels à lipofuchsines au cours de l'intoxication montre que l'atrazine est fortement inducteur de ces mécanismes de peroxydation Cette induction est cependant non spécifique puisqu'une élévation de la peroxydation a été révélée après l'intoxication par divers polluants tels que l'endosulfan (AGARWAL, 1978). Ces perturbations hépatocytaires sont irréversibles dès le 5éme jour d'intoxication.

2. 1. 3. Effets sur la vitellogenèse

Puisque l'incorporation de vitellogénine dans l'ovocyte contribue à une grande partie de la croissance ovocytaire durant la recrudescence ovarienne, la baisse de RGS peut être due à l'inhibition de la vitellogenèse. La mesure directe est obtenue à partir des contenus plasmatique, hépatique et ovarien en vitellogénine (Tableau 1.6).

RYBU *et al.* (1986; in Donaldson, 1990) exposent des truites *O. mykiss*, en début de vitellogenèse, à une concentration plasmatique de 0,01 mg/l de cyanide, pendant 12 jours. Il en résulte une diminution drastique de la concentration plasmatique de vitellogénine et du rapport gonadosomatique. Ansi l'exposition du *Monopterus albus* au malathion a provoqué le même effet (SINGH, 1989). Selon les auteurs, cette réponse serait dûe à une réduction de la disponibilité en oestrogène ou, même, de l'inhibition de leur action sur les hépatocytes. Par ailleurs, WESTER *et al.* (1985); WESTER, (1991) ont montré que le γ-BHC, un pesticide commun, est oestrogénique puisqu'il stimule la synthèse de vitellogénine et l'hermaphrodisme chez des guppies juvéniles.

2. 1. 4. Effets sur la maturation ovocytaire, l'ovulation et la ponte

La phase finale de la maturation de l'ovocyte est nécessaire pour le succès de l'ovulation. Cette phase de développement est stimulée par les gonadotropines (GTH) qui induisent à la fois la migration de la vésicule germinative vers la périphérie de l'ovocyte et la synthèse folliculaire d'un stéroïde maturationnel, à savoir la 17α-hydroxy-20β-dihydroprogestérone. Les stéroïdes induisent la maturation en stimulant la dispersion de la

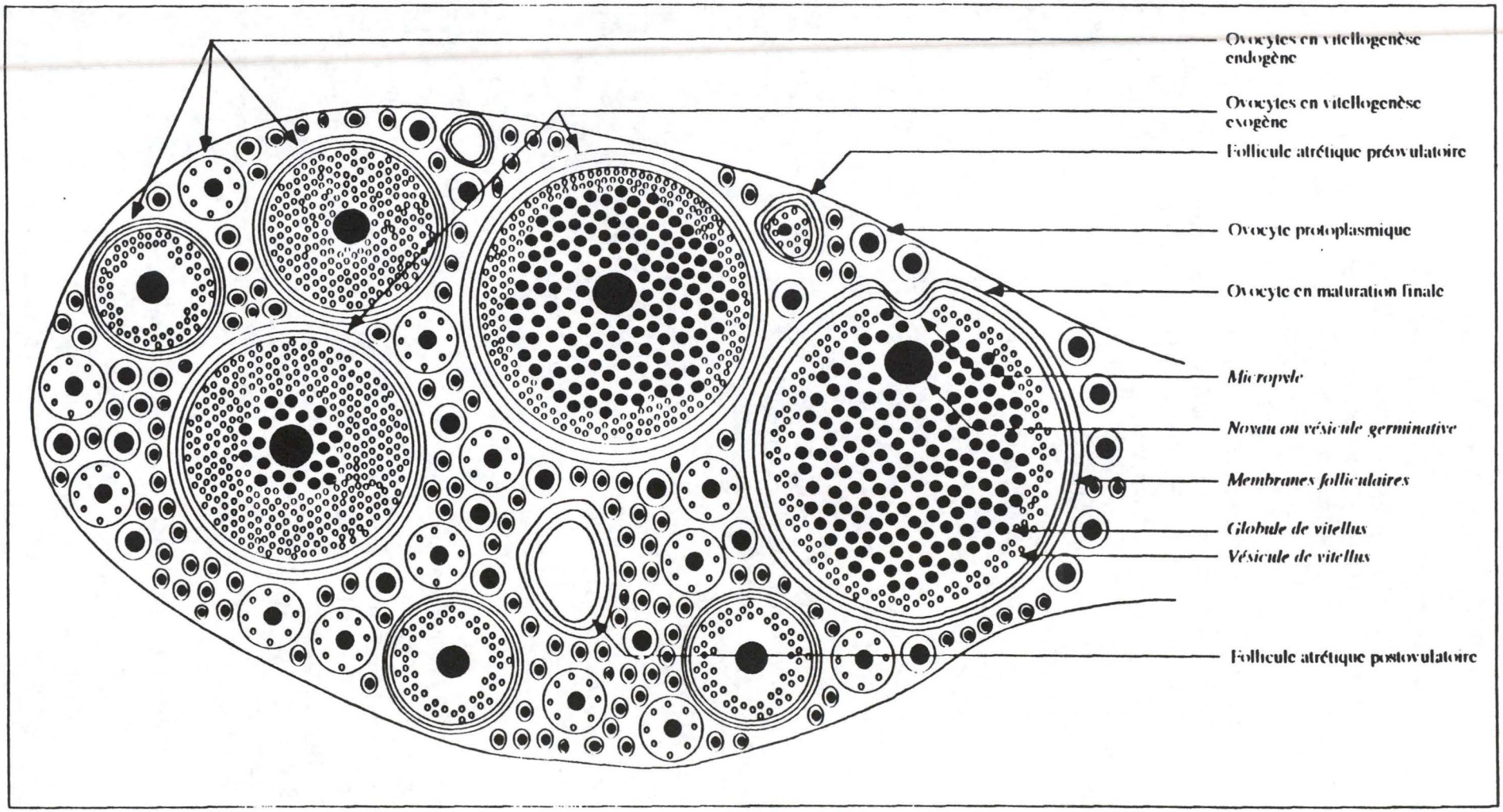


Figure 1.6 : Représentation schématique des différents stades dans un ovaire de poisson téléostéen (Rinchard, 1994).

vésicule germinative (germinal vesical breakdown - GVBD) qui est toujours suivie par l'ovulation (Figure 1.8). Contrairement à une longue période durant laquelle se déroule la vitellogenèse, la maturation ovocytaire est plus courte, moins de 24 heures chez les cyprinidés et à peu près 7 jours chez les salmonidés, et potentiellement très sensible à la pollution surtout dans les rivières et les étangs où il y a une forte possibilité de contamination par les pesticides.

En comparaison avec la vitellogenèse, il y a relativement peu de recherches concernant l'effet des polluants sur la maturation ovocytaire (Tableau 1.7). L'induction *in vitro* de la GVBD par l'hormone lutéinisante (LH) est inhibée à la fois par les insecticides organophosphorés (p. ex. : la contamination de *Mystus vitatus* au phosdrin, au malathion, au birline, au gardona et organochlorés (endosulfane) (HAIDER *et al.*, 1986; HAIDER *et al.*, 1988), mais il est difficile de déterminer si cet effet est dû à l'inhibition de la LH qui stimule la migration de la vésicule germinative ou à l'inhibition de la synthèse des stéroïdes maturationels.

La contamination de *Lepomis marochirus* par le 2,4D peut provoquer un retard très important dans le développement ovocytaire et un effet direct sur le processus physiologique de la maturation et de l'ovulation (CURST et BEYER, 1978; COPE *et al.*, 1970; HOSE *et al.*, 1989; TAM et PAYSON, 1986). De nombreux pesticides peuvent induire l'avortement chez les espèces vivipares (p. ex. l'avortement chez *Poecilia reticulata* après contamination au fenitrithion).

2. 1. 5. Effets sur le nombre et la viabilité des œufs

Le nombre d'œufs pondus et leur viabilité sont utilisés comme indicateurs des effets des polluants à long-terme sur la reproduction. Ils requièrent des techniques simples, mais ne donnent aucune information sur le mécanisme d'action des polluants. Toutes ces études montrent que le polluant a un effet nocif sur le nombre d'œufs produits (Tableau 1.8), ce qui est probablement dû à une diminution de la vitellogénine disponible pour la production de vitellus. Le nombre d'œufs éclos et la survie des larves produites par les parents exposés peuvent refléter à la fois le changement provoqué par les polluants dans la structure des œufs en diminuant le taux de fertilisation et un effet tératologique conduisant à une malformation des embryons.

La fertilité est déterminée par le nombre d'œufs éclos, qui diminue chez *Salvelinus alpinus* dans le lac Genevacharr à cause du DDT (MONOD, 1985; CROSS et HOSE 1988; HOSE *et al.*, 1989). Un effet similaire a été observé chez les salmonidés aprés exposition au DDT (BURDICK *et al.*, 1972) et chez la morue par le dieldrin (VON WESTERNHAGEN *et al.*, 1987). A la fois la fécondité et la fertilité sont diminuées par le DDT. Ainsi l'exposition du *Cyprinidon variegatus* à une concentration variable de keptone a provoqué une diminution de la fécondité et de la fertilité (GOODMAN *et al.*, 1982).

Puisque la détermination du sexe chez les poissons a lieu pendant la phase d'embryogenèse, probablement par la sécrétion des stéroïdes à partir des gonades d'embryon, il est possible que l'exposition au polluant à ce stade puisse inhiber le mécanisme de détermination du sexe et provoquer un changement du rapport des sexes. Une activité œstrogénique élevée est provoquée par de nombreux pesticides (THOMAS *et al.*, 1985; WESTER *et al.*, 1985; WESTER, 1991).

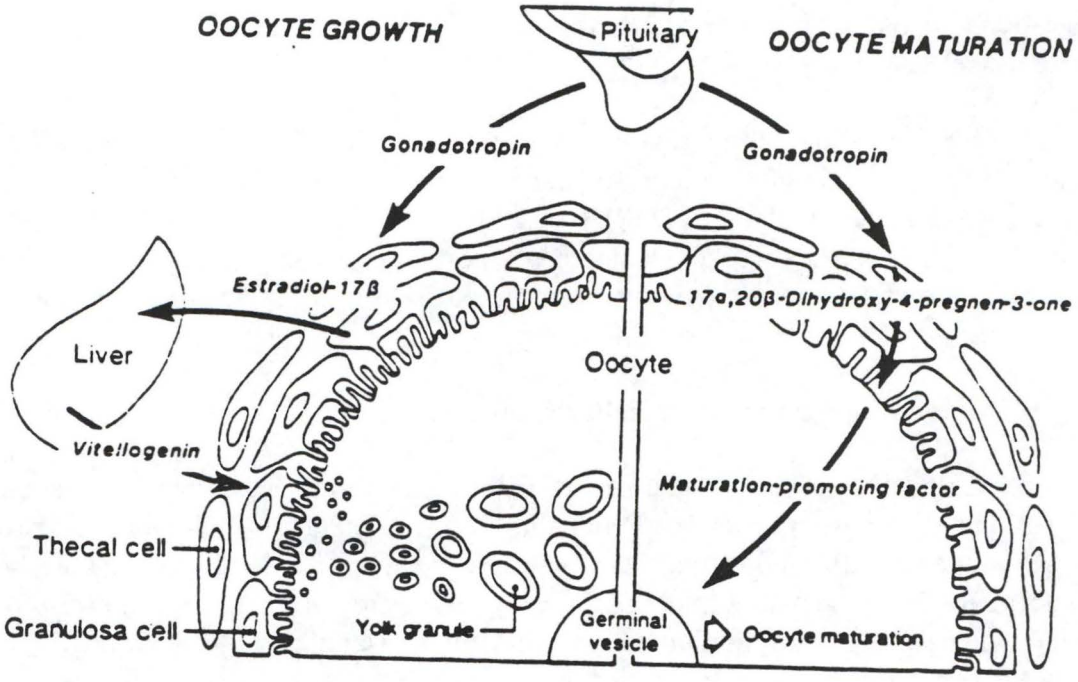


Figure 1.7 : Régulation hormonale au cours de la vitellogenèse et de la maturation finale, chez des salmonidés (Yoshikuni et Nagahama, 1991).

2. 2. EFFETS SUR LA MORPHOLOGIE DES TESTICULES ET LA SPERMATOGENESE

Comme chez la femelle, on mesure souvent le RGS pour déterminer l'effet des polluants chez les poissons mâles, bien que chez le mâle celui-ci soit plus faible que chez la femelle.

Chez le mâle, les phases de maturation sont moins bien définies et les relations hormonales sont moins claires que chez la femelle mais les études histologiques et les phases de spermatogenèse peuvent fournir des informations utiles (KIME, 1995). Ainsi le RGS, diminue chez *Channa striatus* à la suite d'une exposition au carbofuran (RAM et SATHYANESAN, 1986; SAXENA et MANI 1985, 1987). Un effet similaire a été observé chez *Rabora daniconius* après sa contamination par le même produit (RASTIGI et SHERSTHA, 1990) et chez *Channa striatus* (ARORA et KULSHRESTHA, 1984) (Tableau 1.9).

L'exposition des poissons aux pesticides (carbamide, urea, endosulfane, malathion, parathion, arochlor 1254, fenitrithion, carbofurane et TEPA) provoque une inhibition de la spermatogenèse, une dimunition des spermatogonies, des spermatocytes et un peu des spermatides et des spermatozoïdes, une faible activité, une atrophie et une nécrose des cellules interstitielles et des échanges structuraux dans les cellules de Sertoli (STOCK et COPE, 1969; BILLARD et KINKELN, 1970; SANGALANG *et al.*, 1981; PANDEY et SHUKLA, 1982; ARORA et KULSHRESTHA, 1984; SHUKLA et PANDEY, 1984; SAXENA et MANI, 1985, 1987). Il y a une absorption significative de malathion, carbofurane et arochlor 1254 dans les testicules après exposition (SANGALANG *et al.*, 1981; SADHU et MUKHOPADHYAY, 1985).

2. 3. EFFETS SUR LES NIVEAUX HORMONAUX

Le cycle de la reproduction saisonnière chez les téléostéens est souvent réglé par la photopériode et la température par l'intermédiaire des hormones de l'hypothalamus (gonadotropin releasing hormone; GnRH) et pituitaires (gonadotropines; GtH) en stimulant dans les gonades la synthèse des hormones stéroïdes. Beaucoup des effets discutés ci-dessus peuvent être attribués aux effets perturbant des polluants sur le système endocrinien, par conséquent perturbant le développement des gonades et des gamètes.

2. 3. 1. Effets sur les hormones hypothalamiques et pituitaires

Deux approches sont utilisées dans l'examen des effets des polluants sur le système hypothalamo-pituitaire : l'histologie et l'endocrinologie (Tableau 1.10). On a constaté après exposition de *Channa punctatus* au cythion que les cellules gonadotropes pituitaires sont petites, inactives et peu nombreuses; en fait similaires au poisson en repos. Par contre, les cellules des poissons témoins sont actives et ont une sécrétion intense (RAM et SATHYANESAN, 1983, 1986, 1987).

La contamination de tilapia par le DDT et le malathion a provoqué des déformations cellulaires, des vacuolisations du cytoplasme et de sérieux dommages des cellules acidophiles et des cyanophiles dans la *pars distalis* proximale avec une baisse des sécrétions neuronales

Tableau 1.4 : Effets des pesticides sur la morphologie des ovaires.

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Référence
Malathion	*Mystus vittatus*	2,5	84	Diminution du RGS et inhibition de l'induction de G.V.B.D.	HAIDER & UPADHYAYA (1985)
Carbétamide et Propyzamide	*Liza aurata* (Risso) *Chelon labrosus* (Risso)	10 à 400 et 2 à 8,8	18 à 96	Divers lésions gonadiques et hépatiques.	BRUSLE & BRUSLE (1992)

Tableau 1.5 : Effets des pesticides sur la synthèse de la vitellogénine.

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Référence
Malathion	*Clarias batrachus*	0,008	28	Diminution des acides gras libres hépatiques.	LAL & SINGH (1987)
Atrazine	*Liza aurata* (Risso) *Liza ramada* (Risso)	0,0025 et 0,17	5 à 7	Modifications structurales hépatocytaires.	BIAGIANTI & RISBOURG (1992)

Tableau 1.6 : Effets des pesticides sur la vitellogenèse.

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Référence
Cyanide	*Oncorhynvchus mykiss* (Richardson)	0,01 - 0,03	7	Variation de la concentration plasmatique, gonadale et hépatique.	DA COSTA & RUBY (1984)
Malathion	*Monopterus albus*	9	7	Baisse du contenu plasmatique en vitellogénine.	SING (1989)

(SHUKLA et PANDEY, 1984). Le traitement des espèces par l'endosulfan provoque une dégénérescence au niveau des acidophiles et des basophiles pituitaires, une vacuolisation des cellules gonadotropes et thyréotropes, et une déformation des noyaux hypothalamiques, à savoir le noyau préoptique et le noyau latéral du tuber (SHUKLA et PANDEY, 1986). Chez *Heteropneustes fossilis,* une décroissance de GnRH hypothalamique (SINGH et SINGH, 1982) a été constatée après l'exposition aux paramar 50, cythion, l'aldrin et l'hexadrin. Une décroissance, du taux plasmatique et pituitaire en GtH a été observée chez *Channa punctatus* (GHOSH *et al.*, 1990) après exposition aux metacide 50 et carbaryle. Le même effet a été observé chez le poisson rouge *Carassius auratus*, après une exposition au γ-BCH (SINGH *et al.*, 1994). On a évalué le taux plasmatique et pituitaire en GtH par la mesure d'activité d'extrait pituitaire sur l'absorption gonadale de P^{32} et on a y constaté chez *Heteropneustes fossilis* une inhibition par une exposition au cytion à l'aldrin, à l'hexadrin et au parathion (SINGH, 1982).

En plus, les gonades des poissons contaminés réagissent à l'hormone lutéinisant (LH) et à l'extrait pituitaire, ce qui suggère que ces pesticides n'ont pas d'effet sur les récepteurs gonadaux des GtH (SINGH et SINGH, 1980, 1981, 1982). Le taux hypothalamique en GnRH peut être ainsi affecté par ces polluants (SINGH, 1982; GHOSH *et al.*, 1990) et ceux-ci peuvent être responsables de certains effets observés sur la sécrétion de GtH.

2. 3. 2. Effets sur les stéroïdes ovariens

D'après les études histologiques, on a constaté qu'il y a une inhibition de la 3β-HSD chez *Mystus vittatus* (HAIDER et UPADHYAYA, 1985) après son exposition aux birlane, gardona, phosdrin et malathion (Tableau 1.11). Un effet similaire a été observé chez la carpe *Cyprinus carpio* après exposition au fenitrothion (KAPER *et al.*, 1978). On a démontré une diminution d'œstrogènes plasmatiques chez le *Monopterus albus, Clarias batrachus et Heteropneustes fossilis* par ses expositions aux malathion et γ-BHC (SINGH et SINGH, 1991, SINGH *et al.*, 1993). Ainsi, la durée d'exposition à long et à court terme peut avoir des effets différents. Ainsi, la contamination de la perche indienne d'eau douce, *Anabas testidinens,* par le carbaryl ou par le metacid 50 a provoqué au début un accroissement rapide d'œstradiol plasmatique et ovarien par rapport au témoin mais après 15 jours, il y a une chute spectaculaire au niveau hormonal avec une décroissance de RGS qui reflète probablement la décroissance de la synthèse vitellogénique (CHOUDHURY *et al.*, 1993). En plus, cet effet peut être très différent en fonction des phases de recrudescence de l'ovaire. En effet, *in vitro,* l'arochlor 1254 provoque une décroissance d'œstradiol plasmatique après 17 jours d'exposition mais, après 30 jours, il n'a pas d'effet sur le taux d'œstrogènes plasmatiques (THOMAS, 1988, 1989).

Il est possible qu'un tel effet contradictoire puisse être attribuable aux différentes périodes pendant lesquelles les gonades sont exposées ou à la phase pendant laquelle le poisson est sacrifié. De tels effets différentiels au cours de la recrudescence ovarienne ont été provoqués par le γ-BHC chez *Clarias batrachus* (SINGH et SINGH, 1987). Une baisse de contenu ovarien en œstradiol et une inhibition de la conversion du cholestérol ester en cholestérol libre ont été observées chez *Heteropneustes fossilis* par exposition au γ-BHC (SINGH, 1991; SINGH *et al.*, 1993).

On a constaté une baisse des androgènes plasmatiques en période de vitellogenèse chez *Clarias batrachus* par exposition aux cythion et γ-BHC et chez *Heteropneustes fossilis* par exposition au malathion et γ-BHC (SINGH, 1991; SINGH *et al.*, 1993).

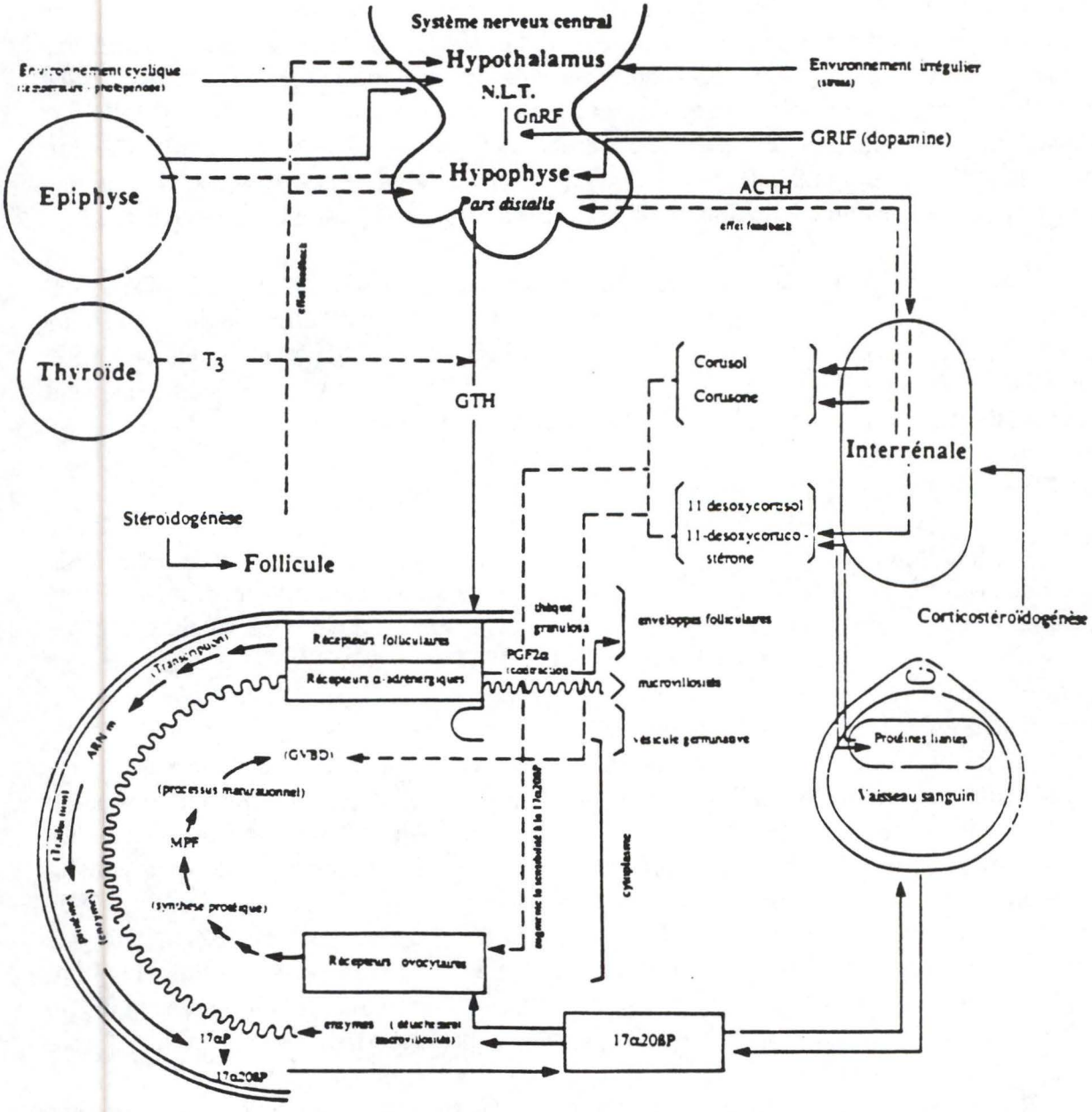


Figure 1.8 : Schéma général décrivant le contrôle endocrinien de la maturation finale et de l'ovulation chez les poissons téléostéens.
NTL = noyau latéral du Tuber

—— voie certaine
..... voie hypothétique

\+ action stimulante
\- action inhibitrice

(modifié d'après Jalabert, 1976 ; in Kestemont, 1988).

Les concentrations plasmatiques en stéroïdes sont utilisées comme indices des effets polluants sur les stéroïdes circulants, mais ne donnent pas d'information précise sur leurs sites d'action. Une décroissance des stéroïdes plasmatiques pourrait être le résultat d'une inhibition de GnRH hypothalamique ou de GtH pituitaire, d'une décroissance du cholésterol ovarien, d'une décroissance d'activité de n'importe quel enzyme dans la séquence biosynthétique à partir du cholestérol jusqu'à l'hormone, ou de l'élévation de la vitesse du catabolisme hépatique ou de l'excrétion. Il n'est n'est pas clair si ces dommages sont la cause ou l'effet d'altération synthétique des stéroïdes. A cet égard, l'incubation *in vitro* du tissu qui utilise les précurseurs endogènes ou exogènes pourrait apporter des informations intéressantes.

Chez les poissons rouges, la production endogène *in vitro* de la 17,20β-P est très faible chez tous les poissons, mais à la fois la testostérone et le 11-déoxycortisol, qui est, *in vitro*, le métabolite majeur de la 17-hydroxyprogesterone, sont supérieurs dans les incubations d'ovaires de poissons non exposés au pesticide mais où le pesticide n'a été ajouté que chez les incubations témoins (KIME *et al.*, 1992). Par contre, le métabolisme ovarien de 3H-17-hydroxyprogesterone est virtuellement affecté par le pesticide, ce qui suggère qu'il exerce son action sur les phases antérieures de la synthèse de la 17-hydroxyprogesterone. Par contre l'exposition à long-terme de poisson au pesticide décroît la production endogène de 11-deoxycortisol, peut-être en augmentant sa conjugaison, bien que la production à la fois de testostérone et du glucuronide soient également supprimés (SINGH *et al.*, 1994).

Durant la vitellogenèse, ce n'est pas tout-à-fait clair si la décroissance de la production d'œstradiol est une cause (par réduction de la vitéllogenèse) ou un effet de la faible taille ovarienne, puisque la proportion des sites stéroïdogéniques folliculaires des ovocytes peut être altérée.

2. 3. 3. Effet sur les stéroïdes testiculaires

Par l'étude histologique, on a mis en évidence une diminution de 3β-HSD testiculaire chez la carpe (*Cyprinus carpio*) après l'exposition au fenitrothion (KAPUR *et al.*, 1978), et le même effet a été observé chez *Clarias batrachus* après exposition au quinalphos (BAGCHI *et al.*, 1990) (Tableau 1.12).

Le traitement *in vitro* de poissons rouges (SINGH *et al.*, 1994; KIME *et al.*, 1992) suggère que le γ-BHC a un effet plus prononcé sur la stéroïdogenése à partir du précurseur endogène que par conversion de 3H-17-hydroxyprogesterone exogène en androgène et progestogène. La synthèse endogène d'androgène a diminué au bout de quatre semaines d'exposition des poissons rouges, mais la testostérone et le 11-déoxycortisol étaient stimulés alors que la teneur en 11-kétotestostérone n'était pas changée dans les incubations auxquelles on avait ajouté le γ-BHC.

Chez le gardon *Rutilus rutilus*, le γ-BHC induit une augmentation du taux de testostérone glucuroné, une diminution du taux de 17-hydroxyprogesterone mais n'a pas d'effet sur la 11-kétotestostérone (SING et KIME, 1994).

Tableau 1.7 : Effets des pesticides sur la maturation ovocytaire, ovulation et la ponte.

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Référence
Phosdrin	*Mystus vittatus*	0,0001	84	Inhibition de la vitellogénine et baisse de 3β-HSD.	HAIDER & UPADHYAYA (1985)
Malathion	*Mystus vittatus*	0,01 - 1	1 *in vitro*	Inhibition de l'induction de la GVBD par LH.	HAIDER & UPADHYAYA (1986)
Birlane	*Mystus vittatus*	0,00001 à 0,001	1 *in vitro*	Inhibition de l'induction de la GVBD par LH.	HAIDER & UPADHYAYA (1986)
Gardona	*Mystus vittatus*	0,001 à 0,1	1 *in vitro*	Inhibition de l'induction de la GVBD par LH.	HAIDER & UPADHYAYA (1986)
Endosulfane	*Cyprinus carpio* L.	0,05 - 1	1,5 *in vitro*	Inhibition de l'induction de la GVBD par LH.	HAIDER & INBARAJ (1988)
2,4D	*Lepomis macrochirus*	5	150	Retard du développement ovocytaire.	COPE & al. (1970)
Fenitrothion	*Pœcilia reticulata*	0,1 - 1,5	60	Avortement.	YASUNO & al. (1980)

Tableau 1.8 : Effets des pesticides sur le nombre et la viabilité des œufs

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Référence
DDT	*Salmo trutta et Salvelinus fontinalis* L.	1,1 - 3,4	98 à 308	Baisse de la fertilité	BURDICK & al. (1972)
Dieldrin	*Pseudopleuronectes*	0,001 - 0,002		Baisse de la fertilité	SMITH & COLE (1973)
DDT	*Salvelinus fontinalis* (Mitchell)	5	150	Baisse de la fertilité et de la fécondité	COPE & al. (1970)
Kepone	*Cyprindon variegaus*	0,00007	60 à 120	Baisse de la fertilité et de la fécondité	GOODMAN & al. (1982)

Tableau 1.9 : Effets sur la morphologie des testicules et la spermatogenèse.

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Référence
Carbofuran	*Channa punctatus*	5	120	Diminution du RGS. Inhibition de la spermatogenèse.	MANI & SAXENA (1985)
	Rasbora daniconius	0,1	5 - 75	Domages morphologiques testiculaies.	SADHU & MUKHOPADHYAY (1985)
Fenitrothion	*Channa punctatus*	10 - 20	30	Diminution du RGS et nécrose des spérmatides.	SAXENA & MANI (1985, 1987)

Tableau 1.10 : Effets des pesticides sur le niveau hormonaux.

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Référence
Cythion	*Channa punctatus*	2	182	Réduction des cellules gonadotropes pituitaires	RAMA & SATHYANESAN (1987)
	Heteropneustes fossilis	35	28	Réduction d'absorption pituitaire et testiculaire du ^{32}P et réduction du GnRH hypothalamique.	SING & SING (1980, 1982)
ParamarM50	*Heteropneustes fossilis*	32	28	Réduction de l'activité pituitaire	SING & SING (1981,1982)
Aldrin	*Heteropneustes fossilis*	0,85	28	Réduction de l'activité pituitaire. réduction du taux de GnRH hypothalamique.	KUMAR & PANT (1988)
Hexadrin	*Heteropneustes fossilis*	0,008	28	Réduction de l'activité pituitair et l'absorption ovarienne du ^{32}P.	SING & SING, (1980, 1982)
Metacide-50[g]	*Channa punctatus*	0,0001	2 - 30	Diminution plasmatique et pituitaire en GtH.	GHOSH & al (1990)
Carbaryle	*Channa punctatus*	1,7	2-30	Diminution plasmatique et pituitaire en GtH.	GHOSH et al (1990)
γ - BHC	*Carassius auratus* L.	0,01 - 0,1	28	Diminution du taux de GTH et altéraion de synthése *in vitro* des stéroïdes	SING & KIME (1994)

Tableau 1.11: Effets des pesticides sur les stéroïdes ovariens.

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Reférence
Gardona	*Mystus vittatus*	0,146	84	Inhibition de la vitellogenèse etbaisse du 3-βHSD.	Haider &Upadhyaya (1985)
Phosdrin	*Mystus vittatus*	0,0001	84	Inhibition de la vitellogenèse et moins de 3-βHSD.	Haider &Upadhyaya (1985)
Malathion	*Mystus vittatus*	2,5	84	Inhibition de la vitellogenèse et moins de 3-βHSD.	Haider &Upadhyaya (1985)
	Monopterus albus	9	7	Diminution de contenu ovarien en œstradiol, testostérone et vitellogénine. Modification histologique ovarienne.	SING (1989)
γ-BHC	*Carassius auratus* L. (cyprinidae)	0,01-0,1	28	Altération *in vitro* de synthèse des stéroïdes	SING & KIME (1994)
		1-20	0,12 *in vitro*	Inhibition de stéroïdogenèse endogène.	
Carbaryl	*Anabas testudineus*	1,66	90	Diminution d'oestrogène et de RGS après 15 jours.	*Choudhury* & al. (1993)
Matacide 50	*Anabas testudineus*	0,0001	90	Diminution d'oestrogène et de RGS après 15 jours.	CHOUDHURY & al. (1993)
Cythion	*Clarias batrachus*	1 - 4	4 - 28	Baisse du contenu plasmatiques en stéroïdes.	SING & SING (1987)
Fenitrothion	*Cyprinus carpio* L.	0,3 - 1,5	180	Baisse de 3β-HSD gonadale	KAPUR & al. (1978)

2. 4. EFFETS SUR LE CATABOLISME HEPATIQUE

La décroissance de concentration plasmatique en hormones stéroïdes peut résulter non seulement de la décroissance de la synthèse gonadale, mais aussi de la croissance catabolique hépatique. Réciproquement, l'augmentation de la teneur en hormones plasmatiques pourrait être un résultat de la diminution du catabolisme hépatique plutôt que d'une synthèse accrue. Le DDT, par exemple, stimule le métabolisme des stéroïdes en métabolites polaires par l'hépatopancréas de carpe, ce qui pourrait expliquer son effet sur la diminution de concentration plasmatique. Nous pouvons supposé que les polluants affectent le recrudescence ovarienne en modulant la réponse du foie aux oestrogènes circulants.

Les auteurs ont décrit les diverses réponses cellulaires mais ont ignoré le plus souvent les mécanismes biochimiques et biomoléculaires responsables des anomalies germinales et somatiques.

3. AUTRES EFFETS DES POLLUANTS SUR LA REPRODUCTION DES POISSONS

Nous avons cité la littérature ancienne et récente des effets des pesticides sur la reproduction des poissons, qui concerne principalement l'action sur la production gonadale des gamètes et des stéroïdes et la sécrétion pituitaire des gonadotropines. Il est cependant clair que la reproduction peut être également influencée par les effets des polluants en affectant de nombreux autres composés régulateurs dont nous n'avons pas parlé, mais qui néanmoins peuvent avoir des effets sur l'activité reproductrice. Des études plus étendues ont été faites sur les effets des polluants sur l'activité de la thyroïde (SINGH *et al.*, 1989) alors que la prostaglandine, la prolactine et autres substances régulatrices pourraient également être perturbées par les polluants. Les polluants sont des stresseurs évidents, et les mesures effectuées pour déterminer les concentrations létales et sublétales des polluants ne tiennent compte que de signes de malaise bien visibles et peuvent donc rater d'autres indicateurs de stress ayant un effet inhibiteur sur la reproduction. Le stress, régulé par l'adrénaline, a un effet bien connu sur le système reproducteur (KIME *et al.*, 1980; PICKERING, 1981; PICKERING *et al.*, 1987; CARRAGHER *et al.*, 1989) et peut engendrer des effets indirects aboutissant à une décroissance du taux d'hormones sexuelles.

En plus de tels effets sur la fonction directe des gonades, il est nécessaire de considérer que chez de nombreux poissons, la parade nuptiale implique des comportements élaborés, en partie controlés par les hormones gonadales et hypothalamiques qui peuvent être affectées directement par les polluants.

Tableau 1.12: Effets des pesticides sur les stéroïdes testiculaires.

Pesticides	Espèces	Dose (mg/l)	Durée (jours)	Effets	Référence
Fenitrothion	*Cyprinus carpio* L.	0,3 - 1,5	180	Inhibition de la spermatogenèse et diminution du poids testiculaire. Necrose spermatique.	SAXENA & MANI (1985, 1987)
Quinalphos	*Clarias batrachus*	0,025	15	Diminution de 3βHSD et augmantation du cholesterol au niveau du testicule.	BAGCHI & al. (1990)
γ-BHC	*Rutilus rutilus* L.	1 - 20	*0,12 in vitro*	Modification *in vitro* de la production stéroïdique.	Singh & Kime (1994)

4. CONCLUSION

Vu l'impact des différents polluants mentionnés ci-dessus, nous pourrons supposer que l'atrazine possède, comme d'autres polluants, un effet néfaste non négligeable sur la reproduction.

Suivant la classe des différents polluants, on a repéré plusieurs manifestations à différents endroits du systéme reproducteur, telles que : lésions, hémorragies ou malformations au niveau des gonades, du foie, de l'hypophyse et de l'encéphale.

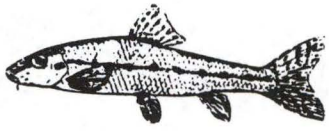
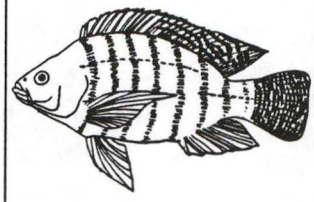
Pour conclure, et en guise de résumé, nous pouvons situer l'action des polluants à différents niveaux :

- soit directement sur la gamétogenèse,
- soit sur la sécrétion gonadotrope hypophysaire,
- soit sur la réceptivité du foie aux oestrogènes,
- ou encore sur la réceptivité des gonades aux stimulations hormonales.

Malheureusement, jusqu'à présent les auteurs ont décrit les diverses réponses cellulaires mais ont ignoré le plus souvent les mécanismes biochimiques et biomoléculaires responsables des anomalies germinales et somatiques. Cependant, il existe une littérature importante sur la survie des oeufs et des larves contaminés. La conséquence serait très grave au sein de la dynamique de la population. A long terme, l'impact majeur du polluant aura comme effet une réduction de la population à cause de la diminution du taux de fécondité, de la fréquence des cycles reproducteurs et de la mortalité accrue des jeunes. Enfin, le poisson qui représente une source de protéine importante, et se trouvant au sommet de la chaine alimentaire, menace la vie de nombreuses personnes en cas d'intoxication.

DEUXIEME PARTIE :
MATERIEL ET METHODES

Tableau 2.1 : présente les principales caractéristiques de la reproduction des espèces cibles. D'àprès (1) *PHILIPPART* et *VRANKEN* (1982), (2) *SPPILMAN* (1961), (3) *KESTEMONT* (1988), (4) *LOWE-McCONNELL* (1982) et (5) *RUWET* et al. (1976).

ESPECES / CARACTERISTIQUES	Goujon *Gobio gobio*	Tilapia *Oreochromis aureus*
		
PONTE	MULTIPLE	
OVOGENESE	ASYNCHRONE	
PERIODE DE REPRODUCTION	MAI A JUIN (1)	DURANT TOUTE L'ANNEE (5)
T° REPRODUCTION	16 A 17 °C(3)	25 A 28 °C (4)
MATURITE SEXUELLE	A PARTIR D'UN AN	A PARTIR DE DEUX MOIS (4)
NATURE DU SUBSTRAT DE PONTE	SABLE (3)	SABLE OU ARGILE

1. LES ESPECES CIBLES

Les espèces étudiées au cours de ce travail sont au nombre de deux et font partie du super-ordre des téléostéens (Tableau 2.1). Il s'agit du goujon et du tilapia. Face aux problèmes de régression généralisée des ovaires et des testicules observés lors de la mise en stabulation des goujons en conditions expérimentales nous avons été amenés à sélectionner une seconde espèce et à réaliser une nouvelle expérience. Compte tenu de l'avancement de la période de reproduction pour la plupart des espèces locales et de la nécessité de trouver un stock de poissons habitués aux conditions artificielles endéans un délai très court, le choix s'est porté vers une espèce de pisciculture se reproduisant de façon quasi continue. Le tilapia répondait à ces contraintes.

1. 1. LE GOUJON *GOBIO GOBIO*

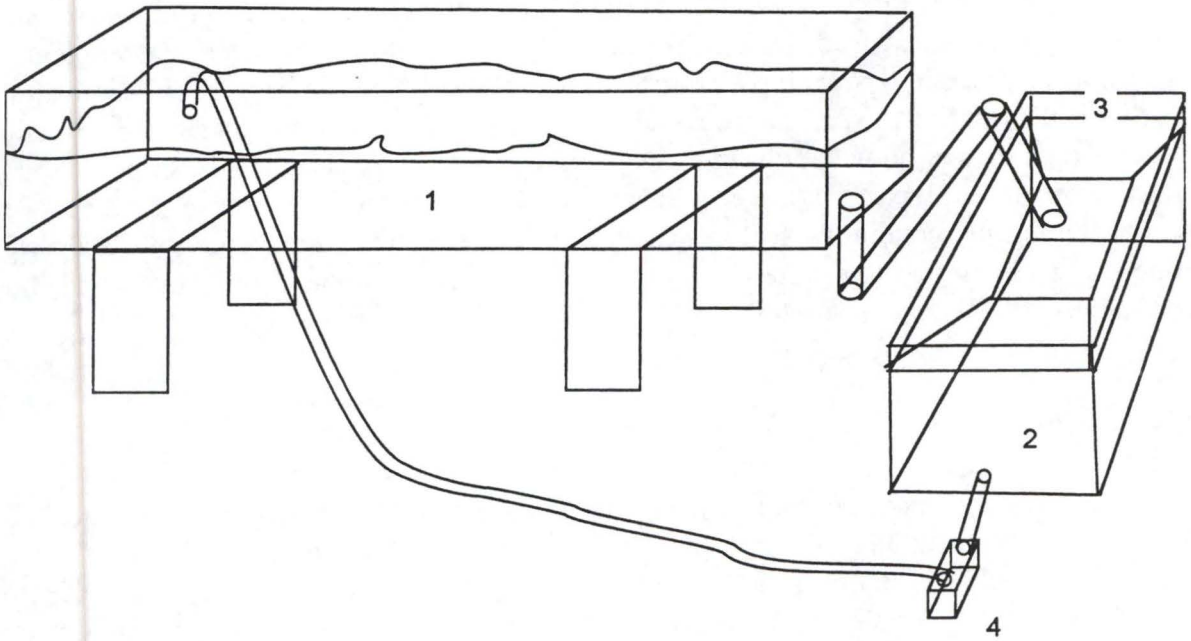
C'est un petit poisson dont la taille maximale est de 20 cm. En milieu narurel, sa taille atteint généralement 15 à 17 cm. Appartenant à la famille des cyprinidés, il a fait l'objet de diverses recherches au sein de l'Unité d'Ecologie des Eaux Douces (UNECED) (KESTEMONT, 1988, 1990; RINCHARD *et al.*, 1993). Cette espèce présente un intérêt écologique puisque le goujon, malgré un cycle de vie court et une haute capacité reproductive, tend à disparaître progressivement dans les rivières de Belgique.

1. 2. LE TILAPIA DORE *OREOCHROMIS AUREUS*

Comme tous les autres tilapias, il appartient à la famille des cichlidae. Il présente une répartition originelle strictement africaine. La période de reproduction d'*O. aureus* est potentiellement continue pendant toute l'année, si la température de l'eau est supérieure à 22°C.

2. PRODUIT HERBICIDE

L'atrazine est un herbicide triazinique (PESTANAL® Riedel-de Haën). Son poids moléculaire est de 215,5 g/mol et sa solubilité dans l'eau est de 28 mg/l à 20°C. Le degré de pureté du produit que nous utilisons est de 98 %. Pour effectuer nos gammes de concentration, cet herbicide est solubilisé dans du méthanol (CH_3OH) (30 ml), afin qu'il soit plus soluble dans l'eau.



1 - Compartiment d'élevage
2 - Compartiment de filtration composé de deux bassins
. Le premier recevant les eaux usées contenant les graviers d'argex
. Le second recevant les eaux épurées
3 - Mousse
4 - Pompe

Planche1 : Dispositif expérimental.

3. CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les expériences ont été réalisées à l'Unité de Biochimie et de Physiologie Comparée (Professeur P. DEVOS) (Unité de Recherche Biologie des Organismes).

3. 1. EXPERIENCE 1, LE GOUJON (*GOBIO GOBIO*)

La première série expérimentale a concerné les goujons qui ont été capturés par pêche électrique en milieu naturel (Ourthe) (planche 1). Les goujons ne subissent pas de période d'acclimatation. Le lendemain de leur arrivée au laboratoire, cinq femelles et cinq mâles sont retenus (au hasard) afin d'effectuer le premier prélèvement. Ensuite nous avons réalisé une contamination de l'eau par de l'atrazine dans deux des trois bacs et nous avons divisé les goujons en trois lots de 28 individus et tenté d'avoir un rapport de 14 femelles et de 14 mâles par lot. Le sexage se faisait en tenant compte du dimorphisme sexuel, à savoir l'émission d'ovules chez les femelles, la présence de boutons nuptiaux ou le réflexe de spermiation chez les mâles.

- Lot T : Eau non contaminée.
- Lot B0,1 : Eau contaminée par 0,1 mg/l d'atrazine.
- Lot B1 : Eau contaminée par 1 mg/l d'atrazine.

Nous avions prévu de sacrifier, à intervalle de 15 à 20 jours, un quota de cinq femelles et de cinq mâles par groupe afin de réaliser le prélèvement sanguin, de suivre la gamétogenèse au niveau histologique et d'obtenir des paramètres morphologiques.

3.1.1. Schéma expérimental

Le dispositif expérimental (Planche 2) est constitué de deux unités fonctionnant en circuit fermé, chaque unité opérationnelle est constituée de deux compartiments : l'un d'élevage et l'autre de filtration biologique. Le compartiment d'élevage est un bassin en polyester rectangulaire de 200 litres. Le compartiment de filtration recevant les eaux usées en provenance du bassin d'élevage est constitué de deux bassins posés l'un dans l'autre; le premier est équipé d'un ensemble de graviers argex (sur lesquels se développent les bactéries nitrifiantes, assurant la transformation des substances azotées toxiques (NH_4^+ et NO_2^-) dans une forme plus stable et peu toxique (NO_3^-)) et couvert par une mousse, limitant l'apport de matières particulaires dans le filtre, le second reçoit l'eau épurée avant qu'elle soit pompée à un débit de 1 l/min vers le bassin d'élevage. La température de l'eau a varié entre 10 et 16°C et l'oxygénation par pompe à air de 4 à 6 mg/l. Le nourrissage par distribution quotidienne de vers de vase a été effectué selon une ration journalière de 1,5 % de la biomasse totale des poissons.

3. 2. EXPERIENCE 2, LE TILAPIA *OREOCHROMIS AUREUS*

La deuxième série expérimentale a concerné les tilapias provenant de la pisciculture expérimentale du Laboratoire de Démographie des Poissons et d'Aquaculture de l'ULg à Tihange. Ils ont préalablement été acclimatés durant une semaine aux conditions expérimentales identiques à celles décrites pour les goujons, hormis quelques différences :

Planche 1 : Pêche électrique.

- le compartiment d'élevage est un bassin en polyester de 300 litres couvert de plaque plexiglas empéchant l'évaporation et le saut des tilapias hors du bassin;
- la température de l'eau est maintenue à 27±2°C à l'aide d'un système de chauffage constitué de résistances électriques thermostatisées;
- le nourrissage est distribué trois fois par jour (à 9, 12 et 18 heures) avec des granulés (aliment pour tilapia, 35 % de proteines brutes), à raison de 0,75 % de leur biomasse par jour.

Ainsi après l'acclimatation, nous avons réalisé le premiére prélèvement, ensuite les poissons ont été répartis en trois lots avec une proportion de 6 femelles et de 2 mâles par bac :

- Lot T : Eau non contaminée.
- Lot B0,1 : Eau contaminée par 0,1 mg/l d'atrazine.
- Lot B1 : Eau contaminée par 1 mg/l d'atrazine.

Les mâles étant territoriaux, un des deux mâles a été isolé à l'intérieur d'un grillage pour éviter qu'ils ne se battent; le second reste avec les femelles.

Durant les deux expériences, un certain nombre d'opérations ont été réalisées quotidiennement dans chaque aquarium-test :
- mesure de la température à l'aide d'un thermomètre d'une précision de 0,1°C;
- valeurs de pH mesurées avec un pHmètre (Digi-sense P 503);
- mesure du taux d'oxygène dissous au moyen d'un oxymètre (Dissolved oxygen, 300, chemitrix);
- contrôle des nitrites (NO_2^-) chaque semaine par dosage de l'azote sous forme de nitrites ($N\text{-}NO_2^-$);
- élimination des fèces deux fois par jour par aspiration et par nettoyage des mousses;
- suivi de la concentration en atrazine dans les trois bacs réalisé grâce à une extraction sur une colonne C18 suivie d'une détection par GC/MS (chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse).

4. PRECAUTIONS METHODOLOGIQUES

Afin d'éviter toute contamination significative entre les différents lots, plusieurs précautions ont été prises :
- les manipulations quotidiennes ont toujours été effectuées dans le même ordre, en commençant par le groupe contrôle pour terminer par le groupe avec la concentration la plus élevée;
- lors des manipulations, les poissons ont été traités avec beaucoup de soin, et surtout les tilapias afin de minimiser les risques de blessures et d'infections consécutives; les prélèvement ont été répétés sur les mêmes individus;
- le dosage des substances azotées (NH_4^+ et NO_2^-) a été effectué chaque semaine; en effet la présence d'ammoniaque dans un circuit fermé de pisciculture résulte de l'excrétion azotée par le poisson et la présence de nitrites résulte de la dégradation bactérienne de l'ammoniaque. Ces deux composés sont toxiques pour les poissons et la toxicité est exprimée par les nitrites totaux. Elle est communément admise à 0,2 mg/l en exposition continue.

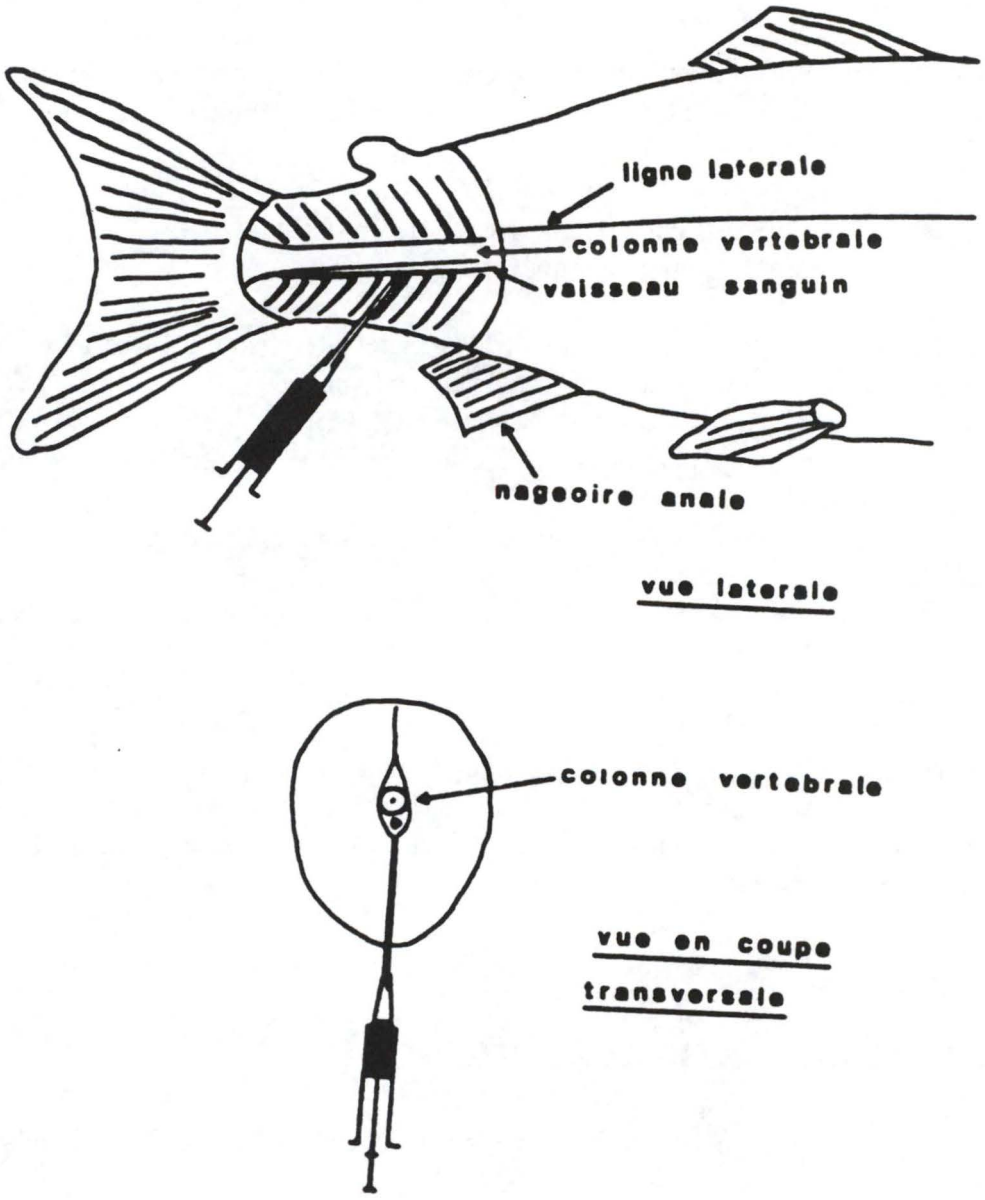


Figure 2. 1 : Schéma montrant la position de l'aiguille lors de la prise de sang.

5. MESURE DES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES

5. 1. LES GOUJONS

Les poissons préalablement anesthésiés avec du monophényl d'éthylèneglycol (2-5 ml/10 litres d'eau) sont pesés à l'aide d'une balance éléctronique à ± 0,1 g et mesurés au millimètre près avec une règle à butée. Une fois le prélèvement sanguin effectué, les goujons sont décapités. Les gonades sont prélevées, pesées avec une balance électronique d'une précision de 0,1 mg. Le critère morphologique considéré est le rapport gonadosomatique (RGS), qui est le rapport (exprimé en pourcent) entre le poids des gonades (G en g) et le poids total du poisson (P en g) :

RGS (%) = 100 x (G/P)

5. 2. LES TILAPIAS

Les tilapias étaient anesthésiés par le même produit que les goujons, mais après le prélèvment sanguin, les oeufs sont obtenus par simple pression abdominale. Ceux-ci sont ensuite placés dans une solution de Gilson (1 litre de Gilson est composé de 15 ml d'acide nitrique 80 %, 18 ml d'acide acétique glacial, 20 g de chlorure mercurique, 100 ml d'alcool et 880 ml d'eau). Les critères mesurés sont le diamètre moyen, le poids moyen et le nombre moyen d'oeufs pondus (fécondité) par kg. Le diamètre des oeufs a été déterminé sous loupe binoculaire par mesure de 50 oeufs.

6. EXAMEN ENDOCRINOLOGIQUE

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau du pédoncule caudal au moyen d'une seringue héparinée (volume de 1 ml et aiguille de 0,7 mm de diamètre) (Figure 2.1). Un maximum de sang est prélevé chez chaque individu du goujon et 0,4 à 0,5 ml chez le tilapia (les prélèvements étaient répétés sur les mêmes individus) puis placé dans des eppendorfs préalablement héparinés. Le plasma est obtenu par centrifugation (15 min à 4000g) et ensuite recueilli à l'aide d'une pipette pasteur et congelé à -20°C jusqu'au moment des dosages.

6. 1. LES DOSAGES DE LA 17β-œSTRADIOL, DE LA TESTOSTERONE ET DE LA 11-KETOTESTOSTERONE

6. 1. 1. Extractions de la 17β-œstradiol, de la testostérone et de la 11-kétotestostérone

Le dosage des stéroïdes par RadioImmuno Assay (RIA) dans les liquides biologiques est effectué après extraction par un solvant organique. L'extraction par des solvants de polarité adaptée à celle des stéroïdes à extraire permet de les concentrer. En effet, après addition de solvant, il se produit une rupture des liaisons hormone-protéine par dénaturation des protéines.

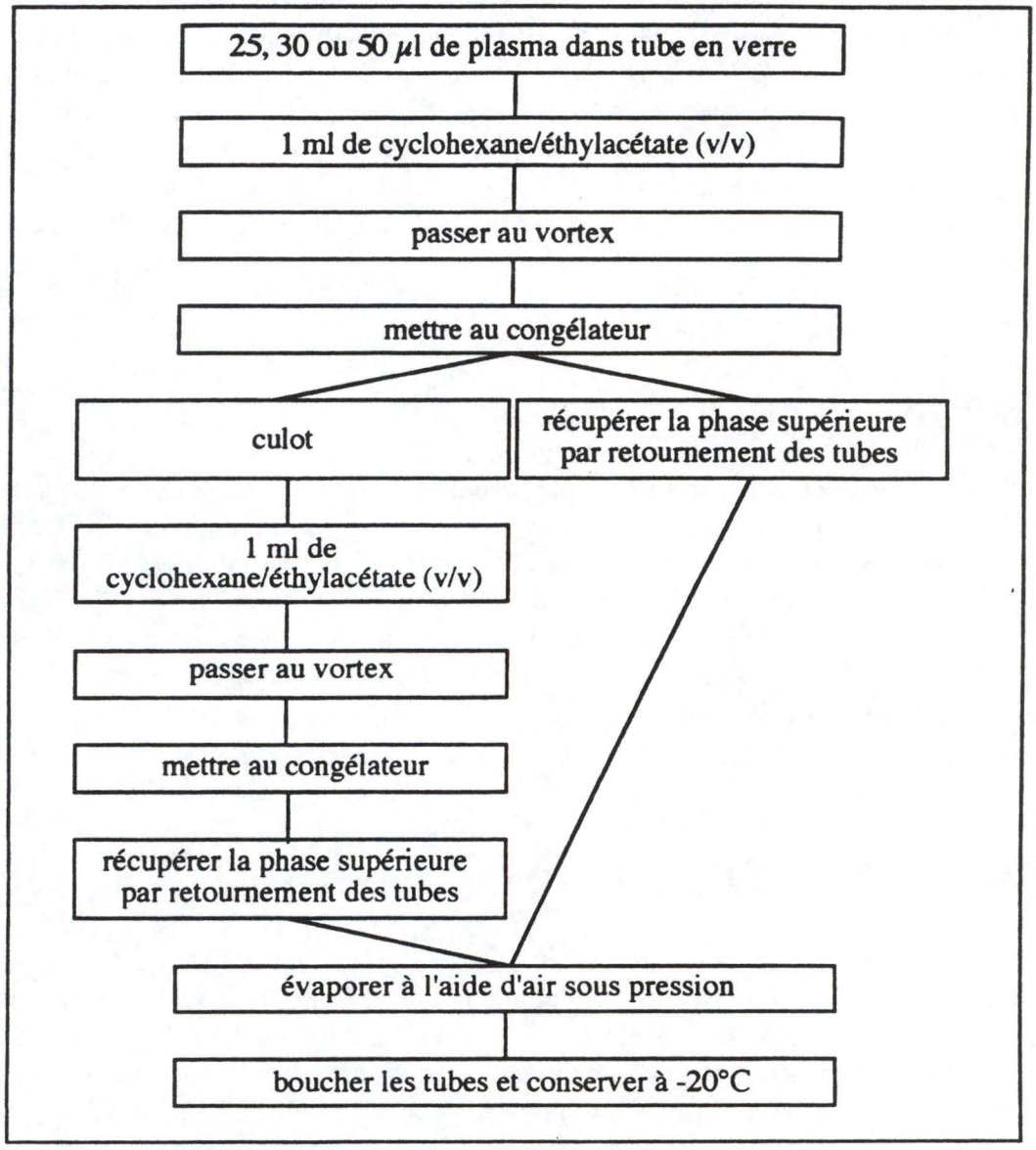


Figure 2. 2 : Méthodologie de l'extraction de la 17β-oestradiol, de la testostérone et de la 11-kétotestostérone.

La méthodologie suivie pour l'extraction de ces trois hormones est présentée à la figure 2.2.

6. 1. 2. Dosage proprement dit de la 17β-œstradiol, de la testostérone et de la 11-kétotestostérone

Le RIA est basé sur la compétition entre une quantité connue d'hormone marquée radioactivement et une quantité variable et inconnue d'hormone non marquée se trouvant dans l'échantillon à analyser vis-à-vis d'un anticorps qui leur est spécifique. La quantité d'anticorps et d'hormone marquée restant constante, toute augmentation d'hormone non marquée entraîne une réduction de la quantité d'hormone marquée se fixant aux anticorps. Pour réaliser un dosage, une courbe standard est d'abord établie. Elle montre la décroissance du pourcentage d'hormone marquée qui se fixe aux anticorps en présence d'une quantité progressivement croissante d'hormone non marquée. Lors du dosage proprement dit, les quantités connues d'hormones sont remplacées par les milieux biologiques dont on désire connaître le taux de cette hormone. Le pourcentage d'hormone marquée est alors portée sur la courbe de référence et la quantité d'hormone présente dans l'échantillon peut être déduite.

Ce dosage a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Animale (Professeur R. PAQUAY). La méthode employée est décrite à la figure 2.3. L'annexe 2 reprend la composition de différents produits nécessaires pour ce dosage.

La courbe standard est réalisée de la même manière que les échantillons, mais les 100 µl d'échantillon sont remplacés par 100 µl de stéroïdes purs à des doses croissantes. Nous avons également réalisé 6 blancs, 3 nuls et 4 standards totaux. La méthodologie de cet étalonnage est reprise dans le tableau 2.2.

Une fois le dosage terminé, le compteur (BECKMAN LS600SC) nous donne l'activité de chaque tube en cpm (coup par minute). Après avoir calculé la concentration de chaque tube (Ct), la concentration réelle en ng/ml peut être obtenue par la formule :

$$\frac{\text{Ct (pg/tube) x quantité de tampon de reprise (µl)}}{\text{quantité pour le dosage (µl) x quantité de plasma de départ (µl)}}$$

7. LE DOSAGE DU PHOSPHORE PROTEIQUE PLASMATIQUE

Ce dosage a été réalisé sur les échantillons de plasma par la méthode de MARTIN et DOTY (1949) modifiée selon JARRED etWALLACE (1968) suivant la procédure décrite à la figure 2.4 L'annexe 3 reprend la composition des différents produits nécessaires pour ce dosage.

C'est un dosage colorimétrique précédé d'une série d'extractions servant à isoler les protéines des autres constituants du plasma et d'une dénaturation de ces protéines de manière à libérer le phosphore. Une courbe étalon préalablement réalisée avec du KH_2PO_4 permet d'établir une relation densité optique-concentration dans une gamme de concentrations appropriées (0,1,2,5,10,20,32 et 40 µg de P/ml). Par l'intermédiaire de cette courbe, les valeurs en densité optique obtenues après lecture des échantillons au spectrophotomètre peuvent être

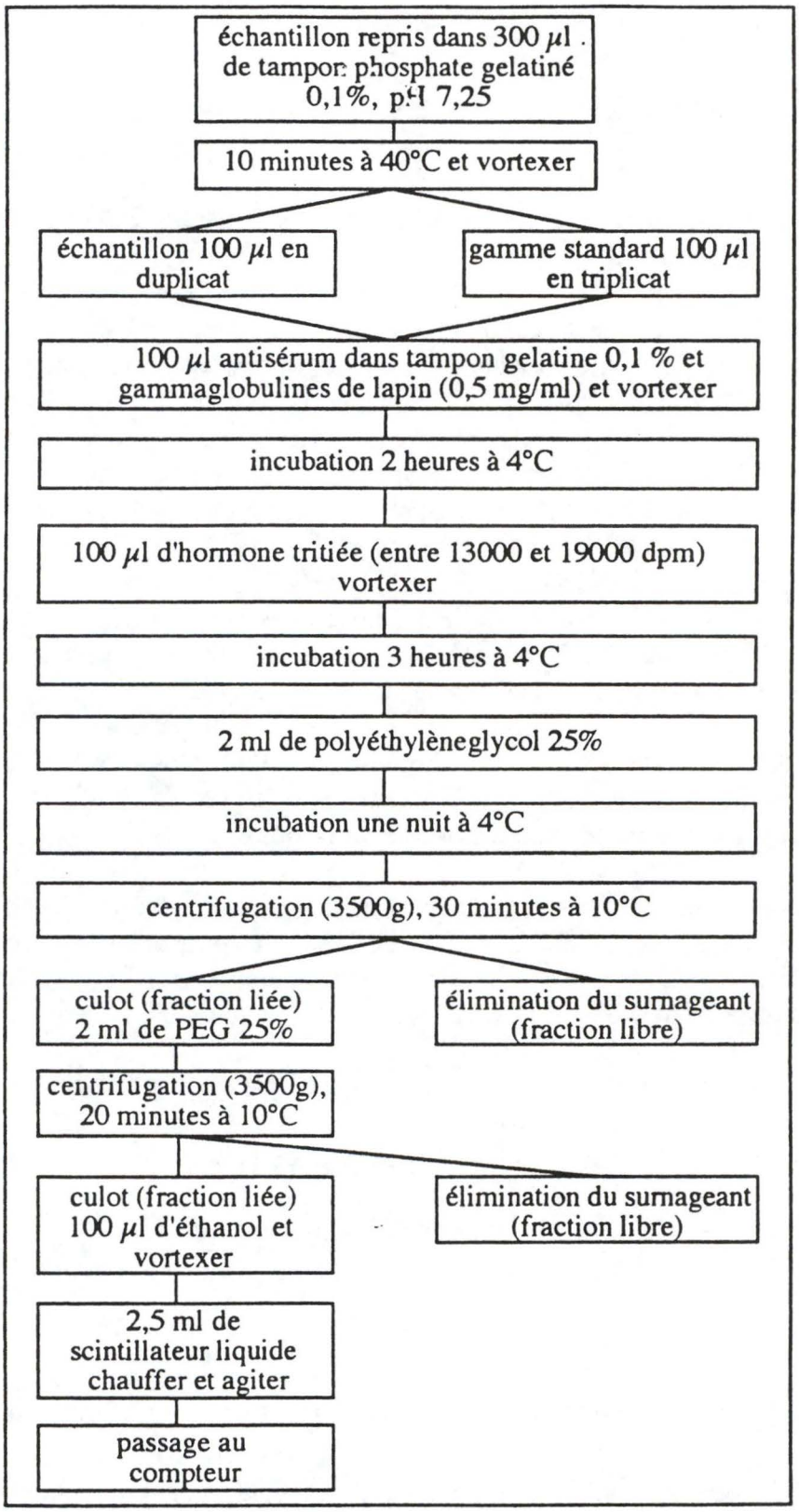


Figure 2. 3 : Protocole de dosage de la 17β-oestradiol, de la testostérone et de la 11-kétotestostérone.

Tableau 2. 2 : Méthodologie suivie pour l'étalonnage du dosage de la 17β-oestradiol.

- Tampon RIA avec gelatine.
- Solution mère de 100 μg/ml de 17ß-oestradiol dans de l'éthanol. La solution mère (M) doit être équilibrée à la température ambiante.
- Solution A : 1 ml de M dans 100 ml de tampon (1mg/ml) en fiole jaugée.
- Solution B : 1 ml de A dans 10 ml de tampon (100 ng/ml).
- Solution C : 1 ml de B dans 10 ml de tampon (10 ng/ml).
- Solution D : 1 ml de C dans 10 ml de tampon (1 ng/ml).

Les solutions B, C, D doivent être préparées dans des grands tubes en verre.
Dans des tubes à hémolyse en verre préparez ensuite :

Dose (pg)	Vol. tampon (μl)	vol. B (μl)	vol. C (μl)	vol. D (μl)
3000	700	300	-	-
1800	820	180	-	-
1100	890	110	-	-
650	350	-	650	-
400	600	-	400	-
250	750	-	250	-
150	850	-	150	-
90	100	-	-	900
55	450	-	-	550
35	650	-	-	350
20	800	-	-	200
12	880	-	-	120
8	920	-	-	80
5	950	-	-	50

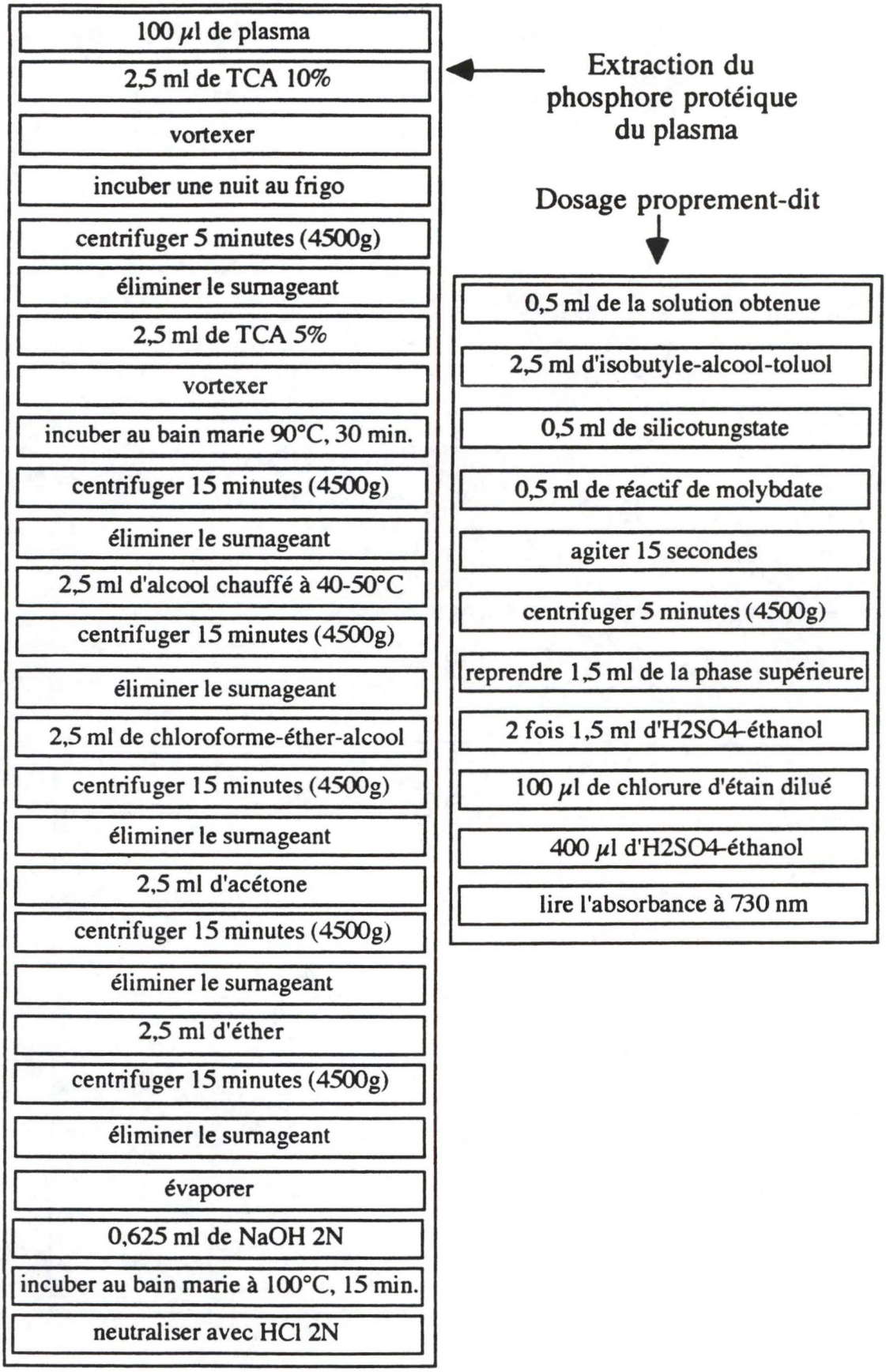


Figure 2. 4 : Technique de dosage du phosphore protéique plasmatique. Modifié d'après Wallace et Jared, 1968.

converties en valeurs de concentration. Les résultats sont exprimés en µg de phosphore protéique par ml de plasma.

8. ANALYSE DU SPERME

Afin de déterminer l'effet éventuel de l'atrazine sur les potentialités de reproduction des poissons mâles, trois paramètres ont été étudiés :

8. 1. LA CONCENTRATION DES SPERMATOZIDES

Pour mesurer la concentration de spermatozoïdes, un échantillon de sperme est prélevé par pression abdominale. Directement après, une partie de cet extrait est dilué 10.000 fois dans une solution de NaCl 0,7%. Un comptage est ensuite effectué sous microscope optique (grossissement 320 X) grâce à une cellule de Bürker.

8. 2. LA MOTILITE DES SPERMATOZOIDES

La motilité des spermatozoïdes est mesurée par la technique suivante : une petite goutte de laitance est déposée entre lame et lamelle puis une goutte d'eau y est ajoutée. Les spermatozoïdes deviennent mobiles dès leurs entrée en contact avec l'eau; un chronomètre est déclenché simultanément de façon à déterminer les différentes phases de motilité des spermatozoïdes, définies par HOCHMAN *et al.* (1974). L'observation se fait au microscope optique (grossissement 320 X). Cette manipulation est répétée 2 à 3 fois pour chaque poisson et une moyenne des durées de chaque phase est calculée.

8. 3. LA VIABILITE DES SPERMATOZOIDES

La viabilité des spermatozoïdes est determinée par le pourcentage de survie de ceux-ci qui est apprécié par la technique de coloration à l'éosine-nigrosine (composé de 5% d'éosine bleu et de 10% de nigrosine). Une goutte de sperme est mélangée, sur le bord d'une lame, à une goutte d'une solution d'éosine-nigrosine. Après trente secondes de contact, le mélange est étalé par frottis sur la lame et rapidement séché par agitation à l'air. Après la coloration à l'éosine-nigrosine, les spermatozoïdes morts prennent intensément le colorant et apparaissent orange-rouge, tandis que les spermatozoïdes vivants restent incolores.

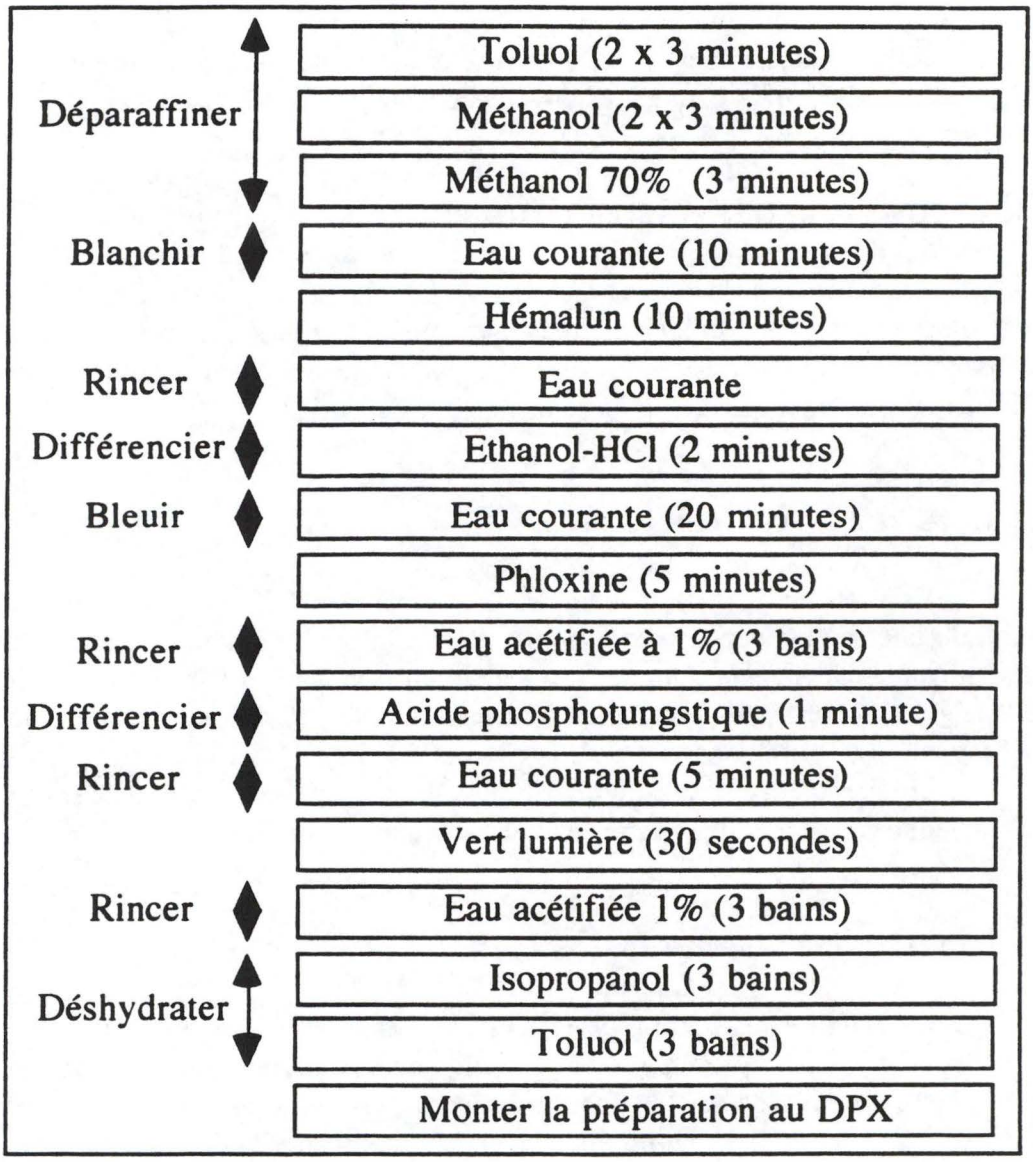


Figure 2. 5 : Routine histologique du trichome à froid. D'après Langeron, 1942.

9. HISTOLOGIE DES OVAIRES

Les analyses histologiques ont été effectuées au Département d'Histologie-Embryologie (Professeur R. LELOUP).

9. 1. COUPES ET COLORATION

Après avoir pesé les ovaires, une partie de ceux-ci est placée dans une solution de bouin (fixateur histologique dont la composition est la suivante : solution aqueuse saturée en acide picrique, 75%, formol de commerce, 20% et acide acétique glacial, 5%).

Après déshydratation et enrobage dans la cytoparaffine à 60,9°C, les ovaires sont coupés à 6 µm à l'aide d'un microtome (SPENCER, 1820) et colorés par un trichrome à froid : hémalun-phloxine-vert lumière (LANGERON, 1972), selon la procédure décrite à la figure 2.5.

9. 2. OBSERVATIONS DES COUPES

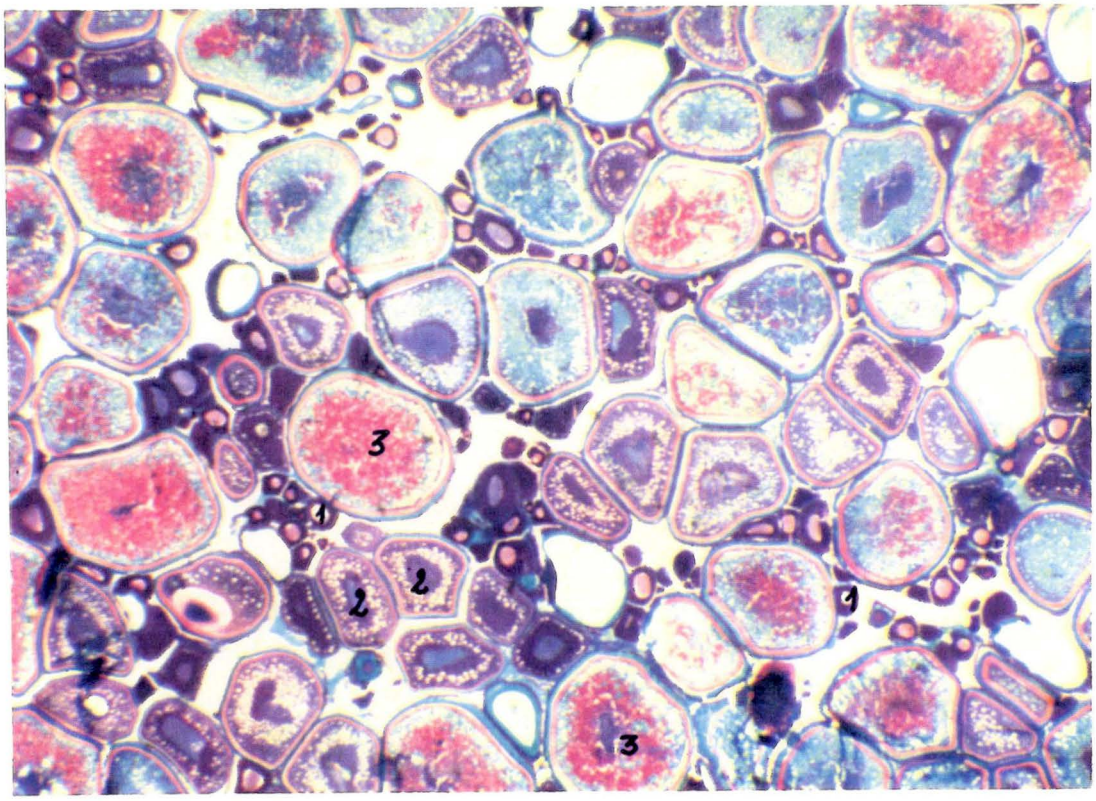
L'observation microscopique des coupes d'ovaires a permis la détermination de la maturité atteinte par le poisson. Celle-ci est déterminée par le stade ovocytaire le plus avancé, présent au sein de l'ovaire. Grâce à cette information, nous pouvons mettre en relation les variations des concentrations plasmatiques des trois stéroïdes dosés avec les stades de maturités des individus.

Voici les stades de maturité considérés et leurs descriptions (planche 3) :

- <u>le stade 1 ou protoplasmique</u>
  les ovocytes sont de petite taille et possèdent un gros noyau central;
  de nombreux nucléoles sont accolés à la membrane nucléaire;
  le cytoplasme est très basophile et les membranes ovocytaires sont indifférenciées.

- <u>le stade 2 ou vitellogénèse endogène</u>
  accumulation de vésicules de vitellus qui vont progressivement remplir le cytoplasme;
  augmentation du volume cellulaire;
  les membranes cellulaires et folliculaires sont bien différenciées.

- <u>le stade 3 ou viteollogenénèse exogène</u>
  présence d'inclusions fortement colorables à la phloxine, fusionnant progressivement en globules et repoussant les vésicules de vitellus en périphérie de l'ovocyte.



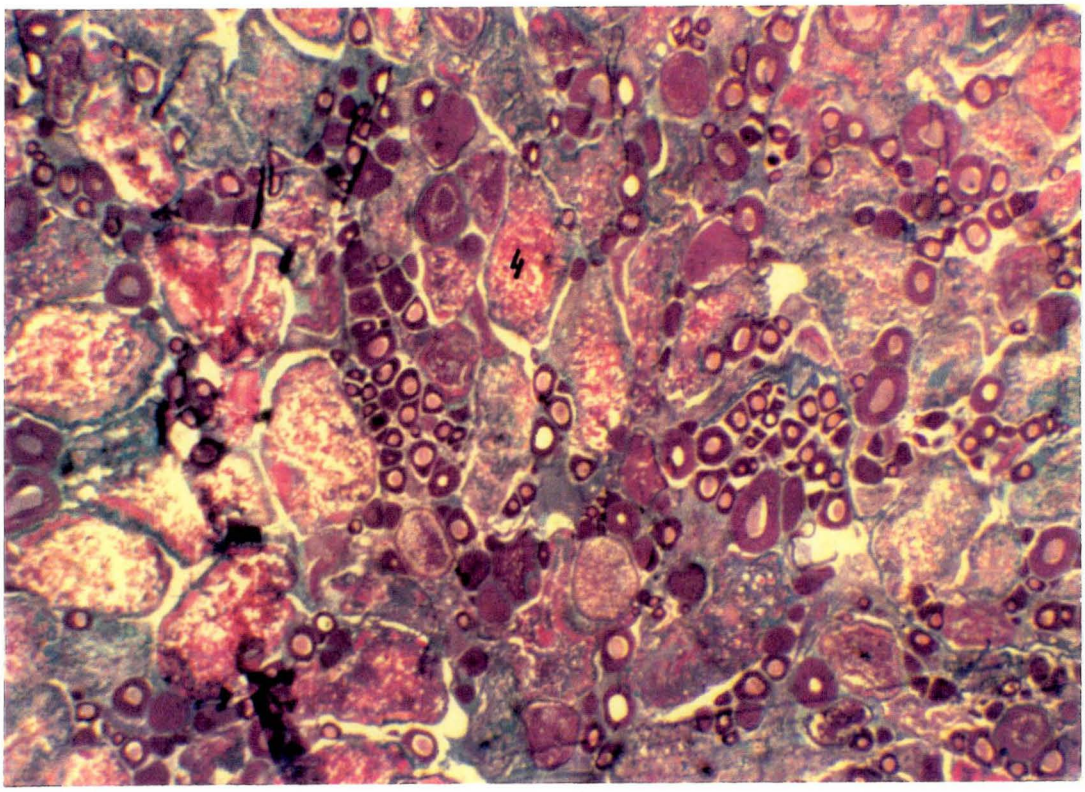


Planche 3 : A. ovaire de femelle de goujon en début d'expérience; B. ovaire de femelle de goujon de lot témoin en deuxième prélèvement.
1. stade protoplasmique; 2. vitellogenèse endogène; 3. vitellogenèse exogèr
4. follicule atrétique.

10. TRAITEMENT DES DONNEES

Les analyses statistiques descriptives ont été utilisées pour décrire et condenser l'ensemble de nos résultats. Nous avons ainsi calculé, pour chaque date de prélèvement, la moyenne arithmétique et l'écart-type des valeurs du RGS, du poids moyen, du diamètre moyen et du nombre moyen des oeufs pondus, de la viabilité, motilité et concentation des spermatozoïdes. En ce qui concerne le contenu plasmatique en phosphore protéique, 17β-oestradiol, testostérone et 11-kétotestostérone, l'erreur standard a été calculée plutôt que l'écart-type.

Après avoir testé l'homogénéité de nos variances par le test de Hartley ou de Bartlett (selon que les prélèvements sont effectués sur le même nombre ou sur un nombre différents d'individus), nous avons réalisé une analyse de la variance à un critére de classification (ANOVA 1) de manière à tester l'effet du traitement sur nos variables.

TROISIEME PARTIE :
RESULTATS ET DISCUSSION

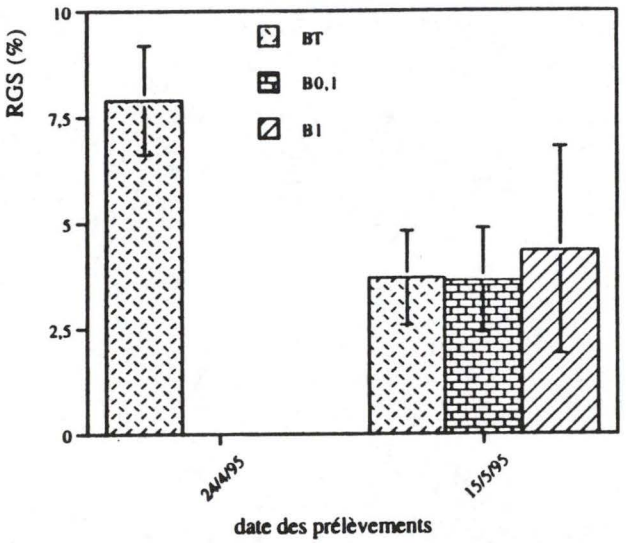


Figure 3.1 : Evolution temporelle du rapport gonadosomatique (RGS) en % chez les goujons femelles témoins et contaminées par de l'atrazine (B =bac témoin, B0,1 = bac de 0,1 mg/l et B1 = bac de 1 mg/l de l'atrazine)

les barres verticales = les écart-types.

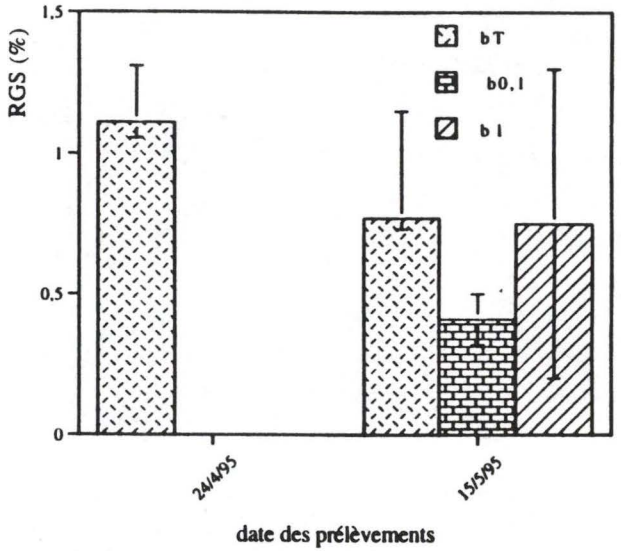


Figure 3.2 : Evolution temporelle du rapport gonadosomatique (RGS) en % chez les goujons mâles témoins et contaminés par de l'atrazine (BT = bac témoin, B0,1 = 0,1 mg/l et B1 = 1 mg/l de l'atrazine)

les barres verticales = les écart-types.

Les résultats de chaque expérience seront proposés dans un premier temps, ensuite, nous entamerons une discussion pour chaque expérience. Enfin, nous terminerons par une conclusion générale afin de faire le lien entre les différents résultats obtenus.

1. EXPERIENCE 1 : LE GOUJON (*GOBIO GOBIO*)

1. 1. CONDITIONS DE STOCKAGE

Les conditions de stockage se sont révélées non satisfaisantes tout au long d'expérience. En effet des variations physico-chimiques de l'eau importantes ont été enregistrées :

- les nitrites, contrôlés deux fois par semaine, donnent des valeurs comprises entre 0,5 et 2,38 mg/ml, ce qui nous a amené à renouveler l'eau trois fois durant l'expérience. .
- les concentrations en oxygène dissous restent comprises entre 4,5 et 5,5 mg/l.
- les valeurs de pH se sont maintenues entre 6 et 8.
- même si la salle d'expérience possède une inertie thermique importante, celle-ci n'était pas climatisée. De ce fait, la température de l'eau a fluctué dans les aquariums entre10 et 16°C.

Ces conditions de stockages ont été mal supportées par les goujons, d'autant plus qu'ils avaient été capturés dans le milieu naturel peu de temps avant la période de reproduction. Ils présentaient un comportement extrêmement nerveux et acceptaient difficilement l'alimentation artificielle. Cette mauvaise adaptation aux conditions expérimentales s'est marquée par des mortalités importantes au début de l'expérience dans les trois groupes. Par contre aucune maladie n'a été observée au cours de cette expérience.

1. 2. EFFETS DE L'ATRAZINE SUR LA MATURITE DES POISSONS

L'ensemble des résultats individuels issus des prélèvements est repris à l'annexe 4. Les tests de normalité réalisés sur les écarts résiduels sont tous non significatifs pour la première expérience.

1. 2. 1. Effets de l'atrazine sur l'évolution du rapport gonadosomatique

L'évolution du rapport gonadosomatique (RGS) au cours de l'expérience est présentée aux figures 3.1 et 3.2. Le RGS moyen, au début de l'expérience, est de 7,89 ± 1,28% chez les femelles et de 1,1 ± 0,2 % chez les mâles. Nous observons une diminution marquée de ces valeurs lors du deuxième prélèvement, le RGS variant entre 3,6 ± 1,24 et 4,3 ± 2,45 % chez les femelles et 0,4 et 0,77 % chez les mâles. De plus, même si la diminution du RGS semble moins marquée chez les mâles, signalons que plus aucun poisson n'était spermiant lors du second prélèvement alors que la majorité de ceux-ci l'étaient lors de leur capture en rivière.

En résumé, nous pouvons dire que les profils obtenus n'ont pas montré un effet uniquement lié à l'atrazine puisqu'une diminution du RGS a été observée dans les 3 groupes, y compris dans le lot témoin, ce qui indique qu'un agent stressant autre que l'atrazine soit à l'origine de cette régression. L'analyse de la variance (ANOVA 1) nous confirme ceci, car elle

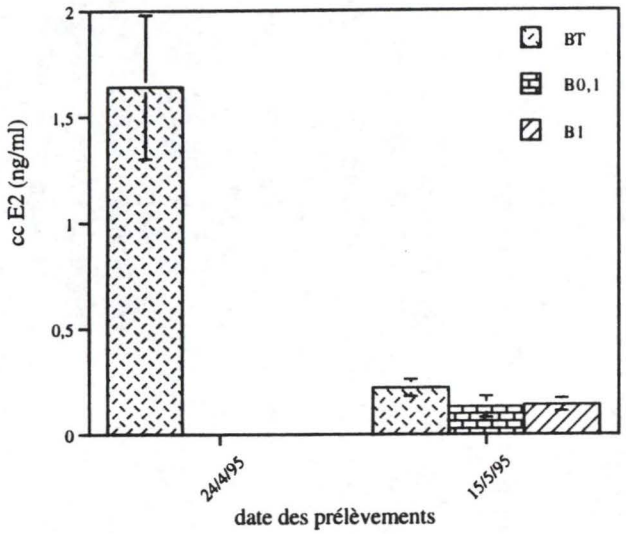


Figure 3.3 : Evolution temporelle de la 17β-oestradiol plasmatique (E2 en ng/ml) chez les goujons femelles témoins et contaminées par de l'atrazine.

les barres verticales = les erreurs standards

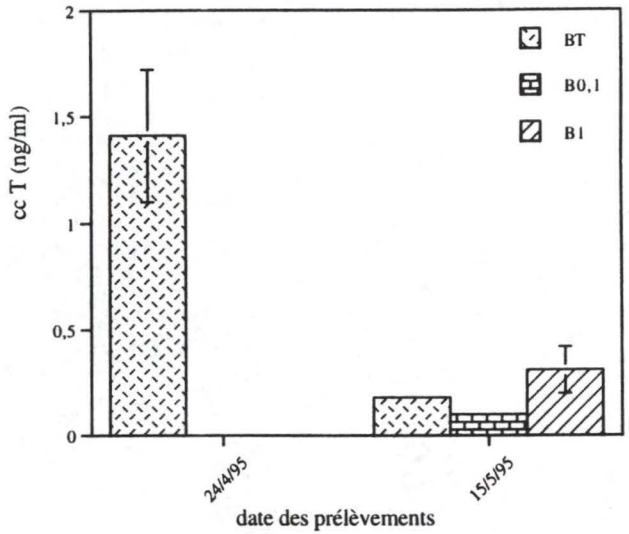


Figure 3.4 : Evolution temporelle de la testostérone (T en ng/ml) chez les goujons femelles témoins et contaminées par de l'atrazine.

les barres verticales = les erreurs standards

ne révèle aucun effet significatif des traitements sur le RGS, ni chez les femelles (P = 0,8) ni chez les mâles (P = 0,3) (Tableaux 3.1, 3.2).

1. 2. 2. Effets de l'atrazine sur l'évolution des hormones sexuelles circulantes

1. 2. 2. 1. Evolution de la 17β- oestradiol (E2)

En observant la figure de l'E2 (Figure 3.3), nous pouvons constater que les taux moyens de cette hormone qui, en début de l'expérience sont de 1,64 ± 0,4 ng/ml, diminuent dans les trois lots, lors du deuxième prélèvement (0,13 à 0,22ng/ml).
L'ANOVA 1 ne révèle aucun effet significatif (P = 0,7) des traitements sur les concentrations de la 17β-oestradiol (Tableau3.1).

1. 2. 2. 2. Evolution de la testostérone (T)

En ce qui concerne le taux de testostérone (précurseur de la 17B-oestradiol chez les femelles et de la 11-kétotestostèrone chez les mâles), on observe une valeur initiale généralement supérieure en début d'expérience, aussi bien chez les femelles (Figure 3.4) que chez les mâles (figure 3.5), suivie par une chute dans les trois groupes expérimentaux. Notons également le taux de testostérone nettement plus élevé chez les mâles (0,44 à 0,64 ng/ml) que chez les femelles (0,1 à 0,3 ng/ml).
L'ANOVA 1 ne décèle aucun effet significatif sur les taux de testostérone (P = 0,12 chez les femelles et P = 0,96 chez les mâles) (Tableaux 3.1, 3.2).

1. 2. 2. 3. Effets sur l'évolution de la 11-kétotestostérone (11-KT) chez les mâles

L'évolution du taux de 11-kétotestostérone suit un profil similaire à celui des 2 autres stéroïdes sexuels, à savoir une diminution généralisée quelque soit le traitement (Figure 3.6). Dans ce cas, la diminution est même plus importante chez le groupe témoin, ce qui suggère l'absence de l'effet de l'atrazine. L'analyse statistique (ANOVA 1) ne révèle toutefois aucune différence significative entre les différentes concentrations plasmatiques en 11-kétotestostérone (P = 0,67) (Tableau 3.2).

1. 2. 3. Effets sur l'évolution du phosphore protéique plasmatique

Les concentrations en PPP sont relativement élevées en début d'expérience (1,57 µg/ml) (Figure 3.7). Ces valeurs subissent une forte chute dans tous les groupes lors du second prélèvement, avec des moyennes variant entre 0,17 ± 0,05 et 0,4 ± 0,08 µg/ml selon les traitements, les valeurs les plus faibles étant observées chez les poissons témoins. L'ANOVA 1 ne révèle toutefois aucun effet significatif (P = 97) des traitement sur les concentrations de PPP (Tableau 3.1). Signalons cependant que les variations individuelles sont très importantes.

1. 2. 4. Histologie des ovaires

Le RGS peut être utilisé pour estimer globalement l'état de maturation des poissons, il ne permet pas d'établir, de façon précise, la condition dans laquelle se trouve l'ovaire, comme le révèle l'analyse histologique.

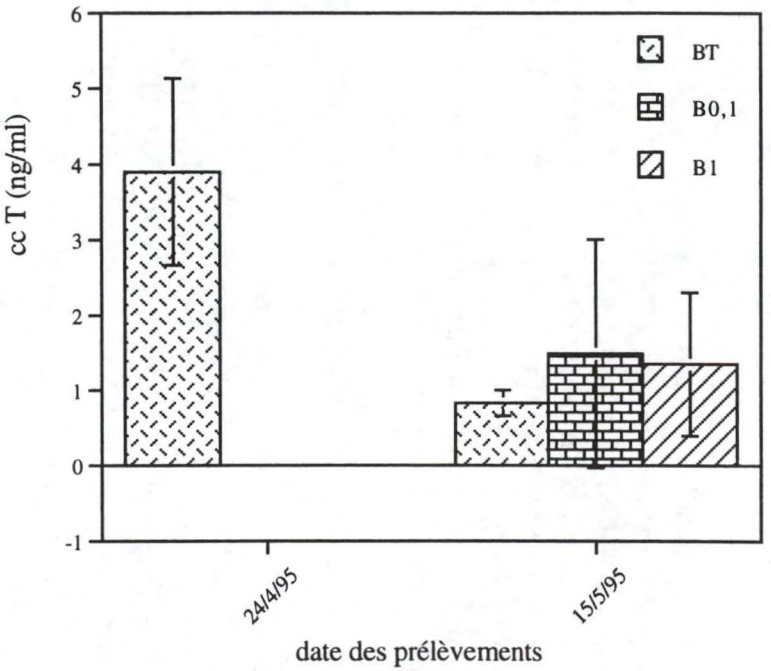


Figure 3.5 : Evolution temporelle de la testostérone (T en ng/ml) chez les goujons mâles témoins et contaminés par de l'atrazine.

les barres verticales = les erreurs standards

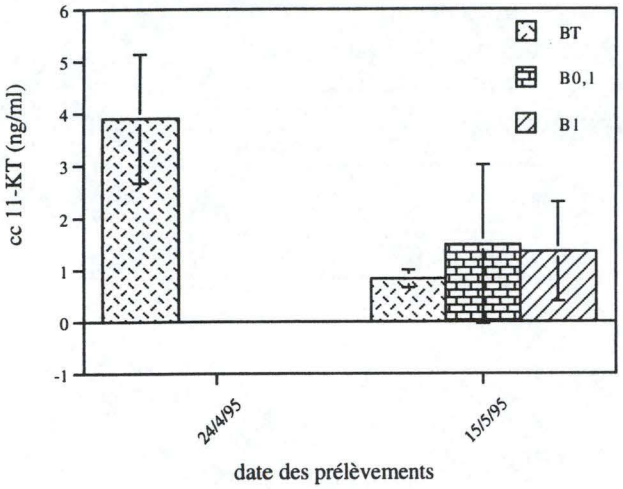


Figure 3.6 : Evolution temporelle de la 11-kétotestostérone (11-KT en ng/ml) chez les goujons mâles témoins et contaminés par de l'atrazine.

les barres verticales = les erreurs standards

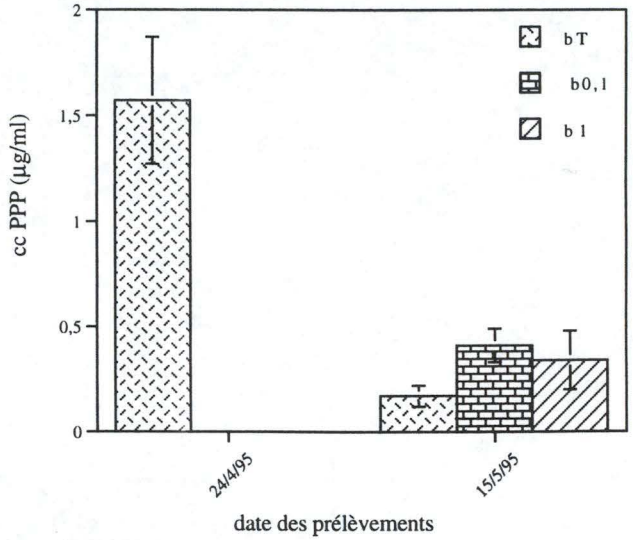


Figure 3.7 : Evolution temporelle du phosphore protéique plasmatique (PPP en µg/ml) chez les goujons femelles témoins et contaminées par de l'atrazine.
les barres verticales = les erreurs standards

Tableau 3.1 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du premier prélèvement chez les goujons *Gobio gobio* (femelles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B0,1	B1	ETR	
Morphologiques					
Rapport gonadosomatique (RGS)	3,69	3,63	4,34	43,99	0,81
Endocrinologiques					
Testostérone (T)	1,41	0,18	0,1	10	0,12
17β-oestradiol (E2)	0,22	0,13	0,15	0,3	0,7
Phosphore protéique plasmatique (PPP)	0,38	0,41	0,34	1,53	0,97

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 1ère prélèvement)
ETR: Ecart-Type Résiduel (√CMR) avec 10 degrés de liberté (T, E2), 9 degrés de liberté (PPP), 12 degrés de liberté (RGS).

L'analyse histologique nous montre en effet que les poissons, en début d'expérience, sont en début de maturation car la plus part de femelles contiennent des ovocytes au stade 2 et 3. Aucun follicule atrétique n'est présent dans les coupes. Par contre dans le deuxiéme prélèvement, nous sommes en présence d'atrésie énorme (abondance de follicules atrétiques pré-ovulatoires, absence de follicules sains en voie de maturation).

1. 3. DISCUSSION

Au terme de cette première expérience, un certains nombre de remarques s'imposent. La régression des poissons serait peut être due à une mauvaise accommodation aux conditions expérimentales (bassins et alimentation). Cette hypothèse se renforce par le fait que même les individus du groupe témoin, présentaient des ovocytes en atrésie. Par ailleurs, les niveaux d'hormones sexuelles telles que la T et l'E2 ont fortement chuté, ce qui s'est marqué par une diminution très nette du PPP dans tous les lots. Rappelons que chez les téléostéens femelles, les oestrogènes (surtout la 17β-oestradiol) synthétisés dans les cellules de la *granulosa* des follicules ovariens et sécrétés par l'ovaire, stimulent la synthèse par le foie de la vitellogénine qui, transportée par le sang jusqu'à l'ovaire. Testostérone est à l'origine des constituants comme les précurseurs des oestrogénes chez les femelles, et de la 11-ketotestostérone chez les mâles. Il est évidemment difficile d'évaluer si les conditions expériementales défavorables ont exercé un effet négatif sur la sécrétion de cette dernière hormone, avec toutes les conséquences que cela peut entraîner au niveau de la maturité des femelles et des mâles, ou si l'effet s'est manifesté à différents niveaux tels que E2, PPP et maturitation ovocytaire.
Enfin, d'autres facteurs de stress tels que le stress de capture et de transport, le confinement et le refus d'alimentation peuvent avoir fortement perturbé la réalisation de cette expérience. Il est difficile d'apprécier l'importance de ces facteurs, mais il est évident que leur action conjointe a masqué l'effet recherché et que les changements d'environnement que nous avons réalisés étaient trop éloignés de ceux survenant dans la nature.

Une conséquence typique de la manipulation est donnée par de MONTALEMBERT *et al.* (1978; in BILLARD et GILLET, 1984) qui montrent une inhibition de l'ovulation suivie d'atrésie folliculaire, après quelques jours de captivité chez le brochet *Esox lucius* (L.). De même, Scott (1979; in BILLARD et GILLET, 1984) mentionne que le transfert de *Phoxinus phoxinus* (L.) femelle, d'un environnement naturel dans un aquarium, provoque, en quelques jours, une atrésie massive des ovocytes en vitellogénèse. Ces résultats démontrent que les effets des manipulations sont fortement dépendants du degré de domestication de l'espèce et du moment où ces manipulations sont pratiquées. Dans notre cas, il est clair que la mise des poissons en conditions expérimentales s'est faite trop tardivement, à un moment où les goujons s'approchaient de la période de reproduction et étaient de ce fait fortement fragilisés. L'atrésie observée chez tous les individus était très avancée, comme le montre la planche 3.

Tableau 3.2 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocronilogiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du premier prélèvement chez le goujon *Gobio gobio* (mâles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B0,1	B1	ETR	
Morphologiques					
Rapport gonadosomatique (RGS)	0,77	0,41	0,75	1,86	0,3
Endocrinologiques					
Testostérone (T)	1,58	0,44	0,51	10,97	0,23
11-kétotestostérone (11KT)	0,84	1,5	1,36	12,14	0,67

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 1ère prélèvement)
ETR: Ecart-Type Résiduel (√CMR) avec 10 degrés de liberté (T, 11-KT), 12 degrés de liberté (RGS).

2. EXPERIENCE 2 : LE TILAPIA *(OREOCHROMIS AUREUS)*

En nous rendant compte que les variations de l'environnement lors de la première expérience présentaient des réponses indésirables, nous avons entrepris cette deuxième expérience sur des poissons provenant d'une station de recherche en pisciculture située à Tihange (CERER-Aquaculture, Université de Liège) et qui étaient habitués aux conditions d'élevage artificiel. Le but de cette seconde expérience, comme nous l'avons précisé précédemment, était de vérifier si la présence de l'atrazine dans l'eau pouvait provoquer des effets néfastes sur la reproduction des poissons, et tenter de situer de façon préliminaire, les zones d'action de ces pesticides sur le système reproducteur, soit au niveau du contrôle endocrine terminal (conc. en stéroïdes sexuels circulants), soit au niveau de la synthèse et de l'accumulation des réserves vitellines (conc. en phosphore protéique plasmatique), soit au niveau de la qualité des gamètes produits (ovules et spermatozoïdes).

L'ensemble des résultats individuels issus des prélèvements est repris dans l'annexe 5.

2. 1. LES CONDITIONS DE STOCKAGE

Les conditions de stockage se sont révélées satisfaisantes pendant la durée de l'expérience. aucune variation importante des caractéristiques chimiques de l'eau n'étant enregistrée. La température a été maintenue à ± 27°C grâce à des résistances thermostatisées, les concentrations en oxygène dissous sont restées comprises entre 5 et 7 mg/l, les valeurs de pH se sont maintenues à ± 7,6 et les nitrites (NO_2^-) sont restés compris entre 0,035 et 0,06 mg/ml, soit à des niveaux tout à fait acceptables.

Malgré cela, les poissons ont relativement mal supporté les conditions de stockage. Les opérations de transport, quoique exécutées soigneusement, ont provoqué quelques stress et blessures légères à certains individus, perturbant leur comportement. En plus, lors de leur arrivée, les poissons présentaient une infection bactérienne sur les parties latérales de certains individus, ce qui a provoqué une mortalité régulière des femelles du bac traité à 1 mg/l d'atrazine (B1). Les poissons ont été traités grâce à un antibiotique (inflamethoscazole), à raison de 50 mg/kg de poisson. Cet antibiotique était adsorbé sur les granulés de nourriture, suite à l'ajout d'un peu d'huile. Malgré ce traitement, la mortalité a été totale dans le bac B1 avant le dernier prélèvement.

2. 2. EFFET DE L'ATRAZINE SUR L'EVOLUTION DES PARAMETRES ENDOCRINOLOGIQUES CHEZ LES FEMELLES

2. 2. 1. Evolution de la 17β-oestradiol (E2)

Les profils de l'E2 (figure 3.8) nous montrent que les taux moyens de cette hormone qui, en début d'expérience, varient de 10,94 ± 1,65 à 12 ± 2,97 ng/ml, évoluent différemment chez les trois groupes expérimentaux. En effet, alors que les poissons du groupe témoin montrent une légère augmentation de la concentration en oestradiol au cours de l'expérience,

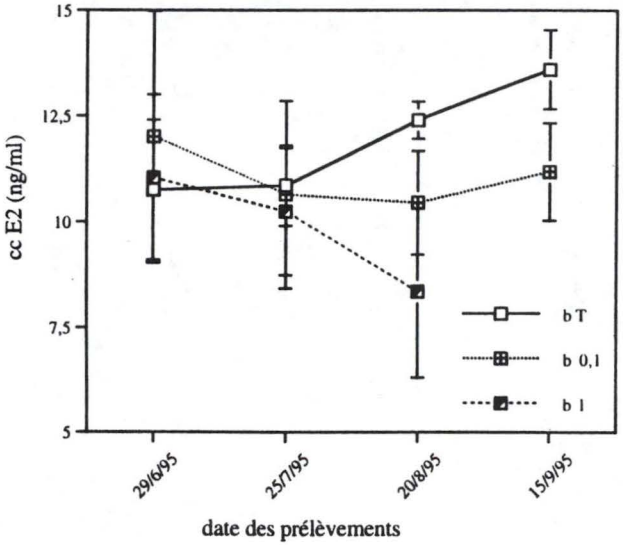


Figure 3.8 : Evolution temporelle de la 17 β-oestradiol (E2 ng/ml) chez *O.aureus* femelles témoins et contaminées par de l'atrazine.
les barres verticales = les erreurs standards

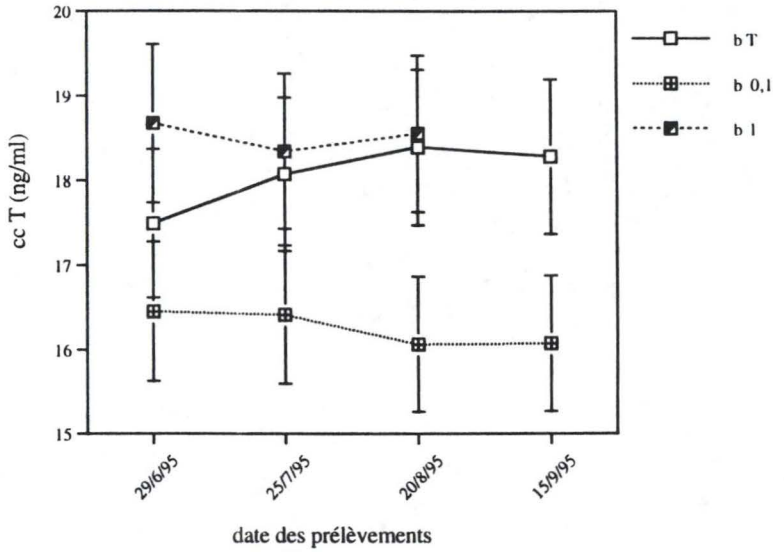


Figure 3.9 : Evolution temporelle de la testostérone (T en ng/ml) chez *O.aureus* femelles témoins et contaminées par de l'atrazine.
les barres verticales = les erreurs standards

atteignant 13,52 ± 0,44 ng/ml (moyenne ± erreur standard) le 15/9/1995, les groupes contaminés voient leur concentration en E2 soit se maintenir à un niveau relativement stable durant toute la durée de l'expérience (groupe B0,1), soit diminuer jusqu'à 8,34 ± 2,04 ng/ml (groupe B1), aucun prélèvement n'ayant pu être effectué dans de dernier groupe suite à la mortalité totale des femelles. L'analyse statistique (ANOVA 1) ne révèle toutefois aucun effet significatif ($P \geq 0,26$) des traitements sur les concentrations de l'E2 (Tableaux 3.3.1-3.3.4) quel que soit la date du prélèvement.

2. 2. 2. Evolution de la testostérone (T)

L'évolution du taux de T ne présente pas de variation significative dans les trois groupes expérimentaux (figure 3.9). Nous pouvons même remarqué une concentration très légèrement supérieure chez le groupe le plus contaminé par rapport aux groupes témoin et B0, ce qui suggére l'abscence d'effet de traitement sur la concentration plasmatique en T.
ANOVA 1 ne décèle d'ailleurs aucun effet significatif ($0,39 \leq P$) des traitements sur les concentrations de testostérone chez les tilapias femelles (Tableaux 3.3.1- 3.3.4).

2. 3. Effets de l'atrazine sur l'evolution temporelle de la teneur en phosphore proteique plasmatique (PPP)

La figure 3.10 montre l'évolution de la PPP chez le groupe témoin et les deux groupes contaminés par de l'atrazine. A première vue, en observant ces différents profils, nous pouvons constater un effet de l'atrazine sur le taux plasmatique en phosphore protéique chez les groupes contaminés en comparaison avec le groupe témoin. Au début d'expérience les trois groupes montrent un niveau relativement semblable de PPP (9,46 ± 1,96 à 11,63 ± 3,13 µg/ml), mais, au cours des prélèvements ultérieurs, nous observons une diminution progressive de celui-ci chez les deux groupes contaminés alors que la concentration en PPP augmente chez les poissons du lot témoin tout au long de l'expérience. Toutefois, l'analyse statistique ne confirme pas le graphe obtenu. En effet, aucune différence significative de concentration en PPP ($P \geq 0,23$) (Tableaux 3.3.1- 3.3.4) n'a pu être mise en évidence entre le groupe témoin et les deux groupes contaminés.

2. 4. Effet de l'atrazine sur l'evolution des parametres endocrinologiques chez les males

2. 4. 1. Effets de l'atrazine sur l'evolution de la testostérone (T)

La figure 3.11 présente l'évolution temporelle de la testostérone plasmatique chez les individus témoins et les individus contaminés. Nous n'observons pas de variation significative du contenu plasmatique en T chez les contaminés par rapport aux témoins. Nous observons même une concentration moyenne inférieure chez le groupe témoin en comparaison avec celle des groupes contaminés. Ainsi, l'analyse statistique réalisée (ANOVA 1) indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois groupes ($P \geq 0,84$) (tableaux 3.3.5-3.3.8).

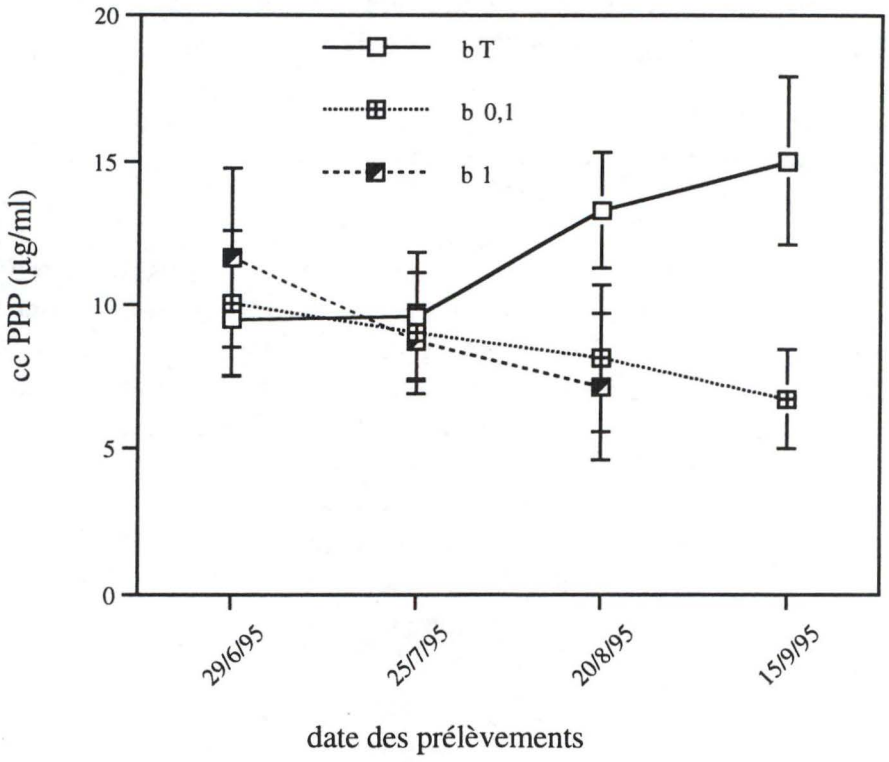


Figure 3.10 : Evolution temporelle du phosphore protéique plasmatique (PPP en µg/ml) chez *O.aureus* femelles témoins et contaminées par de l'atrazine.
les barres verticales = les erreurs standards

Tableau 3.3.1 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du premier prélèvement chez *O. aureus* (femelles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B0,1	B1	ETR	
Morphologiques					
Diamètre des oeufs	1,5	1,5	2,1	6,06	0,23
Poids moyen des ovules (mg)	6,87	6,75	7,42	15,52	0,5
Nombre d'oeufs/kg	6815	6897	6475	91075936,9	0,95
Endocrinologiques					
Testostérone (T)	17,49	16,45	18,67	1211,64	0,96
17β-oestradiol (E2)	10,9	12	11	692,64	0,98
Phosphore protéique plasmatique (PPP)	9,46	10,04	11,63	861,91	0,95

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 1ère prélèvement)
ETR: Ecart-Type Résiduel (√CMR) avec 10 degrés de liberté (T, E2), 9 degrés de liberté (PPP), 15 degrés de liberté (DO, NO, POM).

Tableau 3.3.2 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du deuxième prélèvement chez *O. aureus* (femelles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B0,1	B1	ETR	
Morphologiques					
Diamètre des oeufs	1,74	1,63	1,7	2,05	0,92
Poids moyen des ovules (mg)	6,9	6,7	7,2	35,27	0,88
Nombre d'oeufs/kg	7553	6711	6449	10132958	0,82
Endocrinologiques					
T	18,07	16,41	18,34	136,49	0,86
E2	10,8	10,6	10,2	349,54	0,99
PPP	9,46	10,04	11,63	797,19	0,95

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 2ème prélèvement).

ETR: Ecart-Type Résiduel (√CMR) avec 6 degrés de liberté (T), 8 degrés de liberté (E2), 10 degrés de liberté (PPP), 12 degrés de liberté (NO), 13 degrés de liberté (DO, POM).

Tableau 3.3.3 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du troisième prélèvement chez *O. aureus* (femelles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B0,1	B1	ETR	
Morphologiques					
Diamètre des oeufs	1,92	1,36	1,27	4,42	0,38
Poids moyen des ovules (mg)	6,98	6,75	7,2	8,56	0,83
Nombre d'oeufs/kg	7078	6441	6027	33585930	0,75
Endocrinologiques					
T	18,39	16,06	18,55	71,53	0,7
E2	12,4	10,4	8,3	152,05	0,74
PPP	13,3	8,1	7,1	346,07	0,49

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 3ème prélèvement).
ETR: Ecart-Type Résiduel ($\sqrt{CMR}$) avec 5 degrés de liberté (T, E2), 7 degrés de liberté (PPP), 9 degrés de liberté (DO, NO, POM).

Tableau 3.3.4 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du quatrième prélèvement chez *O. aureus* (femelles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B0,1	B1	ETR	
Morphologiques					
Diamètre des oeufs	2,08	1,26		2,74	0,14
Poids moyen des ovules (mg)	6,88	6,33		35,27	0,88
Nombre d'oeufs/kg	7326	5946		21623919	0,42
Endocrinologiques					
T	18,28	16,07		30,74	0,39
E2	13,59	11,17		20,12	0,26
PPP	14,97	6,72		204,37	0,23

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 4ème prélèvement).

ETR: Ecart-Type Résiduel (√CMR) avec 4 degrés de liberté (T, E2, PPP), 5 degrés de liberté (NO), 6 degrés de liberté (DO, POM).

Tableau 3.3.5 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du premier prélèvement chez *O. aureus* (mâles).

Paramètres	Traitements				
	BT	B0,1	B1	ETR	Effets (P-value)
Mophologiques					
cc Spz	4,5	4,75	5,85	8,07	0,71
Endocrinologiques					
Testostérone (T)	7,7	9,1	7,9	36,32	0,907
11-kétotestostérone (11-KT)	6,6	8,1	8,9	5,3	0,34

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 1er prélèvement).

ETR: Ecart-Type Résiduel ($\sqrt{CMR}$) avec 3 degrés de liberté (T, 11-KT).

Tableau 3.3.6 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du deuxième prélèvement chez *O. aureus* (mâles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B0,1	B1	ET	
Mophologiques					
cc Spz	5,19	5,74	4,85	2,88	0,69
Endocrinologiques					
Testostérone (T)	7,7	9,1	8	15,79	0,84
11-kétotestostérone (11-KT)	6,3	8,4	9	32,8	0,72

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 2ème prélèvement)

ETR: Ecart-Type Résiduel (√CMR) avec 3 degrés de liberté (T, 11-KT).

Tableau 3.3.7 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du troisième prélèvement chez *O. aureus* (mâles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B01	B1	ET	
Mophologiques					
cc Spz	5,3	3,9	4,8	1,85	0,34
Endocrinologiques					
Testostérone (T)	8	8,6	8,3	38,31	0,99
11-kétotestostérone (11-KT)	6,57	8,67	8,84	57,73	0,85

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 3ème prélèvement)

ETR: Ecart-Type Résiduel (√CMR) avec 3 degrés de liberté (T, 11-KT).

Tableau 3.3.8 : Valeurs moyennes des paramètres morphologiques et endocrinologiques et réultats de l'analyse de la variance effectuée au niveau du quatrième prélèvement chez *O. aureus* (mâles).

Paramètres	Traitements				Effets (P-value)
	BT	B0,1	B1	ET	
Mophologiques					
cc Spz	4,9	5	4,7	3,49	0,96
Endocrinologiques					
T	8,54	8,87	8,36	12,23	0,97
11-kétotestostérone (11-KT)	6,4	10,45	8,26	7,84	0,18

Remarque: La moyenne par traitement est présentée pour chaque variable (moyenne au niveau du 4ème prélèvement)

ETR: Ecart-Type Résiduel (√CMR) avec 3 degrés de liberté (T, 11-KT).

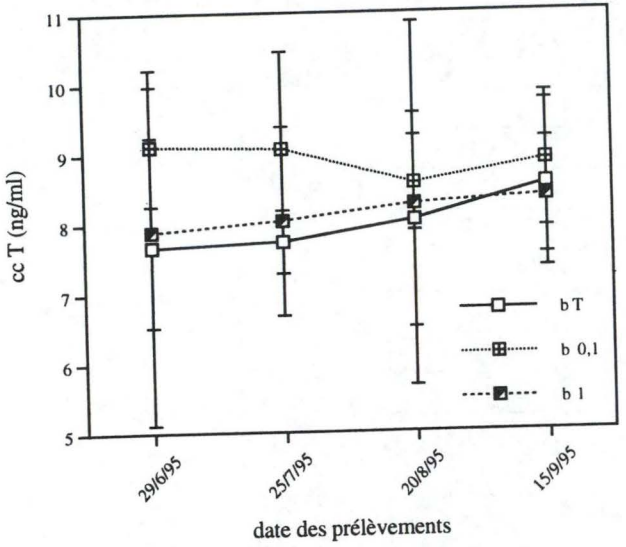


Figure 3.11 : Evolution temporelle de la testostérone (T en ng/ml) chez *O.aureus* mâles témoins et contaminés par de l'atrazine.
les barres verticales = les erreurs standards

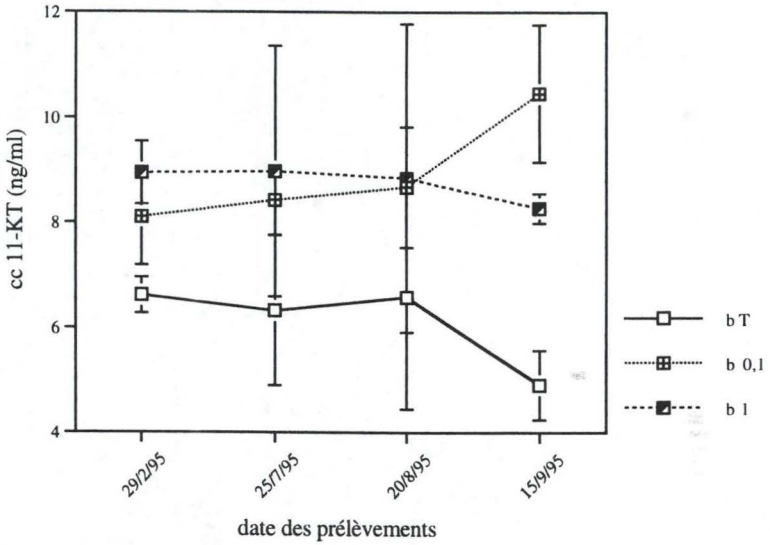


Figure 3.12 : Evolution temporelle de la 11-kétotestostérone (11-KT en ng/ml) chez les *O.aureus* mâles témoins et contaminés par de l'atrazine.
les barres verticales = les erreurs standards

Tableau 3.3.9 : Nombre, motilité et viabilité de spermatozoïdes d'*O. aureus* témoins et contaminés par de l'atrazine (BT = témoin, B0,1 = 0,1 mg/l et B1 = 1 mg/l), (moyenne ± ecart-type).

				Phases de motilité durées cumulées (min)			
Date	Traitements	cc Spz ($x10^9/mm^3$)	Viabilité (%)	TM	MM	L	O
30/6/95	BT	6,1 ± 1,6	96,5 ± 0,71	3	4	5	5,3 ± 2
	B0,1	4,67 ± 1,4	95,5 ± 3,54	2	4	5,5	6,2 ± 2,3
	B1	5,49 ± 0,25	96 ± 1,41	3	3,5	4	4,8 ± 2
26/7/95	BT	5,32 ± 0,25	93 ± 5,6	2	4	5	6,2 ± 1,3
	B0,1	4,74 ± 1,36	93,5 ± 0,71	3	3,5	4	7 ± 2
	B1	6,3 ± 0,2	94 ± 1,41	2	3	4	5,4 ± 2,3
21/8/95	BT	3,27 ± 2	96 ± 1,41	2,5	4	4,5	7± 2
	B0,1	4,78 ± 2,57	95,5 ± 0,71	2	3	4	6,2 ± 1,6
	B1	4,69 ± 2	98 ± 1,41	2	3,5	5	6 ± 2
16/9/95	BT	4,78 ± 2,57	96,5 ± 0,71	2	4	5	7,6 ± 1,5
	B0,1	5,3 ± 1	95 ± 1,41	3	4	5	7 ± 1
	B1	5,4 ± 2	93,5 ± 0,75	2	4	5,5	6 ± 2

TM : spermatozoïdes très mobiles
MM : spermatozoïdes moyennement mobiles
L : spermatozoïdes lents
O : spermatozoïdes oscillants

2. 4. 2. Evolution du taux plasmatique en 11-kétotestostérone

La figure 3.12 montre la variation de la concentration plasmatique en 11-kétotestostérone (11-KT) chez *O.aureus* mâles témoins et contaminés par de l'atrazine. D'après les profils de la figure 3.12, nous pouvons constater qu'il n y a pas de variation significative entre les groupes témoins et les groupes contaminés, excepté lors du dernier prélèvement où la concentration en 11-kT diminue sensiblement chez les poissons du lot témoin.
Une fois de plus, l'analyse statistique (ANOVA 1) ne révèle aucune différence significative entre le groupe témoin, le groupe le moins contaminé et le groupe le plus contaminé ($P \geq 0,18$) (Tableaux 3.3.5- 3.3.8).

2. 5. Effets de l'atrazine sur l'abondance et la qualite des gametes

2. 5. 1. Effets de l'atrazine sur la laitance

Les mâles des différents lots expérimentaux en aquarium ont tous été spermiants durant toute la durée de l'expérience. Nous avons ainsi pu suivre la qualité du sperme (nombre de spermatozoïdes, viabilité et motilité) lors de chaque prélèvement. Les valeurs des paramètres que nous avons mesurés sur le sperme d'*O. aureus* témoins et contaminés sont présentées dans le tableau 3.3.9. L'examen de ce tableau montre que :

- le nombre de spermatozoïdes par mm^3 de laitance ne varie pas significativement par rapport à celui des individus témoins quand la quantité d'atrazine dans l'eau augmente (figure 3.13). Ainsi l'analyse statistique confirme cette observation, indiquant qu'il n'ya pas de variation significative de traitement sur la concentration du sperme entre les deux groupes expérimentaux contaminés et le groupe expérimental témoin ($P \geq 0,34$) (Tableaux 3.3.5-3.3.8).

- les différentes phase de motilité, exprimées de manière cumulée, varient très peu d'un individu à l'autre et d'un groupe à l'autre. Seule la quatrième phase (O), caractérisée par l'oscillation sur place puis la mort, est plus longue pour les spermatozoïdes issus des poissons témoins et les moins contaminés (0,1 mg/l de l'atrazine) mais de manière non significative (figure 3.14).

- la viabilité des spermatozoïdes est en moyenne de 95 % chez les trois groupes lors de chaque prélèvement sans qu'il y ait de différence significative chez les individus contaminés par rapport aux témoins (figure 3.15).

2. 5. 2. Effets de l'atrazine sur la qualité des ovules

2. 5. 2. 1. Effets sur le nombre d'ovules pondus

Le nombre d'ovules pondus (ou fécondité par acte de ponte) est exprimé par rapport au poids vif de la femelle (fécondité relative) afin d'éviter un biais dû à l'âge et à la taille des individus. On note une tendance à la diminution du nombre d'ovules pondus chez les femelles contaminées par de l'atrazine. Cette tendance augmente chez les femelles les plus contaminées (Figure 3.16).

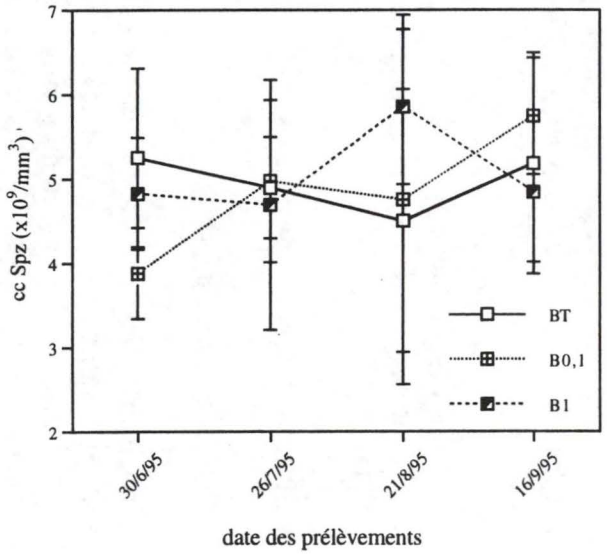


Figure 3.13 : Evolution temporelle de la concentration de spermatozoïdes (x10^9/mm^3) chez les O.aureus mâles témoins et contaminés par de l'atrazine.
Les barres verticales = les écart-types.

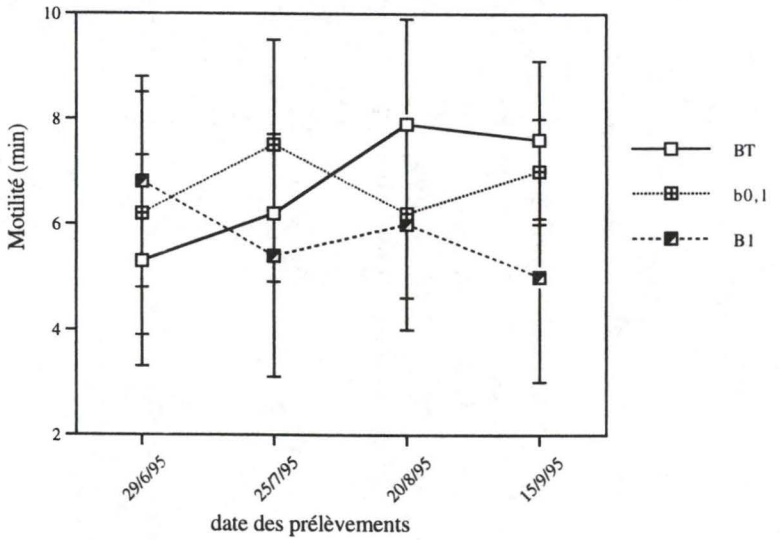


Figure 3.14 : Evolution temporelle de la motilité moyenne des spermatoïdes (en min.)

les barres verticales = les écart-types.

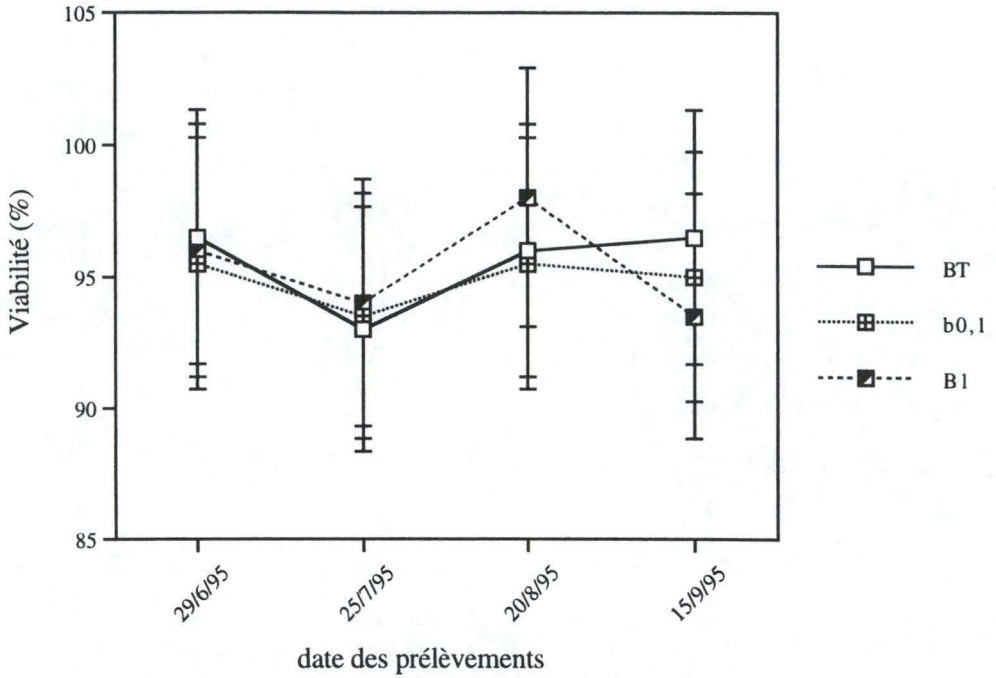


Figure 3.15 : Evolution temporelle de la viabilité moyenne des spermatoïdes (en min.) témoins et contaminées par de l'atrazine.
les barres verticales = les écart-types.

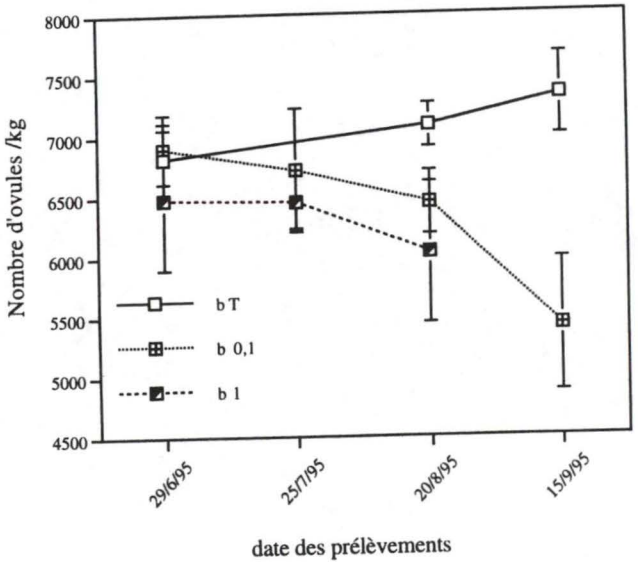


Figure 3.16 : Evolution temporelle du nombre d'ovules par /kg chez *O.aureus* témoins et contaminées par de l'atrazine.
les barres verticales = les écart-types.

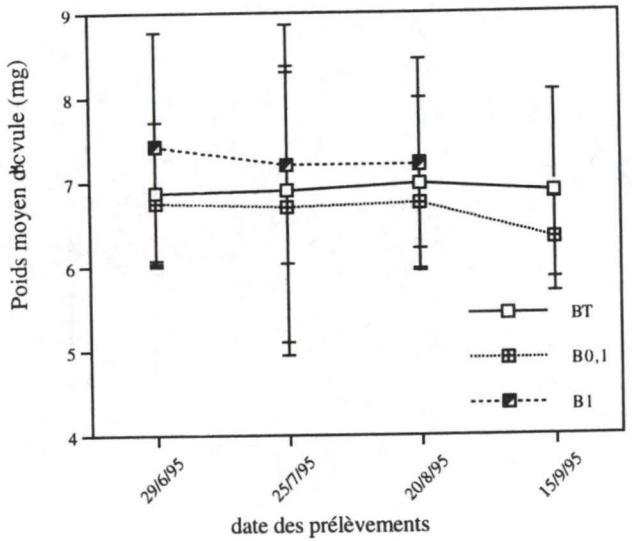


Figure 3.17 : Evolution temporelle du poids moyen des ovules (en mg) chez *O.aureus* témoins et contaminées par de l'atrazine.
les barres verticales = les écart-types.

L'ANOVA 1 ne décèle d'ailleurs aucun effet significatif ($P \geq 0,42$) des traitements sur les concentrations de testostérone chez les tilapias femelles (Tableaux 3.3.1-3.3.4).

2. 5. 2. 2. Effet de l'atrazine sur le poids moyen des ovules

Malgré cette diminution de la fécondité relative des femelles contaminées, on n'observe pas chez elles de variation significative du poids moyen des ovules par rapport à celui des femelles témoins ($P \geq 0,5$) (Figure 3.17; Tableaux 3.3.1-3.3.4).

2. 5. 2. 3. Effet de l'atrazine sur le diamètre moyen des oeufs

Nous observons au début de l'expérience chez les trois groupes expérimentaux un diamètre moyen de 1,5 ± 0,4 à 2,06 ± 0,73 mm (Figure 3.18), suivi par une diminution progressive chez les deux groupes contaminés par de l'atrazine et cette diminution augmente chez le groupe le plus contaminé. Toutefois, l'analyse statistique ne confirme pas le graphe obtenu, en effet, aucune différence significative du diamètre des ovules ($P \geq 0,14$) (Tableaux 3.3.1-3.3.4) n'a pu être mise en évidence entre le groupe témoin et les deux groupes contaminés.

2. 6. Discussion

Les conditions de cette seconde expérience ont été nettement meilleures que celles de l'expérience effectuée avec des goujons, et cela pour diverses raisons : une température stabilisée, idéale pour la reproduction des tilapias, des poissons parfaitement habitués aux conditions artificielles de stockage (poissons de pisciculture élevés en bassins depuis leur naissance), une espèce réputée très tolérante aux manipulations, aux stress, et qui, de plus, se reproduit de façon continue durant une période de reproduction très étalée (et cela d'autant plus que les conditions de vie sont défavorables, ce qui constitue une particularité de la reproduction des tilapias). Malgré ces conditions à priori favorables, nous avons été confrontés à des problèmes quelque peu similaires à ceux rencontrés avec les goujons, avec des conséquences toutefois moins graves que lors de la première expérience. Des problèmes pathologiques sont en effet apparus dans les 3 groupes à la suite de la première manipulation (prélèvement de sang, d'ovules et de sperme). Signalons cependant qu'une amélioration rapide de l'état sanitaire des poissons a été enregistrée dans le lot témoin et le lot B0,1 alors que les traitements thérapeutiques ont été nettement moins efficaces chez les poissons contaminés à la dose supérieure (B1). Il est évident que ces problèmes pathologiques nous obligent à considérer nos données avec une réserve certaine. Sont-ils le reflet d'une contamination excessive en atrazine dans ce groupe? Il nous est impossible de statuer sur cette hypothèse, mais à priori, on peut penser que l'apparition des problèmes pathologiques a été trop rapide pour être provoquée par l'atrazine. La concentration élevée d'atrazine dans le bac b1 peut toutefois avoir limité les capacités de récupération des poissons dans ce bac.

D'après nos résultats, il apparaît que les réponses des gonades aux différents traitements varient peu. Le fait de travailler avec des poissons déjà en reproduction lors du début du traitement constitue évidemment un biais difficile à évaluer. En effet, certains poissons pouvaient se trouver en début de période de reproduction alors que d'autres se

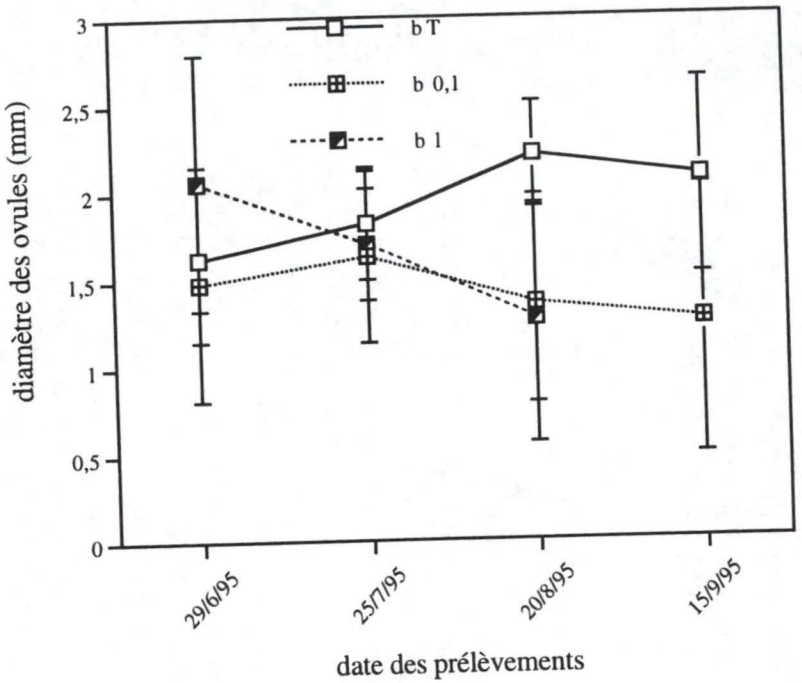


Figure 3.18 : Evolution temporelle du diamètre moyen des ovules (en mm) chez *O.aureus* témoins et contaminées par de l'atrazine.

les barres verticales = les écart-types.

situaient en phase finale. Les différents phases de la gamétogenèse réglées par les stimulations environnementales et endogènes sont très complexes. L'effet du facteur étudié est fortement influencé par l'état de réceptivité de la gonade, qui est lui-même fonction de maturité du poisson. D'après l'analyse endocrinologique des stéroïdes, il apparaît que la contamination des poissons par de l'atrazine ne semble pas avoir un effet néfaste sur la stéroïdogenèse, ni chez les mâles ni chez les femelles. En effet, nous avons obtenu globalement des profils hormonaux présentant des variations plus au moins semblables chez les trois groupes expérimentaux avec une légère diminution de l'E2 (stimulant la synthèse de PPP par le foie) chez les femelles traitées par de l'atrazine. Cette diminution s'est marquée plus nettement chez les poissons les plus contaminés et a entraîné une diminution du contenu plasmatique en phosphore protéique (PPP). La diminution de concentration en PPP, indicateur de la concentration en vitellogénine, pourrait elle-même être responsable de la diminution du diamètre des oeufs chez les poissons de ce groupe. Rappelons que chez les téléostéens femelles, les oestrogènes (surtout le 17β-oestradiol) sécrétés par l'ovaire, stimulent la synthèse par le foie de la vitellogénine qui, transportée par le sang jusqu'à l'ovaire, est à l'origine des constituants vitellins des ovocytes. La diminution du PPP pourrait être la conséquence de la diminution de l'E2 ou d'un effet direct de l'atrazine sur le foie, tel que l'ont montré les travaux de RISBOURG (1992). D'après cet auteur, des modifications structurales hépatocytaires sérieuses ont été observées après une contamination de muge par de l'atrazine aussi bien à 0,025 qu'à 0,17 mg/l d'atrazine, soit à des concentrations similaires ou nettement inférieures à celles utilisées dans notre expérience. Indépendemment du rôle des stéroïdes oestrogéniques, la diminution du diamètre des oeufs pourrait également être expliqué par une altération du foie puisqu'il joue un rôle essentiel dans la croissance des ovocytes via la synthèse des les protéines vitellines. Aucune étude spécifique du foie ne permet toutefois de confirmer cette hypothèse. Il faut toutefois rappeler que les différences de concentrations plasmatiques en E2 et PPP ne sont pas significatives, entre autres à cause de la variabilité importante existant entre des individus appartenant au même lot. En ce qui concerne les niveaux de stéroïdes, cette variabilité individuelle n'est pas rare selon les données de la littérature, de part le caractère pulsatile de la libération des hormones sexuelles au niveau plasmatique. Le fait de travailler avec des poissons à des stades de maturité peut-être différents (ce qui est très difficilement évaluable chez des poissons à ponte continue comme le tilapia) ne peut qu'augmenter la variabilité de concentrations hormonales au sein d'un même lot, limitant de la sorte l'effet traitement.

Le nombre d'oeufs collectés à chaque prélèvement a également diminué chez les poissons contaminés. Ainsi, nos observations évoluent dans le même sens que les résultats obtenues par MACEK (1968), qui a observé que la fécondité absolue chez l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalus*) diminuait quand la quantité de DDT augmente. WANNEMACHER *et al.* (1992) constatent également une réduction du nombre d'oeufs expulsés chez le danio zébré (*Brachidanio rerio*) suite à une intoxication par la Dioxine (2,3,7,8-TCDD). Les valeurs de fécondité relative des femelles témoins utilisées dans nos expériences sont identiques à celles mesurées à la pisciculture expérimentale de l'Université de Liège à Tihange (Mélard, com. pers.). Toutefois on note une tendance à la diminution du nombre d'oeufs pondus chez les femelles traitées par de l'atrazine.

QUATRIEME PARTIE : RESUME ET CONCLUSIONS

L'objectif de ce travail était, rappelons-le, d'étudier l'influence de l'atrazine sur le développement des gonades de cyprinidés, avec une attention particulière sur les profils hormonaux de trois stéroïdes sexuels importants (la testostérone, la 17β-oestradiol, le 11-ketotestostérone) et sur la concentration plasmatique en vitellogénine, cette dernière ayant été déterminée indirectement par dosage du phosphore protéique.

Dans un premier temps, nous avons effectué, dans la littérature existante, une recherche des différents éléments pouvant nous aider à mieux cerner la problématique. Il ressort que :

- Il n'y a pratiquement pas de recherche concernant l'impact des triazines sur la reproduction des poissons afin de comparer nos résultats. Par contre, il existe une littérature abondante concernant d'autres pesticides.
- Généralement, l'exposition à long terme des téléostéens aux pesticides induit une décroissance du rapport gonadosomatique.
- D'après plusieurs auteurs, les pesticides peuvent altérer le cycle reproducteur en agissant à différents niveaux : gamétogenèse, sécrétion gonadotrope hypophysaire, réceptivité des gonades aux stimulations hormonales, etc.
- Les pesticides sont liposolubles et peuvent se concentrer dans les tissus riches en lipides comme l'ovaire et le foie.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une contamination des poissons par deux concentrations distinctes en atrazine, l'une proche de celles mesurées dans l'environnement, l'autre nettement supérieure, le troisième groupe étant le groupe témoin, non contaminé.

Sur chaque groupe, deux types d'effets étaient évalués :

- d'une part, nous avons observé l'évolution de plusieurs paramètres morphologiques (qualité des gamètes) chez les deux groupes contaminés en comparaison avec le groupe témoin;
- d'autre part, nous avons dosé les trois hormones stéroïdes (T, 11-KT et E2) et la vitellogénine au niveau du plasma.

Cet objectif n'a pu être atteint lors de la première expérience. Le fait de transférer des goujons sauvages d'un milieu naturel vers des bassins artificiels nous semble être le principal facteur limitant de cette expérience. La mauvaise adaptation des poissons aux conditions de stockage a certainement engendré un stress chronique, provoquant de profonds bouleversements au niveau du système endocrinien, avec des conséquences inexorables sur l'état de maturité des poissons (atrésie pré-ovulatoire généralisée 3 semaines après le début de l'expérience).

Lors de notre deuxième expérience, au vu de nos résultats, mis à part l'obtention de concentrations en phosphore protéique et en 17β-oestradiol plasmatique légèrement inférieures chez les deux groupes contaminés par rapport au groupe témoin, et la légère diminution du diamètre et du nombre des oeufs chez les même groupes, aucune influence significative des traitements n'a pu être observée. Malheureusement, des problèmes pathologiques sont à nouveau apparus durant cette seconde expérience. Ces problèmes, même s'ils ont été rapidement maîtrisés dans 2 des 3 bassins, ont probablement limité la portée de nos résultats.

Toute étude écotoxicologique nécessite l'utilisation de poissons témoins dans un état sanitaire irréprochable, de manière à éviter les interférences avec le toxique étudié.

Ce travail constitue donc une étude préliminaire sur l'effet potentiel des triazines sur la reproduction des poissons. Le choix du poisson utilisé comme modèle expérimental apparaît primordial, de même que les conditions de stockage des poissons utilisés pour les tests écotoxicologiques. Si le choix se portait à l'avenir sur le goujon (poisson qui présente certains avantages vu sa taille réduite et sa capacité de reproduction multiple), il est important de respecter certaines contraintes. Ainsi, l'utilisation de goujons domestiques, élevés dès l'éclosion ou stockés durant de longues périodes en conditions artificielles, permettrait probablement d'amener progressivement et uniformément les poissons à un stade de maturité désiré, avant d'entamer l'expérience. De plus l'amélioration des conditions de stockage (présence de substrats et végétaux) devrait permettre de mieux reproduire un environnement propice à la reproduction et limiter les réactions essentiellement liées au stress de confinement. A ce niveau, l'utilisation du tilapia, poisson domestique et très rustique, a permis d'obtenir des résultats nettement plus intéressants, même s'ils ne peuvent être considérés comme définitifs.

Une étude plus approfondie des phénomènes associés à la reproduction, tels que la réponse hépatique aux agents toxiques, constitue un domaine d'investigation très intéressant, puisque cet organe est non seulement un centre d'accumulation des toxiques, mais aussi un organe clé dans la synthèse de vitellogénine, et donc dans la maturation des ovocytes. L'effet du toxique aux autres niveaux du contrôle endocrinien (synthèse de GnRH, de GTH) pourrait également être envisagé. Il serait dès lors intéressant de démarrer les contaminations lorsque les poissons se situent en début de recrudescence gonadale, puisqu'il a été montré que l'effet majeur des polluants concerne surtout la multiplication des cellules germinales et le début de la croissance ovocytaire, plus que la phase finale de maturation elle-même. Enfin, le dosage de l'atrazine dans les différents organes concernés (ovaire, foie, etc.) est également recommandé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AGARWAL D.K., (1978) Effect of endosulfan on drug metabolizing enzymes and lipid peroxydation in rat. J. Environ Sci. Health, **C13**(1), 49-62.

ANSARI, B. A. and KUMAR, K. (1987) Malathion toxicity: Effect on the ovary of the zebra fish brachydanio rerio (Cyprinide). Int. Rev. ges. Hydrobiol. **72**, 517-528.

ARORA, N. and KULSHRESTHA, S. K. (1984) Comparison of the toxic effects of two pesticides on the testes of a fresh water teleost. Channa striatus Bl. Acta Hydrochim Hydrobiol. **12**, 435-441.

BERTICHAMPS C. et SAVOIR R., (1993) Exemples de Micropollutions de la Meuse en amont de Namur. D. G. -Laboratoire, Chaussée de Waterloo 764, 1180 Bruxelles.

BELAMIE, R. & GIROUD, S. (1986). Aperçu des pollutions liées à l'utilisation des pesticides par l'agriculture en France . pp. 2-31. CEMAGREF.

BIAGIANTI S. and RISBOURG, (1992) Interet (ECO) toxicologique d'une approche histo-cytologique pour la compréhension des réponses hépatiques de mugilides (téleosteens) à des contaminations sub-aigues par l'atrazine. Ichtyophysiologica Acta, **15**, 205-223.

BILLARD, R. and KINKELN, P. (1970) Stérilisation des testicules de guppies par des doses non létales de parathion. Ann. Hydrobiol. **1**, 91-99.

BOURRE J.M., (1988) Radicaux libres, acides gras polyinsaturés, mort cellulaire, vieillissement cérébral. C.R. Soc. Biol, **182**, 5-36.

BRUSLE S., (1982) Contribution à la connaissance de la sexsualité de poissons téléostéens marins gonochoriques (Mugilidés) et hermaphrodites (serranidés). Thèse d'Etat, Université de Perpignan, 288pp.

Brusle J., Sicard-Brusle S., (1992) Les gonades utilisées comme organes-cibles en écotoxicologie: Effets divers toxiques sur les cellules germinales et somatiques des vertébres et en particulier de poissons. Ichtyophysiologica Acta, **15**, 175-204.

BUDIMIR M., ELEZOVIC I., KARAN V. and NESKOVIC N. (1987). Akutni i subakitni toksicni efekti pesticida za ribe. Jugoslovensko savetovanje o primeni pesticida, Opatija. Abstrakt: Glasnik zastite bilja, **10-11**, pp. 406-407.

BURDICK, G. E., DEAN, H. J., HARRIS, E. J., SKEA, J., KARCHER, R. and FRISA, C. (1972) Effect of rate and duration of feeding DDT on the reproduction of salmonid fishes reared and held under controlled conditions. NY Fish Game J. **19**, 97-115.

CABANE F.,(1977). Recherche documentaire sur les lésions externes des Poissons. COB/RNO/262-CNEXO, 1-31.

CARRAGHER J.F., SUMPTER J.P.,Pottinger T.G. and PICKERING A.D., (1989). The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, Salmo trutta L., and Salmo gairdneri Richardson. Gen. Comp. Endocrinol, **76**, 310-321.

CHOUDHURY, C. ,RAY, A. K. , BHATTACHARYA, S .and BHATTACHARYA, S.(1993) Non lethal concentrations of pesticide impair ovarian function in the freshwater perch, Anabas testudineus. Environ. Bio. Fishes 36, 319-324.

COPE, O. B., WOOD, E. M. and WALLEN, G. H. (1970) Some chronic effects of 2,4-D on the bluegill (Lepomis macrochirus). Trans. Am. Fish. Soc. **99**, 1-12.

COWEY C.B. and SARGENT J.R., (1977) Lipid nutrition in fish. Comp.Biochem.Physiol., **57 B**, 269-273.

CURTIS, L. R. and BEYERS, R. J. (1978) Inhibition of oviposition in the teleost Oryzias latipes, induced by subacute kepone exposure. Comp. Biochem. Physiol. **61C**, 15-16.

CROSS, J. N. and HOSE, J. E. (1988) Evidence for impaired reproduction in white croaker (Genyonemus lineatus) from contaminated areas off southern California. Mar. Environ. Res. **24**, 185-188.

DA COSTA, H. and RUBY, S. M. (1984) The effect of sublethal cyanide on vitellogenic parameters in rainbow trout Salmo gairdneri. Arch. Contam. Toxicol. **13**, 101-104.

DE QUIROS F.B., (1978). Sobre la toxicidad del cumaclor tecnico y del tomorin en Gambusia affinis. Bol. R Soc. Esp. Hist. Nat., **76**, 109-121.

DONATO A., (1981) Lipid perixidation, cross-linking reactions, and aging. In « Age pigments », Sohal R.S. ed, Amsterdam, Elsevier, Biochemical Press, 63-81.

FABACHER D.L., (1982) Hepatic microsomes from freshwater fish. I-In vitrocytochrome P450 chemical interactions. Comp.Biochem.Physiol., **73 C**, 277-283.

GHOSH, P., BHATTACHARYA, S. and BHATTACHARYA, S. (1990) Impairment of the regulation of gonadal fuction in Channa punctatus by Metacid-50 and Carbaryl under laboratory and field conditions. Biomed. Environ. Sci. **3**, 106-112.

GLUTH G. and HANKEN W., (1984). A comparaison of physiological changes in carp, Cyprinus carpio, induced by several polllutants at sublethal concentration. II-The dependency on the temperature. Comp. Biochem. Physiol., **79C**, 39-45.

GOODMAN, L. R., HANSEN, D. J., MANNING, C. S. and FAAS, L. F. (1982) Effects of Kepone on the sheepshead minnow in an entire life-cycle toxicity test. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **11**, 335-342.

GUNKEL G., (1981) Bioaccumulation of a herbicide (atrazine, s-triazine) in the whitefish (Coregonus fera J.): Uptake and distribution of the residue in fish. Arch. Hydrobiol. suppl., **59**, 252-287.

HAIDER,and UPADHYAYA, N.(1985) Effect of commercial formulation of four organophosphorus insecticides on the ovaries of a freshwater teleost, Mystus vittatus (Blosh) -A histological and histochemical study. J. Environ. Sci. Health. B20,321,340

HAIDER, S. and UPADHYAYA, N. (1986) Effect of commercial formulation of four organophosphorus insecticides on the LH-induced germinal vesicle breakdown in the oocytes of a freshwater teleost, Mystus vittatus (Bloch) -a preliminary in vitro study. Ecotoxicol. Environ. Safety **12**, 161-165.

HAIDER & INBARAj (1988). In vitro effect of malathion and endosulfan on the LH-induced oocyte maturation in the common carpe, Cyprinus carpio (L). Water, Air soil Poll. 39,27-31.

HALLENBECK, W.H. & K . M. CUNNINGHAM-BURNS. 1985.
Pesticides and human health . New York : Springer - Verlag.

HAYES, W.J. and E.R. LAWS (ed.). 1990. Handbook of Pesticides Toxicology, vol. 3, Classe of Pesticides. Academic press, inc. , NY.

HINTON D.E., KLAUNIG J.E. and LIPSKY M.M., (1978) PCB-induced alterations in Teleost liver : a model for environmental disease in fish. Marine Fish Review, **40**, 47-50.

HOCHMAN L., PENAZ M; and PROKES M., (1974). The volume of milt, quantity and quality of sperm in Coregonus pollan from pond culture. Zool. Listy **19**: 367-380.

HOSE, J. E., CROSS, J. N., SMITH, S. G. and DIEHL, D. (1989) Reproductive impairement in a fish inhabiting a contaminated coastal environment off southern California. Environ. Poll. **57**, 139-148.

HUBER W. (1992). Limnische Modellsysteme und Freilanduntersuchungen, Modellökosysteme. In H. Becker, F. Döpke, E Dorn, R. Heitefub, B. Holschulte and H. Köpp, eds., Beurteilung von Pflanzenschutzmitteln in Aquatischen Ökosystemen. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 119-133.

HUGLA, J.L., (1993) Dynamique de Transfert des Biphenyles Polychlores (PCB(chez le Barbeau (Barbus barbus) et analyse des risques écotoxicologiques pour les populations naturelles : incidence sur la reproduction et les fonctions hépatiques. Dissertation présentée à la faculté pour l'obtention du grade de docteur en sciences, Université de Liège, Laboratoires de Morphologie, Systématique et Ecologie animales.197p.(***)

KAPUR, K., KAMALDEEP, K. and TOOR, H . S. (1978) the effect of fenitrothion on reproduction of teleost fish, Cyprius carpio communis Linn.: A biochemical study. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 20, 438-442.

KESTEMONT P., (1988). Etude des potentialités d'élevage intensif du goujon, Gobio gobio, L. Reproduction et croissance larvaire. Dissertation presentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences, Facultés Universitaires Notre-Dame de la paix, Namur, 233p.

KESTEMONT P., (1990). Dynamic aspect of ovogenesis in an asynchronous fish, The gudgeon Gobio gobio L. (Teleostei, Cyprinidae), under controlled temperature and photoperiod conditions. Aquat. Living Resour., **3**, 61-74.

KIME, D. E. , VINSON , G. P. W . and KILPATRICK, R. (1980) Adrenal-gonad relationships. In Chester Jones, I. and Henderson , I. W. eds. General, comparative and clinical endocrinology of the adrenal cortex Vol. 3, New York & London: Academic Press, pp. 183-264.

KIME, D E. ,SCOTT,A. P. and Canario, A. V. M. (1992) In vitro biosynthesis of steroid, including 11-deoxycortisol and 5♋-pregnane-3♌, 7♋,17,20♌-tetrol, by ovaries of the goldfish Carassius auratus during the stage of oocyte finalmaturation. Gen. Comp. Endocrinol. 87, 375-384.

KIME D.E., (1995). The effects of pollution on reproduction in fish. Reviews in fish and fisheries, **5**, 52-96.

LAL, B. and SINGH, T. P. (1987) The effect of malathion and γ-BHC on the lipid metabolism in relation to reproduction in the tropical teleost, Clarias batrachus. Environ. Poll. **48**, 37-47.

LAUWERYS R.,(1990). Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, edition MASSON.

LEGER C. and FREMONT L., (1981) Métabolisme des acides gras et des lipides neutres. In: »Nutrition des poissons ». Actes Coll. C.N.E.R.N.A., CNRS ed., 215-247.

LOWE-MCCONNELL R.H.,1982. Tilapia in fish communities.
In: The biology and culture of tilapia, R.S.V. Pullin and R. H. Lowe-Mcconnell Eds., ICLARM cont. Proc., 7,83-113.

MACEK K.J., (1968). Reproduction in brook trout (Salveinus fontinalis) fed sublethal concentrations of DDT. J. Fish. Res. Bd. Can., **25**: 1787-1796.

MAEMURA S. and OMURA T., (1983) Drug oxidizing mono-oxygenase system in liver microsomes of goldfish (Carassius auratus). Comp.Biochem.Physiol., **76 C**, 45-51.

MILLER, R. R., and al. (1989) Extinctions of North American fishes during the past century. Fisheries **14** : 22-38.

MONOD, G. (1985) Egg mortality of Lake Geneva Charr (Salvelinus alpinus L.) contaminated by PCB and DDT derivatives. Bull Environ. Contam. Toxicol. **35**, 531-536.

MORELAND D.E. and HILL K.L., (1559), J. Agric. Food Chem., 7, 832. Cité dans FEDTKE C., Biochemistry and physiology of herbicide action, Springer Verlag, Berlin, 1982.

MUUS , B.J. & DAHLSTRÖM, P., 1991. Guide des poissons d'eau douces et pêche. Eds Delachaux et Niestlé, Suisse, 224 p.

NESKO K. NESKOVIC and al, (1993) Acute and Subacute Toxicity of Atrazine to Carp (Cyprinus carpio L.), Ecotoxicology and Environmental Safety, **25**, 173-182.

PANDEY, A. K. and SHUKLA, L. (1982) Effect of an organophosphorus insecticide malathion on the testicular histophysiology in Sarotherodon mossambicus. Nat. Acad. Sci. Letters, **5**, 141-143.

PHILIPPART, J. C. and M. VRANKEN. (1983) Protégeons nos poissons. Collection « Animaux menacés en Wallonie. » Ducolot, Gembloux, Belgique. 206p.

PHILIPPART, J.C. & VRANKEN, M., 1982. Goujon, Gobio Gobio (Linnaeus,1758). In : les poissons menacés de disparition de Wallonie, Ed Duculot-Région Wallone, pp. 173-182.

PICKERING, A. D (1981) Stress and fish. London: Academic Press. 368. pp.

PICKERING A.D., POTTINGER T.G., CARRAGHER J. and SUMPTER J.P., (1987). The effect of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout . Gen. Comp. Endocrinol., **68**, 249-259.

RAM, R. J. and SATHYANESAN, A. G. (1983) Effect of mercuric chloride on the reproductive cycle of the teleostean fish Channa punctatus. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **30**, 24-27.

RAM, R. J. and SATHYANESAN, A. G. (1986) Effects of long-term exposure to Cythion on the reproduction of the teleost fish, Channa punctatus (Bloch). Environ. Ecol. **44**, 49-60.

RAM, R. J. and SATHYANESAN, A. G. (1987) Effects of a mercurial fungicide on the gonadal development of the teleostean fish, Channa punctatus (Bloch). Environ. Ecol. **11**, 352-360.

RASSTOGI A. and KULSHRESTHA S.K. (1990). Effect of sublethal doses of three pesticides on the ovary of a carp minnow Rasbora daniconius. Bull. env. Contam. Toxicol., **45**, 742-747.

RINCHARD J. and al, (1993). Seasonal changes in plasma levels of steoid hormones in an asynchronous fish the gudgeon Gobio gobio L. (Teleostei, Cyprinidae). Gen. Comp. Endocrinol., **92** , 168-178.

ROJIK I., NEMCSOK J. and BOROSS L., (1983) Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. Acta.Biol.Hungarica, **34** (1), 81-92.

Ruby, S. M., Idler, D. R. and So, Y. P. (1986) The effect of sublethal cyanide exposure on plasma vitellogenin levels in rainbow trout (Salmo gairdneri) during early vitellogenesis. Arch. Contam. Toxicol. **15**, 603-607.

RUWET JC & AL (1975). biologie et élevage des tilapias. Symposium FAO/CPCA sur l'aquaculture en Afrique,Accra, Ghana, 30 séptembre au 6 octobre 1975,27 p.

SADHU, A. R. and MUKHOPADHYAY, P. K. (1985) Comparative effect of two pesticides malathion and carbouran on testes of Clarias batrachus (Linn). J. Environ. Biol. 6, 217-222.

SANGALANG, G. B. and FREEMAN, H. C. and CROWELL, R. (1981) testicular abnormalities in cod (Gadus morhua) fed Arochlor 1254. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **10**, 617-626.

SAXENA, P. K. and MANI, K. (1985) Quantitative study of testicular recrudescence in the fresh water teleost, Channa punctatus (Bl.) exposed to pesticides. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **34**, 597-607.

SAXENA, P. K. and MANI, K. (1987) Effect of safe concentrations of some pesticides testicular recrudescence in the fresh water murrel, Channa punctatus (Bl.): a morphological study. Ecotoxicol. Environ. Safety **14**, 56-63.

SCHOOR W.P. and COUCH J.A., (1979) Correlation of mixed-function oxidase activity with ultrastructural changes in the liver of a marine fish. Cancer Biochem.Biophys., **4**, 95-103.

SHUKLA, J. P. and PANDEY, K. (1984a) Arsenic induced structural changes during the ovarian cycle of a freshwater perch, Colisa fasciatus (Bloch and Schneider). Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica, **23**, 69-74.

SHUKLA, J. P. and PANDEY, K. (1984b) Impaired spermatogenesis in arsenic treated freshwater fish, Colisa fasciatus (Bloch and Schneider). Toxicol. Lett. **21**, 191-195.

SHUKLA, J. P. and PANDEY, K. (1984c) Arseni induced cellular and biochemical changes during the testicular cycle of a freshwater perch, Colisa fasciatus (Bloch and Schneider). Cell. Mol. Biol. **30**, 227-231.

SHUKLA, J. P. and PANDEY, K. (1984d) Carbamide induced histological alterations during the diffrent phases of the testicular cycle of a freshwater perch, Colisa fasciatus (Bloch and Schneider). Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica, **23**, 181-186.

SHUKLA, J. P. and PANDEY, K. (1984e) Effects of three insecticides on the histoarchitechture of pituitary gland in Sarotherodon mossambicus. Uttar Pradesh J. Zool. 4, 201-204.

SHUKLA, J. P. and PANDEY, K. (1985) Ovarian recrudescence in a freshwater teleost, Sarotherodon mossambicus in DDT treatment and pattern of recoupment. J. Environ. Biol. **6**, 195-204.

SHUKLA, J. P. and PANDEY, K. (1986) Effects of endosulphan on the hypothalamohypophysial complex and fish reproductive physiology. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **36**, 122-131.

SINGH H. and SINGH T.P. (1981). Effect of parathion and aldrin on survival, ovarian 32P-uptake and gonadotrophic potency in a freshwater catfish, Heteropneustes fossilis (Bloch). Endokrinologie **77**, 173-178.

SINGH, H. and Singh, T. P. (1982a) Effects of some pesticides on fish repoduction. Ichthyologia 15, 71-**81**.

SINGH, H. and SINGH, T. P. (1982b) Effect of some pesticides on hypothalamo-hypophyseal-ovarian axis in the freshwater catfish Heteropneustes fossilis (Bloch). Environ. Poll. **27A**, 283-288.

SINGH S. and SINGH T.P., (1987b). Evaluation of toxicity limit and sex hormone production in response to Cythion and BHC in the vitellogenic catfish Clarias batrachus. Env. Res., **42**, 482-488.

SINGH, H. (1989) Interacion of xenobiotics with reproductive endocrine functions in a progynous teleost, Monopterus albus. Mar. Environ. Res. 28, 285-289.

SINGH, P. B. and SINGH, T. P. (1991) Impact of y-BHC on sex steroid levels and their modulatoion by ovine luteinizing hormone-releasing hormone and Mystus gonadotropin in the freshwater catfish, Heteropneustes fossilis. Aquat. Toxicol. 21,93-102.

SINGH, P. B. and SINGH, T. P. (1992a) Modulatory actions of ovine luteinizing hormone-releasing hormone and Mystus gonadotropin on γ-BHC-incduced changes in lipid levels in the freshwater catfish, Heteropneustes fossilis. Ecotoxicol. Environ. Safety. **24**, 192-202.

SINGH P.B., KIME D.E. and SINGH T.P., (1993). Modulatory actions of Mystus gonadotropin on γ-BHC-induced histological changes, cholesterol, and sex steroid levels in Heteropneustes fossilis. Ecotoxicol. Env. Safety, **25**, 141-153.

SINGH P.B., KIME D.E. , EPLER P. and CHYB J., (1994). Impact of γ-hexachlorocyclohexane exposure on plasma gonadotropin levels and in vitro stimulation of gonadal steroid production by carp hypophyseal homogenate in Carassius auratus. J. Fish. Biol., **44**, 195-204.

SMITH & COLE.(1973) Effects off egg concentration of DDT and dieldrin on development in winter flounder (Pseudopleuronectes americanus). J. Fish. Res. Bd Can. 30,1894-8.

SOLANGI M.A. and OVERSTREET R.M., (1982) Histopathological changes in two estuarine fishes, Menidia beryllina (Cope) and Trinectes maculatus (Bloch and Schneider), exposed to crude oil and the water-soluble fractions. J. Fish Dis., **5**, 13-35.

SPILLMAN, C.J., 1961 . Faune de France. 65 poissons d'eau douces. Eds Lechevalier P., Paris , 303p.

STEGEMAN J.J., (1978) Influence of environmental contamination on cytochrome P-450 mixed function oxygenases in fish; implications for recovery in the wild harbor march. J. Fish.Res.Bd.Can., **35**, 668-674.

STOCK, J. N. and COPE, O. B. (1969) Some effects of TEPA, an insect chemosterilant, on the guppy, Poecilia reticulata. Trans. Am. Fish. Soc. **2**, 280-287.

SUKUMAR, A. and KARPAGAGANAPATHY, P.R. (1992) Pesticide-induced astresia in ovary of a freshwater fish, Colisa ialia (Hamilton-Buchanan). Bull. Environ. Contam. Toxicol. **48**, 457-462.

TAM, W. H. and PAYSON, P. D. (1986) Effects of chronic exposure to sublethal pH on growth, egg production, and ovulation in brook trout, Salvelinus fontinalis. Can. J. Fish. Aquat. Sci. **43**, 275-280.

THOMAS J.A., KORACH K.S. and MCLACHLAN J.A. (eds) (1985). Endocrine toxicology. New York : Raven Press. 404 pp.

THOMAS P.,(1988). Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. Mar. Environ. Res., **24**, 179-183.

THOMAS P,(1989). Aroclor 1254 and cadmium on reproductive endocrine function and ovarian growth in Atlantic croaker. Mar. Environ. Res., **28**, 499-503.

VON WESTERNHAGEN H., DETHLEFSEN V., CAMERON P. and JANSSEN D., (1987). Chlorinated hydrocarbon residues in gonads of marine fish and effects of reproduction. Sarsia **72**, 419-422.

WANNEMACHER R., REBSTOCK A., KULZER E., SCHRENK D. and BOCK K.W., (1992). Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on reproduction and oogenesis in zebrafish (Brachydanio rerio). Chemosphere **24(9)**: 1361-1368.

WESTER P.W., J.H. CANTON et A. BISSCHOP, (1985). Histopathological study of Poecilia reticulata (guppy) after long-term B-Hexachlorocyclohexane exposure. Aquatic Toxicol., **6**, 271-296.

WESTER P.W., (1991). Histopathological effects of environmental pollutants β-HCH and methyl-mercury on reproductive organs in freshwater fish. Comp. Biochem. Physiol., **100C**, 237-239.

YARBROUGH J.D., COONS L.B., (1975) A comparative cytological study between hepatocytes of insecticide-resistant and susceptible mosquitifish (Gambusia affinis). Chem.Biol.Interactions, **10**, 247-254.

YASUNO & AL (1980) Effects on reproduction in the guppy (Poecilia reticulata) under chronic exposure to temephos and fenitrothion. Bull. env. Contam. Toxicol. 25, 29-33.

ANNEXES

PESTICIDES	FORMULE CHIMIQUE
groupe des organochlorés **. DDT**	1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) éthane
. ALDRIN	1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-exo-1,4-endo-5,8-diméthanonaphthalène
. DIELDRIN	1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-époxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-endo-exo-5,8-diméthanonaphthalène
. γ-BHC	1α,2α,3β,4α,5α,6β-hexachlorocyclohexane
. HEXADRIN	1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-endo-endo-5,8-diméthanonaphthalène
. BIPHENYLES POLYCHLORES **(PCB) .(AROCHLOR)**	2,2',6,6':positions ortho;3,3',5,5':positions méta;4,4':positions
. KEPONE	1,1a,3,3a,4,5,5a,6-decachloroctahydro-1,3,4-metheno-2H-cyclobuta (cd)pentalen-2-one.
Groupe des ORGANOPHOSPHORES	
ENDOSULFANE	6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzadioxathiepin-3-oxide.
MALATHION	S-1,2-di (ethoxycarbonyl)ethyldimethyl phosphorothiolothionate.
PARATHION	O,O-diethyl-O-p-nitrophenyl phosphorothionate.
PHOSDRIN	2-methoxycarbonyl-1-methylvinyldimethyl phosphate
GARDONA	2-chloro-1-(2,4,5-trichlorophenyl) vinyldimethyl phosphate
FENITROTHION	O,O-dimethyl-o-(4-nitro-m-tolyl)phosphorothioate.
ELSAN	Ethoxycarbonylbenzyldimethyl phosphorodithioate.
CYTHION	O,O- dimethylphosphorodithioate of diethylmercapto succinate
METACIDE 50 =**PARAMAR** M50	O,O-dimethyl O-p-nitrophenyl phosphorothioate
QUINALPHOS	O,O-diethyl-O-quinoxanilyl(2)-thionophosphate.
TEPA	Tris(1-arizidinyl) phosphine oxide.
BIRLANE	2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)vinyl diethyl phosphate.
Groupe des CARBAMATES	
CARBARYL	n-methyl naphthyl-1-carbamate.
CARBOFURANE	2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7ylmethyl carbonate.

Annexe 1 : Pesticides et leurs formules chimiques.

Annexe 2 :

+ Tampon phosphate
  1,2 g/l NaH_2PO_4 (0,01M) anhydre
  1,42 g/l Na_2HPO_4 (0,01M) anhydre
  9 g/l de NaCl
  Ajuster le pH à 7,25 avec NaOH 2N

+ Tampon phosphate gelatine
  ajouter au tampon phosphate 1g/l de gelatine

+ Polyéthylèneglycol 25%
  25 g de polyéthylèneglycol
  75 ml de tampon phosphate sans gelatine

Annexe 3 :

+ Solution de chloroforme-éther-éthanol (1:2:2)

+ Solution d'isobutanol-toluol (1:1)

+ Solution de silicotungstate
  1,425 g de silicate de sodium $9H_2O$
  14,85 g de tungstate de sodium $2H_2O$
  3,75 ml d'H_2SO_4 cc
  125 ml d'H_2O distillée
  Faire bouillir 5 heures à reflux avant de porter le volume de la solution filtrée à 250 ml (avec de l'eau distillée).

+ Réactif de molybdate
  12,5 g de molybdate d'ammonium
  100 ml d'H_2SO_4 10N
  dans 250 ml d'eau distillée

+ Solution d'H_2SO_4-éthanol
  20 ml H_2SO_4 cc
  980 ml d'éthanol 99,5%

+ Solution stock de chlorure d'étain
  10 g de chlorure d'étain $2H_2O$
  dans 25 ml d'HCl cc

+ Solution de chlorure d'étain dilué
  250 µl de la solution stock
  dans 50 ml d'H_2SO_4 1N

<u>Annexe 4</u> : Ensemble des résultats individuels obtenus à chaque prélèvement chez *les Goujons* mâles et femelles.

L(cm) = La longueur totale du poisson.
P(g) = Le poids total du poisson.
G(g) = Le poids des gonades.
RGS (%) = Le rapport gonadosomatique en pourcentage.
cc T (ng/ml) = La concentration plasmatique en Testostérone.
cc 11-KT (ng/ml) = La concentration plasmatique en 11- Kétotestostérone.
cc E2 (ng/ml) = La concentration plasmatique en 17β-Oestradiol.
cc PPP (µg/ml) = La concentration plasmatique en Phosphore protéique.

Expérience 1 goujon (Gobio gobio)									
N°	Sexe	L (cm)	P (g)	G (g)	RGS (%)	cc T (ng/ml)	cc 11-KT (ng/ml)	cc E2 (ng/ml)	cc PPP (µg/ml)
	premier prélèvement 24/4/95								
1	f	14,8	28,1	2,11	7,52	1,23		0,62	0,24
2	f	16	35,6	3,38	9,48	4,05		1,98	0,22
3	f	15	29,5	1,94	6,58	1,07		0,57	1,89
4	f	15	32,7	2,94	8,99	0,25		-	1,71
5	f	14,8	27,3	1,89	6,92	0,439		3,41	3,82
6	m	16,1	38	0,31	0,88	0,584	4,204		
7	m	15,5	34,9	0,45	1,17	0,402	3,736		
8	m	17,3	45,7	0,65	1,41	4,178	5,394		
9	m	15,1	30,3	0,29	0,97	1,164	2,4		
10	m	15,5	32,5	0,36	1,12	1,562	-		
	deuxième prélèvement 15/5/95								
11	f	16	35,7	1,03	2,88	0,136		0,04	0,4
12	f	14,5	23,8	1,06	4,47	0,147		0,03	0,255
13	f	15,8	31,6	1,74	5,52	0,201		0,36	0,82
14	f	14,5	28	0,81	2,9			0,18	-
15	f	15,5	29	0,78	2,69	0,251		0,5	0,03
16	m	15	32,3	0,24	0,74		0,962		
17	m	14,5	24,1	0,11	0,45	0,063	0,698		
18	m	16	37,8	0,45	1,19	0,95	1,02		
19	m	14,5	28	0,32	1,13	0,76	0,674		
20	m	15,8	25,2	0,08	0,34	0,02			
21	f	14,8	29,1	1,05	3,61	0,195		0,02	0,71
22	f	16	32	0,84	2,62	0,101		0,08	-
23	f	15	27,3	0,6	2,19	0,025		-	0,3
24	f	15	25,8	1,02	3,97	-		0,4	0,61
25	f	15,4	29	1,67	5,75	0,098		0,03	0,03
26	m	15,5	30,5	0,12	0,41	-	0,962		
27	m	16,4	35	0,17	0,47	0,023	0723		
28	m	14,5	25,6	0,1	0,4	0,014	0629		
29	m	15,5	32,3	0,08	0,26	0,98	0,947		
30	m	15,5	31,6	0,16	0,51	1,02	4,216		
31	f	14,4	22,3	0,42	1,87	-		-	0,0766
32	f	15,8	32,9	1,30	3,95	0,212		0,01	0,052
33	f	15,2	30	0,98	3,27	0,043		0,13	1,17
34	f	15	28,3	2,56	9,04	0,67		0,19	-
35	f	15,5	30	1,08	3,59	-		0,25	0,076
36	m	14,5	25,2	0,11	0,44	1,02	0,231		
37	m	15	27,3	0,16	0,58	0,05	1,087		
38	m	15	27,1	0,11	0,4	0,85	-		
39	m	15	27,6	0,17	0,61	-	1,604		
40	m	14,2	22,2	0,38	1,73	-	2,5		

Remarque : (-) = le dosage n'a pas pu être réalisé (Plasma insuffisant).

<u>Annexe 5</u> : Ensemble des résultats individuels obtenus à chaque prélèvement chez *les O, aureus* mâles et femelles.

L(cm) = La longueur totale du poisson.
P(g) = Le poids total du poisson.
RGS (%) = Le rapport gonadosomatique en pourcentage.
cc T (ng/ml) = La concentration plasmatique en Testostérone.
cc 11-KT (ng/ml) = La concentration plasmatique en 11- Kétotestostérone.
cc E2 (ng/ml) = La concentration plasmatique en 17β-Oestradiol.
cc PPP (µg/ml) = La concentration plasmatique en Phosphore protéique.
PO (g) = Le poids des oeufs pondus.
PMO (mg) = Le poids moyen des ovules.
DO (mm) = Le diamètre moyen des ovules.
NOT /f =Le nombre total des oeufs pondus par femelle.
NO /kg =Le nombre des oeufs pondus par kilogramme.

Expérience 2 Tilapia (O, aureus)			premier prélèvement (29/6/95)									
N°	Sexe	L (cm)	P (g)	cc T ng/ml	cc 11-KT ng/ml	cc E2 ng/ml	CC PPP µg/ml	PO (g)	PMO (mg)	DO (mm)	NOT /f	NO /kg
	Bac témoin											
1	f	19	143,7	36,67		23,54	22,59	8,5	7,6	1,62	1118,42	7821,13
2	f	19,2	140,8	7,68		11,25	1,69	9,84	7,5	1,49	1312,0	9371,43
3	f	23	266,2	-		6,08	-	8,57	6,8	1,54	1260,29	4737,95
4	f	21,4	174,5	5,58		-	17,29	7,95	5,9	2,3	1347,46	7744,01
5	f	21	191,6	9,11		1,57	3,18	8,5	7,6	1,22	1118,42	5855,61
6	f	26	308	28,4		12,25	2,56	9,57	5,8	0,89	1650,00	5357,14
7	m	27,9	464	11,27	7,09							
8	m	27	380	4,06	6,12							
	Bac0,1											
9	f	10,4	153,4	-		8,58	22,98	9,03	5,9	0,59	1530,51	9977,24
10	f	22,3	245,3	13,58		15,83	0,26	8,47	6,9	1,23	1127,54	5010,35
11	f	21,5	195,1	27,09		-	12,72	8,5	7,5	1,25	1133,33	5808,99
12	f	19,6	155,9	-		1,5	-	6,74	5,9	2	1142,37	7327,6
13	f	19,4	145,5	15,82		22,1	4,21	7,24	7,2	2,5	1005,56	6911,03
14	f	0,5	180,5	9,32		-	-	8,59	7,5	1,28	1145,33	6345,34
15	m	26,7	445	7,9	6,8							
16	m	25,9	378	10,32	9,4							
	Bac1											
17	f	22,2	226,2	15,39		10,45	10,12	11,97	5,9	2,56	2028,81	8977,05
18	f	21,4	218,5	9,77		0,1	21,68	9,44	8,4	0,84	1123,81	5155,09
19	f	21	200,9	31,066		16,46	-	11,3	7,6	1,85	1486,84	7434,21
20	f	18,5	131,8	18,47		-	-	8,1	5,6	2,98	1446,43	11041,44
21	f	22	174,8	-		17,10	3,08	7,36	8,2	1,89	897,56	5158,4
22	f	16,5	91,2	-		-	-	8,69	8,8	2,25	987,5	1082,79
23	m	25	328	9,8	9,78							
24	m	24,2	292	5,96	8,09							

Remarque : (-) = le dosage n'a pas pu être réalisé (Plasma insuffisant).

Expérience 2 Tilapia (O, aureus)				deuxième prélèvement (25/7/95)								
N°	Sexe	L (cm)	P (g)	cc T ng/ml	cc 11-KT ng/ml	cc E2 ng/ml	CC PPP µg/ml	PO (g)	PMO (mg)	DO (mm)	NOT /f	NO /kg
	Bac témoin											
1	f	19,3	145	17,09		12,51	13,52	8,46	4,9	1,59	1726,53	10907,01
2	f	19,5	143,3	-		-	0,35	9,44	8,4	2	885,71	3594,62
3	f	23,2	266,4	23,59		6,35	6,98	7,56	9,6	2,05	787,5	4017,86
4	f	21,5	179,1	-		9,46	0,06	8,3	7,2	1,22	1152,78	7282,23
5	f	21,3	193,2	-		-	-	8,39	4,5	1,85	1864,44	11875,44
6	f	26,1	310	13,52		15,03	26,98	2,56	6,9	2	1485,51	9461,83
7	m	28,2	468,3	8,36	8,34							
8	m	27,3	387	7,09	4,29							
	Bac0,1											
9	f	10,7	157	22,54		23,35	17,3	7,46	6	1,29	1243,33	7919,32
10	f	22,6	246,4	-		3,22	2,56	8,59	6,8	2	1263,24	5126,77
11	f	22,6	196	14,71		-	-	6,09	8,9	2,34	684,27	3491,17
12	f	21,8	158,3	11,98		9,48	15,32	8013	4,5	0,98	1806,67	11412,93
13	f	20	157	-		6,46	0,85	6,25	7,1	1,56	880,28	5606,89
14	f*											
15	m	27	447,3	7,09	7,48							
16	m	26,3	378,6	11,02	9,35							
	Bac1											
17	f	22,6	228,2	22,25		9,665	10,56	9,58	7,5	2	1277,33	5597,43
18	f	22	219,8	-		4,55	-	8,79	8	2	1098,75	4998,86
19	f	21,5	204,6	15,58		-	4,153	8,6	5,5	1,25	1563,64	7642,41
20	f	19	134	17,17		-	15,156	7,98	8,4	1,58	950,00	7089,55
21	f	22,5	177,5	-		16,48	4,986	7,9	6,5	1,66	1227,69	6916,58
22	f*											
23	m	25,5	329,7	6,12	12,35							
24	m	25	331,6	9,93	5,59							

Remarque : (-) = le dosage n'a pas pu être réalisé (Plasma insuffisant),(*) = Poissons décédés.

Expérience 2 Tilapia (O, aureus)				troisième prélèvement (20/8/95)								
N°	Sexe	L (cm)	P (g)	cc T ng/ml	cc 11-KT ng/ml	cc E2 ng/ml	CC PPP µg/ml	PO (g)	PMO (mg)	DO (mm)	NOT /f	NO /kg
	Bac témoin											
1	f	19,5	145,9	22,09		15,26	4,28	9,68	5,9	0,69	1640,8	11245,22
2	f	19,8	145	-		4,02	17,24	8,09	8,4	2,5	963,1	6642,04
3	f	24	267	14,69		-	16,28	8,69	7,6	2,3	1257,89	4711,22
4	f*											
5	f	22	193,7	-		17,89	-	8,35	7	1,59	1192,86	6180,61
6	f	26	310,8	-		-	15,36	7,56	6	2,19	2050	6612,9
7	m	28,5	469,2	5,86	9,58							
8	m	27,7	390	10,19	3,56							
	Bac0,1											
9	f	11,2	157,2	14,38		6,37	16,9	8,35	7,2	1,22	1159,72	7377,37
10	f	23,5	248	14,53		13,47	-	7,98	6	1,56	1330,00	5362,9
11	f	23	197	19,27		-	5,16	7,56	6,7	2	1128,36	5727,71
12	f	22,5	158,9	-		11,47	2,37	8,23	7,1	0,64	1159,15	7294,87
13	f*											
14	f*											
15	m	27,6	448	9,52	10,29							
16	m	27,8	379,5	7,59	7,05							
	Bac1											
17	f	23	334,6	22,26		11,23	2,35	9,36	5,9	1,23	1586,44	4741,31
18	f	22,4	220,5	14,69		5,45	3,098	8,56	7,3	0,59	1172,6	5317,93
19	f*											
20	f	20	137	18,69		-	15,96	9,23	8,4	2	1098,21	8020,51
21	f*											
22	f*											
23	m	26	331,2	4,58	4,69							
24	m	25,7	333,4	11,94	12,98							

Remarque : (-) = le dosage n'a pas pu être réalisé (Plasma insuffisant),(*) = Poissons décédés.

Expérience 2 Tilapia (O, aureus)				quatrième prélèvement (15/9/95)								
N°	Sexe	L (cm)	P (g)	cc T ng/ml	cc 11-KT ng/ml	cc E2 ng/ml	CC PPP µg/ml	PO (g)	PMO (mg)	DO (mm)	NOT /f	NO /kg
	Bac témoin											
1	f	19,7	142,1	19,98		13,09	24,68	8,69	8,5	2	1022,35	7007,22
2	f	22	175,2	16,26		2,59	-	7,25	6,4	2,5	1257,81	8674,57
3	f	21,8	192,4	-		15,08	12,35	9,58	7,1	1,32	1680,70	6294,76
4	f	20	144,5	18,59		-	7,89	8,25	6,9	2,5	1195,65	4478,10
5	f*											
6	f*											
7	m	28,9	471,5	10,23	3,97							
8	m	28,3	400,5	6,85	5,83							
	Bac0,1											
9	f	22,9	145,9	12,15		11,25	4,59	8,2	6	1,25	1098,33	7527,99
10	f	22	245,7	17,48		-	12,6	6,95	7	1,59	1248,57	8610,84
11	f	20,2	196	-		14,02	-	6,58	6,3	0,19	1044,44	3911,78
12	f	21,2	156,4	18,59		8,25	2,98	9	6	2	996,67	3732,83
13	f*											
14	f*											
15	m	28,3	451	10,24	8,59							
16	m	27	380	7,49	12,3							
	Bac1											
23	m	26	331,2	9,53	8,65							
24	m	25,7	333,4	7,19	7,86							

Remarque : (-) = le dosage n'a pas pu être réalisé (Plasma insuffisant),(*) = Poissons décédés.