

UNIVERSITE MONTPELLIER II

# THESE

pour l'obtention du grade de

## Docteur

École Doctorale : **Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie,  
Géosciences, Hydrosociences et Environnement**

Discipline : **Écosystèmes**

Présentée et soutenue publiquement

Par **Awa NDIAYE**

le 03 Décembre 2012

### **Réponses du tilapia *Sarotherodon melanotheron* aux stress multiples (salinité et contaminants chimiques) : approche multi-paramétrique**

#### Jury

<b>M. Rachid Amara, Professeur (Université du Littoral - Côte d'Opale)</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Jean-Christophe Avarre, Chargé de Recherche (IRD)</b>	<b>Examineur</b>
<b>Mme Claude Casellas, Professeur (Université de Montpellier I)</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. Jean Laroche, Professeur (Université de Bretagne Occidentale)</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. Papa Ndiaye, Directeur de Recherche (IFAN-CAD, Dakar)</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. Jacques Panfili, Directeur de Recherche (IRD)</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M. Wilfried Sanchez, Ingénieur (INERIS)</b>	<b>Co-directeur de thèse</b>



## Résumé

*Sarotherodon melanotheron* est un poisson euryhalin endémique d'Afrique de l'ouest, qui vit et se reproduit dans tous les milieux aquatiques. Dans cette région où le changement climatique a provoqué l'apparition d'estuaires hypersalés, cette espèce est la seule à survivre en milieu hyperhalin, et constitue donc un excellent modèle biologique. Les milieux aquatiques côtiers sont aussi impactés par de nombreux contaminants issus de l'activité humaine. L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'impact des effets croisés de la salinité et des contaminants chez *S. melanotheron* dans des milieux très contrastés au Sénégal en utilisant une approche multi-multiparamétrique. Des indicateurs physiologiques (taux de croissance, facteur de condition) et une batterie de biomarqueurs en lien avec l'osmorégulation (pompe NKA), le métabolisme des xénobiotiques (EROD et GST), la protection vis-à-vis du stress (TBARS), la transmission de l'influx nerveux (AChE) et la reproduction (vitellogénine et histopathologie gonadique) ont été mesurés. Ils ont été complétés par une étude de la diversité génétique et de la forme des otolithes pour différencier les populations. Un dosage préalable de la contamination des sédiments a permis de caractériser précisément les sites échantillonnés. L'induction de l'activité EROD sur le site le plus impacté en HAP et celle de la NKA sur les sites de salinité plus élevée ont montré la sensibilité de ces biomarqueurs. Des expérimentations sur *S. melanotheron* en milieu contrôlé ont permis d'appréhender l'impact des effets combinés de la salinité et du DDT, et de caractériser l'activité NKA. L'analyse de la forme des otolithes et de la génétique des populations de *S. melanotheron* échantillonnées ont montré que la distance géographique semble être discriminante pour les variations morphométriques des otolithes, alors que la variabilité génétique observée traduisait l'histoire de la colonisation postglaciaire et les événements démographiques affectant les populations les plus isolées. Tous les résultats montrent l'intérêt de l'utilisation d'une approche multi-paramétrique pour caractériser l'impact de perturbateurs environnementaux multiples. Des travaux complémentaires permettraient d'affirmer que ce tilapia est un très bon indicateur utilisable dans l'évaluation de la qualité des écosystèmes côtiers en milieu tropical.

**Mots clés :** changement climatique, salinité, pollution chimique, biomarqueurs, *Sarotherodon melanotheron*,



## Abstract

The euryhaline black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron heudelotii* is endemic in West Africa and able to adapt to changes of salinity, to survive and to reproduce in different natural conditions. It is one of rare species to survive in hyperhaline area. Increased of the salinity levels is one of the consequences of climate change in West Africa coastal environments. However coastal zones are also the ultimate sink of chemical contaminants. The aim of this study was to assess the impact of the combined effects of salinity and pollutants in the black-chinned tilapia for evaluate the Senegalese aquatic habitat quality. In accord to this objective physiological marker (condition factor and growth rate) and several biochemical biomarkers to link with osmoregulatory (NKA), xenobiotic metabolisation (EROD, GST), oxidative stress (TBARS), neurotoxicity (AChE) and reproduction (VTG and gonad histopathology) were assessed. Field studies revealed that EROD and NKA can discriminate different sampling site and could be used as biomarkers on pollutants and salinity exposure respectively. The combined effects of salinity and DDT on osmoregulatory were characterized in laboratory conditions. The results showed that a set of biomarkers to assess effects of multiple stressors can be useful in *S. melanotheron*. In addition, the *S. melanotheron* population structure using morphologic and genetic analysis revealed that otolith shape analysis provides a geographical discrimination and microsatellites analysis allow genetic pool discrimination. Results show the absence of correspondence between the morphologic and genetic patterns. The present study demonstrated that importance of use multi-parametric approach to assess impact of multiple stressors, such as salinity and contaminants on black-chinned tilapia. Further studies should be realized for a better characterize this set of biomarker responses.

**Key words:** climate change, salinity, chemical contaminants, *Sarotherodon melanotheron*



## Avant propos

La Direction des Programmes de recherche et de la Formation au Sud (DPF) de l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement) à travers une bourse de soutien de thèse de doctorat, l'UMR 5119 ECOSYM (UM2, CNRS, IRD, Ifremer, UM1), et le projet EC2CO ECLIPSE (CNRS INSU, Ecosphère Continentale et Côtière, « Effets du changement climatique et de la pollution au Sénégal chez un poisson estuarien, le tilapia, *Sarotherodon melanotheron* », coordinateur du projet ECLIPSE Jean Dominique Durand) ont permis le financement de cette thèse.

## Remerciements

Je tiens à remercier la direction des programmes de recherche et de la formation au sud (DPF) de l'IRD (Institut de Recherche pour le développement) pour son soutien financier à travers une bourse de thèse de doctorat, l'UMR 5119 ECOSYM (UM2, CNRS, IRD, Ifremer, UM1) et le projet EC2CO ECLIPSE (CNRS INSU, Ecosphère Continentale et Côtière, « Effets du changement climatique et de la pollution au Sénégal chez un poisson estuarien, le tilapia, *Sarotherodon melanotheron* » pour avoir soutenu financièrement ces travaux.

Je remercie messieurs Jacques PANFILI et Wilfried SANCHEZ d'avoir accepté de diriger de cette thèse et d'avoir pris de leur temps pour corriger le manuscrit. Leurs précieux conseils scientifiques et techniques, leur soutien tout au long de la thèse m'ont été d'un apport très capital.

Je remercie les membres du jury M. Rachid Amara, M. Jean Christophe Avarre, M. Jean Laroche, Mme. Claude Casellas et M. Papa Ndiaye pour avoir évalué et amélioré ce travail.

Je tiens à remercier M. Guy Charmentier, M. Jean Dominique Durand, Mme Catherine Lorin-Nebel et M. Papa Ndiaye, membres de mon comité de thèse pour leurs suggestions et remarques qui ont permis une meilleure orientation pour l'atteinte des objectifs fixés.

Un grand merci à Mme Helena Gomez et Mme Claude Casellas pour la confiance qu'elles m'ont accordée et pour leur participation à la réalisation de mon projet d'étude dans le monde de la recherche.

Au cours de cette thèse, j'ai été amenée à travailler avec plusieurs équipes et avec de nombreuses personnes qui ont contribué à l'avancement de ces travaux. Je tiens à leur exprimer ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont à l'endroit du personnel de l'équipe DEP d'ECOSYM pour leur aide et leur conseil sur les traitements statistiques des données et particulièrement à mon directeur de thèse Jacques, pour son expérience du terrain et sa rigueur et à Jean-Dominique Durand pour m'avoir permis de participer au projet ECLIPSE, pour son encadrement travers le traitement des données et l'interprétation des résultats et ses conseils. Je remercie également Laure, Charlotte, Amandine et toutes mes collègues de bureau pour leur soutien. Je tiens également à remercier l'équipe AEO, particulièrement M. Guy Charmentier, Mme



Catherine Lorin-Nebel, et Mme Virginie Riou pour la collaboration dans le cadre du Projet ECLIPSE et pour m'avoir appris les méthodes de dosage de l'activité  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ .

Je remercie M. Papa Ndiaye d'avoir accepté de signer la convention de l'IRD et de m'accueillir au laboratoire de biologie marine de l'IFAN. Un grand merci à Mme Khady Diouf Goudiaby pour m'avoir accueillie dans son bureau à Dakar, mais aussi pour sa bonne humeur, sa disponibilité et son soutien. Tous mes remerciements vont à M. Oumar Baldé, Mme Khady Diop de l'IRD et à tous les pêcheurs pour leur soutien technique. Je remercie les stagiaires et doctorants de l'IFAN et de l'IRD et particulièrement Waly, Abdoulaye, Djiby, Christine, Myriam et Marie.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'équipe d'écotoxicologie de l'INERIS pour l'excellente ambiance du laboratoire. Je remercie M. Jean Marc Porcher pour m'avoir permis de faire mon stage de master 2 et de poursuivre ma thèse dans son laboratoire. Je tiens à remercier Wilfried, co-directeur de cette thèse pour la confiance qu'il m'a accordée et son aide dans l'interprétation des résultats. Je remercie particulièrement M. Olivier Palluel, ingénieur, pour son aide, sa bonne humeur et le 'far breton sans rhume très bon'. Olivier tu m'as appris toute la rigueur et le sérieux nécessaire à la bonne réalisation des analyses biochimiques. Sans ta connaissance et ta maîtrise de l'ensemble des matériels du laboratoire, je serai peut être entrain de purifier la VTG du tilapia. Un grand merci à Edite pour sa contribution à ce travail. Sabrina, Nicolas, Anne, Edwige, Manu, Damien, Véronique, Anne, Mélanie, Benjamin, Nathalie, je vous remercie et je me rappellerai toujours de nos discussions lors des pauses café et surtout des bons moments passés ensemble. Je sais que le soleil n'est pas toujours présent à Verneuil-en-Halatte, mais il ya toujours eu la joie et la bonne humeur Je garderai en mémoire mes superbes scores au 'laser games', au bowling, mes prestations avec la 'guitare héros' sur la wii et sur le tapis de dance de Benjamin, bref tous ces moments passés avec vous.

Je tiens également à remercier Mme Hélène Budzinski et M. Laurent Peluhet de l'EPOC/LPTC de Bordeaux pour la réalisation des analyses chimiques et la collaboration dans le cadre du Projet ECLIPSE.

Je remercie M. Patrick Berrebi pour m'avoir permis de faire le typage des microsattellites dans son laboratoire et pour ses conseils sur le traitement des données. Je remercie également

Amandine et Martin Laporte pour leurs soutiens techniques (Anglais et utilisation FMBio), leur bonne humeur, les 'brunch' à Montpellier.

Un grand merci à Mathieu et Maïmouna Lecoze pour leur amitié, pour les bons moments passés ensemble. Je tiens à remercier mon oncle Mamadou Ndour et sa famille à Lyon grâce à qui j'avais le Sénégal à 2h de train. Un grand merci à mes amis Bocar, Daniel, Aminata, Awa, Mingué pour leur soutien.

Guy et Aline Arnaud, Laetitia et Lionel Moore qui ont été là durant mon séjour en France et m'ont fait découvrir leur département. Un très grand merci à Marion et Jean Paul pour leur soutien, leur encouragement et pour l'hébergement à Montpellier.

Je remercie mes parents, mes grands parents, mes sœurs, mes frères et ma belle famille pour leur soutien et leur disponibilité et leur «Douah », malgré la distance. Merci Papa bien que l'on soit une famille très nombreuse tu as toujours cru en nous et tu nous as toujours soutenus.

Je remercie très sincèrement mon époux Mahamadou qui malgré la distance a su être attentif et patient. Chéri, sans ton soutien financier je n'aurai pas pu finaliser cette thèse. Tu as toujours su me motiver même dans les moments les plus difficiles. Je te remercie d'avoir toujours cru en moi.

*A Mes parents*

*A Mahamadou*

# Sommaire

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>16</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>18</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>20</b>
<b>Valorisation</b> .....	<b>22</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>24</b>
<b>Chapitre 1 : Différents types de stress environnementaux en milieu aquatique</b> .....	<b>34</b>
1.1. Changement climatique et milieux aquatiques .....	37
1.1.1. Changements des facteurs abiotiques .....	38
1.1.2. Impacts du changement climatique sur les milieux côtiers .....	39
1.2. Pollution chimique des milieux aquatiques .....	41
1.2.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) .....	42
1.2.2. Polychlorobiphényles (PCB) .....	45
1.2.3. Polybromodiphényles-éthers (PBDE) .....	48
1.2.4. Pesticides .....	49
1.2.5. Perturbateurs endocriniens (PE) .....	51
1.3. Biomarqueurs et impact du stress environnemental à différents niveaux d'organisation chez les poissons.....	55
1.3.1. Réponses biochimiques et moléculaires .....	56
1.3.1.1. <i>Métabolisme des xénobiotiques</i> .....	56
1.3.1.1.1. Activité EROD .....	59
1.3.1.1.2 Activité GST.....	60
1.3.1.2. <i>Osmorégulation</i> .....	61
1.3.1.3. <i>Protection vis-à-vis du stress oxydant</i> .....	63
1.3.1.4. <i>Transmission de l'influx nerveux</i> .....	65
1.3.1.5. <i>Reproduction</i> .....	66
1.3.2. Quelques réponses individuelles .....	67
1.3.2.1. <i>Atteintes cellulaires et tissulaires</i> .....	67

1.3.2.2. <i>Modifications des traits de vie</i> .....	69
1.3.3. Quelques réponses populationnelles.....	70
1.3.3.1. <i>Variabilité morphométrique des otolithes</i> .....	70
1.3.3.2. <i>Diversité génétique des populations</i> .....	71
1.4. Effets des contaminants face aux effets du changement climatique.....	73
<b>Chapitre 2 : Choix méthodologiques .....</b>	<b>75</b>
2.1. Ecosystèmes aquatiques choisis au Sénégal.....	78
2.1.1. Estuaire du Saloum.....	80
2.1.2. Baie de Hann .....	81
2.1.3. Niayes.....	81
2.1.4. Lac de Guiers.....	82
2.1.5. Estuaire du fleuve Sénégal .....	83
2.1.6. Estuaire de la Gambie.....	83
2.2. Modèle biologique choisi : le tilapia .....	83
2.2.1. Systématique et morphologie .....	83
2.2.2. Habitat et répartition.....	84
2.2.3. Biologie et écologie.....	85
2.2.4. Tolérance face aux variations des paramètres environnementaux .....	86
2.2.5. Choix du <i>Sarotherodon melanotheron</i> en écotoxicologie.....	87
2.3. Paramètres étudiés.....	88
2.3.1. Analyses chimiques.....	88
2.3.1.1. <i>Concentrations de POP et HAP dans les sédiments</i> .....	89
2.3.1.1.1. Analyses des POP.....	89
2.3.1.1.2. Analyses des HAP .....	90
2.3.1.1.3. Validation de la méthode.....	90
2.3.1.2. <i>Concentration de DDT, DDD et DDE dans l'eau et les tissus</i> .....	91
2.3.2. Analyses biochimiques.....	92
2.3.2.1. <i>Préparation des échantillons</i> .....	92

2.3.2.2. Dosage des Biomarqueurs.....	93
2.3.2.2.1. Activité EROD .....	93
2.3.2.2.2. Activité GST.....	93
2.3.2.2.3. Activité Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase.....	93
2.3.2.2.4. Activité AChE.....	94
2.3.2.2.5. TBARS .....	94
2.3.2.2.6. Validation dosage ELISA.....	95
2.3.3. Modification des traits de vie .....	99
2.3.4. Analyses histologiques .....	100
2.3.5. Analyse morphométrique des otolithes .....	100
2.3.6. Analyse génétique des populations.....	102
<b>Chapitre 3 : Evaluation <i>in situ</i> des niveaux de réponses des biomarqueurs physiologiques et biochimiques chez le tilapia <i>Sarotherodon melanotheron</i> : influence potentielle de la salinité...</b>	<b>105</b>
Synthèse du manuscrit 1.....	107
Manuscrit 1. Multiparametric approach for assessing environmental quality variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia ( <i>Sarotherodon melanotheron</i> ) as a sentinel species, paru à ‘Environmental Sciences and Pollution Research’ .....	109
<b>Chapitre 4 : Evaluation des effets des composés perturbateurs endocriniens œstrogéniques sur le tilapia <i>Sarotherodon melanotheron</i> .....</b>	<b>127</b>
Synthèse du manuscrit 2.....	129
Manuscrit 2. Circulating vitellogenin and intersex of wild black-chinned tilapia ( <i>Sarotherodon melanotheron</i> ) from Senegalese aquatic ecosystems, en préparation.....	132
<b>Chapitre 5 : L’osmorégulation chez le tilapia face à un challenge de variation de la salinité et de la contamination chimique .....</b>	<b>152</b>
Synthèse du manuscrit 3.....	154
Manuscrit 3. Impact of environmental DDT concentration on gill adaptation to increased salinity in the tilapia <i>Sarotherodon melanotheron</i> , paru à ‘Comparative Biochemistry and Physiology Part C’ .....	156
Variabilité saisonnière de l’activité Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase.....	168
<b>Chapitre 6 : Différenciation des populations de <i>Sarotherodon melanotheron</i> à partir de la forme des otolithes et de la structure génétique.....</b>	<b>170</b>
Synthèse du manuscrit 4.....	172

Manuscrit 4. Otolith shape and genetics diversity of the black-chinned tilapia <i>Sarotherodon melanotheron</i> in Senegalese ecosystems, en préparation .....	174
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>193</b>
Réponse des biomarqueurs du tilapia .....	195
Influence de la salinité.....	196
Influence de la saisonnalité .....	197
Caractérisation des réponses des marqueurs en lien avec l'osmorégulation en milieu contrôlé .....	198
Discrimination des différentes populations de tilapias.....	198
Perspectives .....	200
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>202</b>

# Liste des abréviations

<b>Ac</b> : Anticorps	<b>HAP</b> : hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>AChE</b> : achétylcholinestérase	<b>Kir</b> : canal K <sup>+</sup>
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>MC-RR</b> : microcystin-RR
<b>AhR</b> : récepteur aux hydrocarbures aromatiques	<b>MDA</b> : Malonedialdéhyde
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>MIIM</b> : Milieu isotonique d'isolation de membranes
<b>Arnt</b> : ARN de transfert	<b>MRC</b> : Cellules à chlorure
<b>BET</b> : Bromure d'éthidium	<b>NADP</b> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>BChE</b> : butyrylcholinestérase	<b>NADPH</b> : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>BSA</b> : Albumine Sérique Bovine	<b>NKA</b> : Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase
<b>CAT</b> : Catalase	<b>NKCC</b> : Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup>
<b>CDNB</b> : Chloro dinitro benzène	<b>NO°</b> : Monoxyde d'azote
<b>CFTR</b> : Régulateur transmembranaire de la fibrose kystique	<b>NP1EO-NPnEO</b> : Ethoxylates de nonylphénol
<b>CH<sub>4</sub></b> : méthane	<b>NP</b> : Nonylphénol
<b>CO<sub>2</sub></b> : dioxyde de carbone	<b>NSB</b> : Liaison non spécifique
<b>CSE</b> : centre de suivi écologique	<b>O<sub>2</sub>°</b> : Anion superoxyde
<b>CV</b> : Coefficients de variation	<b>OH°</b> : radical hydroxyle
<b>CYP</b> : Cytochromes P450	<b>PBB</b> : diphényles polybromés
<b>DDD</b> : Dichloro-diphenyl-dichloroéthane	<b>PBDE</b> : Ethers diphényliques polybromés
<b>DDE</b> : dichloro-diphényl-dichloroéthylène	<b>PCB</b> : polychlorés diphényles
<b>DDT</b> : Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane	<b>PCT</b> : polychlorées de terphényles
<b>E1</b> : Estrone	<b>PCDD</b> : polychlorodibenzo-p-dioxines
<b>E3</b> : Estriol	<b>PCDF</b> : polychlorodibenzofuranes
<b>EE2</b> : Ethinylestradiol	<b>PE</b> : perturbateurs endocriniens
<b>ELISA</b> : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay	<b>Pi</b> : Phosphate inorganique
<b>EPA</b> : Agence de protection de l'environnement US	<b>PDMS</b> : Polydiméthylsiloxane
<b>ER</b> : récepteur des œstrogènes	<b>PMSF</b> : Fluorure de Phénylméthane sulfonyle
<b>ERO</b> : espèces réactives de l'oxygène	<b>PPCP</b> : Produits pharmaceutiques et d'hygiène corporelle
<b>EROD</b> : 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase	<b>PVC</b> : Cellules pavimenteuses
<b>FC</b> : Facteur de condition	<b>RO°</b> : Radical alcoxyle
<b>GC-MS</b> : Chromatographie sur phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse	<b>ROO°</b> : Radicaux hydroperoxydes
<b>GC-EDC</b> : Chromatographie sur phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électron	<b>ROOH</b> : Radical hydroperoxyde
<b>GIEC</b> : groupe d'expert Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat	<b>SOD</b> : Superoxyde dismutase
<b>GSH</b> : glutathion	<b>SPME</b> : Microextraction sur phase solide
<b>GSSG</b> : 2GSH reliées par un pont disulfure (S-S)	<b>TBA</b> : Acide thiobarbiturique
<b>GST</b> : glutathion-S-transférase	<b>TBARS</b> : substances réactives à l'acide thiobarbiturique
<b>GPx</b> : glutathion peroxydase	<b>TCA</b> : Acide trichloracétique
<b>H+</b> : proton	<b>TCDD</b> : 2,3,7,8 tétrachlorodibenzo-p-dioxin
<b>H<sub>2</sub>O</b> : vapeur d'eau	<b>TPP</b> : tert-pentylphenol 4
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> : peroxyde d'hydrogène	<b>UGT</b> : UDP-glucuronyl transférase
	<b>VTG</b> : Vitéllogénine





# Liste des figures

- Figure 1** : Approche multiparamétrique basée sur différents niveaux
- Figure 2** : Récapitulatif des impacts découlant du changement climatique et de l'acidification des océans (d'après OSPAR, 2010).
- Figure 3** : Liste des 16 HAP prioritaires par EPA-US et leur structure.
- Figure 4** : Liste de quelques PCB prioritaires et leur structure.
- Figure 5** : La structure de quelques PBDE présents dans l'environnement.
- Figure 6** : Représentation schématique du devenir des retardateurs de flamme dans l'environnement (d'après Watanabe & Sakai, 2003).
- Figure 7** : La structure du DDT et 2 de ses métabolites présents dans l'environnement.
- Figure 8** : Présentation schématique des différentes sources potentiels, du transport et du devenir des perturbateurs endocriniens œstrogéniques dans l'environnement (d'après Campbell et al., 2006).
- Figure 9** : Représentation schématique des relations entre le stress environnemental et les effets directs et indirects sur le système biologique. Les effets directs affectent les organismes principalement via les processus biochimiques et métabolique, tandis que les effets indirects sont influencés par le biote via la disponibilité de la nourriture et de l'habitat et des interactions intra et interspécifiques (d'après Adams, 2005).
- Figure 10** : Cycle catalytique du cytochrome P450 (d'après Meunier et al., 2004).
- Figure 11** : Mécanisme d'induction du CYP P450 1A par les HAP (d'après Reynaud & Deschaux, 2006).
- Figure 12** : Mécanisme d'osmorégulation chez les poissons téléostéens. En eau douce pour faire face à la perte d'ion et à l'entrée d'eau, l'organisme met en place un système de compensation avec l'excrétion d'un grand volume d'urine dilué et l'absorption active de NaCl au niveau des branchies. En eau de mer les poissons doivent faire face à une perte osmotique d'eau et un gain de NaCl à travers les branchies. Dans ce contexte les mécanismes de compensation mises en place incluent l'ingestion d'eau de mer, l'absorption intestinale de NaCl et d'eau, l'excrétion d'un petit volume d'urine isotonique et la sécrétion active de NaCl à travers l'épithélium branchial (d'après Evans, 2008).
- Figure 13** : Représentation simplifier des réactions du système antioxydant enzymatique.
- Figure 14** : Modèle de mécanisme de transport d'ion au niveau des MRC des branchies des téléostéens en eau de mer (d'après Evans et al., 2005; Evans, 2008).
- Figure 15** : Les différents sites échantillonnés.
- Figure 16** : La Variation de la pluviométrie moyenne (mm) de la station de Dakar-Yoff (d'après CSE, 2010).
- Figure 17** : Variation de la pluviométrie moyenne (mm) sur la station de Kaolack (d'après CSE, 2010).
- Figure 18** : Classification chimique des pesticides utilisés dans la zone des Niayes (d'après Cissé et al., 2006).
- Figure 19** : Le Sarotherodon melanotheron.
- Figure 20** : Répartition du S. melanotheron en Afrique de l'ouest (d'après Falk et al., 2003).
- Figure 21** : Poids moléculaire estimé de la VTG de tilapia par gel filtration.
- Figure 22** : Parallélisme des courbes obtenues avec des échantillons de femelles, de males induit et non induit et de standard purifié en utilisant le dosage ELISA de la vitellogénine avec une concentration de coating de 35 ng/mL et une dilution d'anticorps primaire de 1/30000.
- Figure 23** : Acquisition d'image d'otolithe de Sarotherodon melanotheron sous un microscope binoculaire en lumière réfléchiée sur fond noir.
- Figure 24** : Représentation schématique de l'otolithe de Sarotherodon melanotheron par le logiciel SHAPE.
- Figure 25** : Détermination du nombre d'harmoniques nécessaire.
- Figure 26** : Variation saisonnière de l'activité NKA chez des tilapias collectés dans différents sites



# Liste des tableaux

**Tableau 1** : Quelques propriétés chimiques des 16 HAP définis comme polluants prioritaires dangereux par l'EPA-US (d'après Mackay et al., 1992).

**Tableau 2** : Kow de quelques PCB prioritaires (d'après Hawker & Connell, 1988).

**Tableau 3** : Liste de quelques composés à activité estrogénique confirmée ou suspectés et leurs propriétés retrouvés dans la littérature. (ND) non disponible. (a) facteur d'équivalence oestrogénique exprimé en équivalents en estradiol. (b) facteur d'équivalence oestrogénique exprimé en équivalents en 17- $\beta$ -estradiol (d'après Campbell et al., 2006).

**Tableau 4** : Coefficients de variation (CV) intra- et inter-essais pour le dosage ELISA de la vitellogénine avec une concentration de coating de 35 ng/mL et une dilution d'anticorps primaire de 1/30000.

**Tableau 5** : Les paramètres de tailles des otolithes et les indices de forme utilisés dans l'analyse.

**Tableau 6** : détails technique pour la PCR des six loci utilisé dans cette étude.



# Valorisation

## Présentations

**Ndiaye A.**, Sanchez W., Durand J.-D., Budzinski H., Palluel O., Diouf K., Ndiaye P., Panfili J. 2011 (O). Multi-parametric approach to assess combined effects of pollution and climate change in West African aquatic ecosystems. SETAC Europe 21st annual meeting, Milano, Italy, -15-19 May 2011.

**Ndiaye A.**, Palluel O., Durand J.-D., Brion F., Porcher J.-M., Panfili J., Sanchez W. 2011 (P). Assessment of in situ estrogenic effects in the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) using vitellogenin measurement by ELISA. SETAC Europe 21st annual meeting, Milano, Italy, -15-19 May 2011.

## Publications parues

**Ndiaye A.**, Sanchez W., Durand J.-D., Budzinski H., Palluel O., Diouf K., Ndiaye P., Panfili J. 2012. Multiparametric approach for assessing environmental quality variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species. *Environmental Sciences and Pollution Research*, 19: 4133-4147.

Riou V., **Ndiaye A.**, Budzinski H., Dugué R., Le Ménach K., Combes Y., Bossus M., Durand J.-D., Charmantier, G., Lorin-Nebel C. 2012. Impact of environmental DDT concentrations on gill adaptation to increased salinity in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 156: 7-16.

Milinkovitch T., **Ndiaye A.**, Sanchez W., Le Floch S., Thomas-Guyon H. 2011. Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology*, 1: 155-164.

Mercier L., Panfili J., Paillon C., **Ndiaye A.**, Mouillot D., Darnaude A.M. 2011. Otolith reading and multi-model inference for improved estimation of age and growth in the gilthead seabream *Sparus aurata* (L.). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 92: 534-545.

## Publications en préparation

**Ndiaye A.**, Panfili J., Berrebi P., Laporte M., Sanchez W., Durand J.-D. Population structure of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* in Senegalese ecosystem reflected by otolith shape analysis and genetics. En préparation

**Ndiaye A.**, Palluel O., Durand J.-D., Brion F., Porcher J.-M., Panfili J., Sanchez W. Circulating vitellogenin and intersex od wild black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* from Senegalese aquatic ecosystems. En préparation



# **Introduction générale**





## Introduction générale

Reconnu de façon générale, le changement climatique actuel peut être causé par une combinaison de plusieurs facteurs. Dans certaines régions du monde les impacts de ce changement commencent à se faire ressentir de façon évidente. Alors que la nature et le rythme de ces impacts sont incertains, l'augmentation de la température de la mer et l'acidification croissante représentent des exemples des principales menaces pour les écosystèmes marins (OSPAR, 2010). Au cours des dernières décennies les activités humaines ont eu un impact certain sur l'environnement et ont induit le changement climatique global qui a des répercussions directes sur les écosystèmes marins et les systèmes socioéconomiques (Harley et al., 2006). Ces activités ont aussi entraîné l'introduction et la dispersion de composés chimiques dans les écosystèmes aquatiques qui ont induit des effets létaux sur les organismes qui y vivent (Livingstone, 1998). Parmi ces écosystèmes, les zones côtières et les estuaires sont ceux qui subissent les plus fortes variations des facteurs abiotiques et qui sont donc sous le joug de pressions écologiques et socioéconomiques constantes (Klein & Nicholls, 1999). Leur importance écologique est reflétée en particulier par les services qu'ils apportent en tant qu'habitats et nurseries pour de nombreux stades larvaires et juvéniles d'espèces de poissons (Burke et al., 2001; Smith & Parrish, 2002). Ces écosystèmes constituent des zones d'interface entre la terre et la mer d'une importance économique considérable de par les biens et les services<sup>1</sup> qu'ils rendent (Costanza, 1997). La capacité des écosystèmes à fournir ces services à la société est fréquemment soumise à des stress (Mooney et al., 2009). Plusieurs variables, dont la diversité biologique, les processus écologiques et évolutionnistes, les données climatiques, les impacts anthropiques liés aux activités économiques et leurs interactions, déterminent cette capacité (Munang et al., 2010). La diversité de ces variables rend complexe l'évaluation de leurs impacts sur les zones côtières (Burke et al., 2001).

---

<sup>1</sup> Les biens (nourriture par exemple) et les services (approvisionnement) des écosystèmes sont les bienfaits que les écosystèmes procurent à l'homme, ils proviennent directement ou indirectement des fonctions d'écosystèmes (Costanza, 1997). Les fonctions d'écosystème se réfèrent différemment à l'habitat, à la biologique ou à des propriétés de systèmes ou de processus d'écosystèmes.

Le changement climatique est maintenant sans équivoque, comme démontré par le GIEC<sup>2</sup> (GIEC/IPPC, 2007). Partout dans le monde, l'étude et la prise en compte de ce changement sont devenus des priorités pour les gouvernements, les organisations et les gestionnaires à cause des connaissances accrues sur l'impact du changement climatique sur le commerce, la sécurité, l'économie, les écosystèmes et le bien-être des Hommes et des autres espèces (Paula, 2011). Dans ce contexte, les environnements marins côtiers sont au centre de toutes les préoccupations liées aux impacts potentiels du changement climatique (Harley et al., 2006). La hausse des températures est un effet majeur du changement climatique révélé presque partout dans le monde (GIEC/IPPC, 2007). Comme la température contrôle directement de nombreux processus essentiels à la vie, un changement de régime thermique (par exemple les températures extrêmes, leur durée et les changements saisonniers de température) peut directement influencer sur les taux de croissance et la reproduction des espèces sauvages (Poff et al., 2002). Une des autres conséquences du changement climatique sur les écosystèmes côtiers est l'élévation du niveau de la mer qui peut provoquer une intrusion d'eau salée, des inondations et une érosion côtière (Scavia et al., 2002). Ces différentes modifications affectent directement l'abondance, la composition et la distribution des organismes aquatiques. D'autres observations ont aussi montré une disparition rapide de nombreux habitats côtiers comme les mangroves, les marécages et les récifs coralliens à des échelles régionales (Burke et al., 2001). L'effet cumulatif de ces modifications entraîne une détérioration des environnements côtiers à travers le monde (Waycott et al., 2009). Cependant le changement climatique n'est pas la seule contrainte sur ces écosystèmes et d'autres facteurs comme les polluants sont aussi à prendre en considération.

Islam & Tanaka (2004) ont reporté que la majorité des zones côtières était impactée par une pollution chimique. Les écosystèmes côtiers et les services qu'ils fournissent sont négativement affectés par une large variété d'activités humaines (Klein et al., 2001). L'introduction de polluants dans les systèmes aquatiques peut entraîner une série de réactions chimiques et biologiques chez les organismes aquatiques. En raison des pressions constantes

---

<sup>2</sup> Le GIEC est un groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat chargé d'évaluer les informations scientifiques relatives au changement climatique, de mesurer les conséquences environnementales et socioéconomiques de ce changement et de formuler des stratégies de parade réalistes. Le dernier rapport du GIEC considère que le réchauffement du système climatique est sans équivoque. L'essentiel de l'élévation de la température moyenne du globe observée depuis le milieu du XXe siècle est très probablement attribuable à la hausse des concentrations de gaz à effet de serre anthropiques.

sur les écosystèmes côtiers, il existe un réel besoin d'évaluation de leur état de santé. Pendant longtemps la seule analyse chimique des polluants environnementaux a permis une surveillance des écosystèmes aquatiques. En complément des analyses chimiques et écologiques classiquement utilisées dans la surveillance des milieux, la mesure de biomarqueurs<sup>3</sup> permet désormais de disposer d'informations sur les perturbations de la santé des organismes voire sur les conséquences potentielles de ces perturbations au niveau individuel et populationnel (Flammarion et al., 2000; Sanchez et al., 2008). Les biomarqueurs sont de plus en plus utilisés dans les programmes de recherche pour la surveillance de la qualité des eaux (Hinck et al., 2008; Sanchez & Porcher, 2009).

Les biomarqueurs sont largement étudiés et utilisés pour établir un diagnostic de l'état de dégradation des environnements aquatiques. En milieu naturel, les polluants sont généralement présents sous forme de mélanges complexes renfermant plusieurs catégories de contaminants. L'utilisation d'un seul biomarqueur ne permet donc pas de prendre en compte l'ensemble des effets des contaminants et l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs complémentaires semble alors pertinente pour mieux tenir compte de leurs multiples effets. Cette approche multiparamétrique est maintenant très commune et utilisée de par le monde pour évaluer l'état de santé d'écosystèmes dans des programmes de surveillance (Wepener et al., 2005; Mayon et al., 2006; Sanchez et al., 2008; Cazenave et al., 2009).

Si les polluants chimiques sont connus pour induire une réponse de biomarqueurs, les stress physiques et biologiques peuvent également modifier cette réponse. Les études *in situ* dans les milieux aquatiques côtiers constituent donc un challenge pour intégrer et distinguer les réponses des biomarqueurs induites par les effets des contaminants et de la variabilité des facteurs abiotiques (Cailleaud et al., 2007). La saison, la température ambiante et l'hétérogénéité de l'environnement sont aussi des facteurs qui affectent les réponses biologiques (van der Oost et al., 2003). Pour une meilleure interprétation de réponses des biomarqueurs, il est donc utile de connaître leurs variabilités naturelles. Ce sera le but de ce travail de thèse.

Au cours des dernières décennies, le changement climatique a particulièrement affecté les écosystèmes estuariens en Afrique de l'ouest. L'épisode de sécheresse débuté dans les

---

<sup>3</sup> Les biomarqueurs font partie des indicateurs biologiques utilisés pour déceler les changements moléculaires, biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux susceptibles de révéler l'exposition d'un organisme à des stress environnementaux (Lagadic, 2002).

années 50 a entraîné une diminution significative des apports en eau douce et une augmentation de l'évaporation (Pagès & Citeau, 1990). Ces forçages ont des conséquences directes sur les peuplements aquatiques en modifiant leur structure (Whitfield & Elliott, 2002). Parallèlement, en Afrique de l'ouest, l'urbanisation rapide, l'industrialisation croissante et l'utilisation hasardeuse des produits chimiques constituent différents types de pressions qui entraînent inéluctablement une pollution des écosystèmes aquatiques (Troussellier et al., 2004).

Face à cette situation le Sénégal a adopté un plan d'action pour l'environnement (PNAE). Dans ce pays, l'environnement marin, estuarien et côtier est menacé par l'érosion côtière, la pollution industrielle et domestique, les multiples usages et la forte salinité des eaux estuariennes. Plusieurs ONG nationales et internationales ou institutions de recherche participent elles aussi à la lutte contre l'érosion côtière et à l'adaptation des populations face au changement climatique au niveau des zones côtières. Bien que de nombreux efforts soient faits au niveau juridique et institutionnel, sur le terrain le manque de coordination entre les différents institutions est criant, ce qui rend difficile la surveillance des zones côtières marines (CSE, 2010). Actuellement il existe au Sénégal plusieurs projets sur la restauration de la mangrove, la lutte contre l'érosion côtière, la conservation de la biodiversité, dépollution industrielle de la baie de Hann à Dakar, mais peu d'études se sont réellement focalisées sur les niveaux de contamination dans ces zones Bodin et al. (2011; 2012). La majorité des études sur la pollution chimique de l'eau se sont focalisées sur les eaux potables et les eaux souterraines (Sall & Vanclooster, 2009). Il est donc essentiel de surveiller la qualité de ces milieux en évaluant les niveaux de pollution chimique et leurs effets sur ces écosystèmes et les organismes. Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans ce contexte.

L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer l'impact de stress multiples :

- contaminants
- variations de la salinité

dans des écosystèmes aquatiques au Sénégal, sur différents niveaux d'organisation biologique, en utilisant une espèce de poisson sentinelle, le tilapia *Sarotherodon melanotheron*. Ce modèle biologique est potentiellement un sentinelle car sensible aux variations des conditions climatiques et environnementales (van der Oost et al., 2003;

McIntyre et al., 2010). Pour atteindre cet objectif plusieurs approches ont été combinées en tenant compte de différents niveaux d'organisations biologiques (Figure 1).

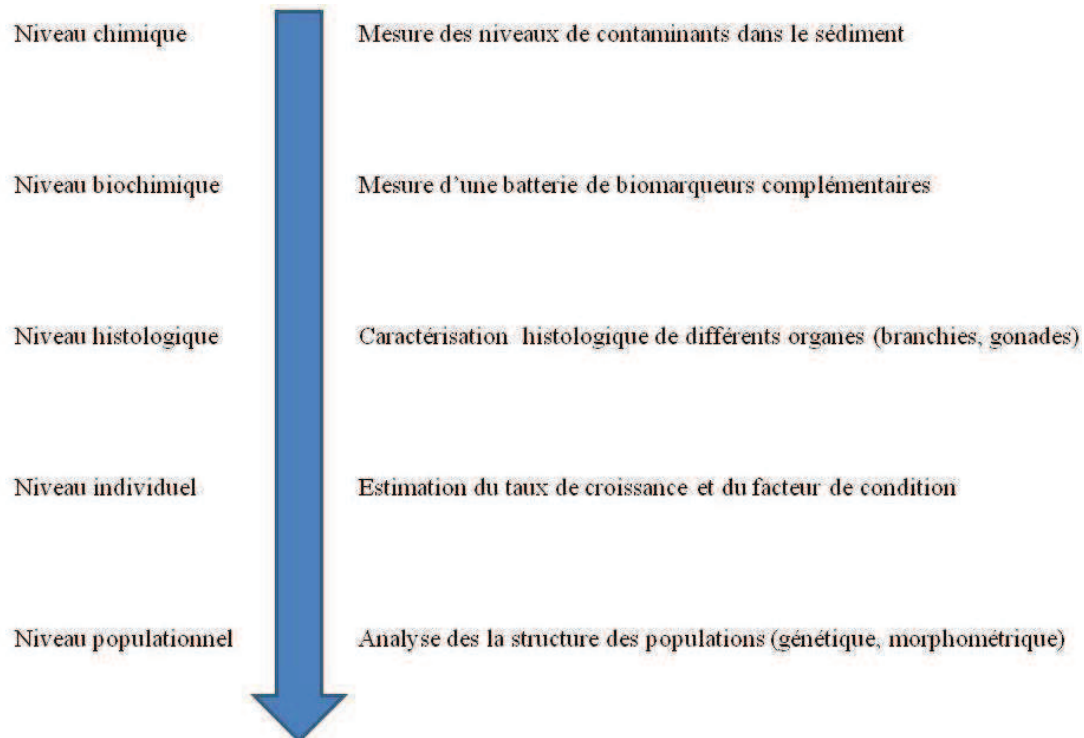


Figure 1 : Approche multiparamétrique basée sur différents niveaux biologiques.

### 1<sup>ère</sup> partie : Contamination *in situ*

La première étape de ce travail a eu pour but d'étudier l'impact de la contamination *in situ* chez le poisson tilapia *S. melanotheron*. Des études antérieures faites sur cette espèce ont également montré sa remarquable plasticité face à la salinité (Panfili et al., 2004) et en fonction des conditions plus ou moins favorables du milieu (Legendre & Ecoutin, 1996). Dans la thèse, des indicateurs susceptibles de détecter les effets des contaminants chez les poissons ont été pris en compte : des biomarqueurs biochimiques (7-ethoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD), glutathion-S-transférase (GST), acétylcholinestérase (AChE) et substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) ont été sélectionnés. et complétés par des biomarqueurs physiologiques (taux de croissance, facteur de condition). De plus comme la salinité peut être un facteur majeur d'aggravation des effets des xénobiotiques (Viarengo et al., 1995), son influence sur les réponses des biomarqueurs a également été étudiée. Cette batterie de biomarqueurs a été complétée par le dosage de l'activité  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (NKA), un marqueur d'exposition aux variations de la salinité. Un ensemble de sites d'étude a été choisi au Sénégal pour refléter ces différents types de stress (contaminants et/ou salinité). Les niveaux de

contamination des sédiments en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychlorés diphényles (PCB), éthers diphényliques polybromés (PBDE) et pesticides ont été mesurés préalablement pour les mettre en relation directe avec l'expression des biomarqueurs. Une analyse multivariée a été utilisée pour discriminer les différents sites échantillonnés et évaluer la capacité de ce tilapia à répondre et s'adapter à de multiples stress dans son environnement.

### 2<sup>ème</sup> partie : Effets œstrogéniques (VTG chez les mâles et histologie des gonades)

La deuxième partie de ce travail a eu pour objectif d'évaluer les effets oestrogéniques de la contamination des écosystèmes aquatiques sénégalais chez *Sarotherodon melanotheron*. Les perturbateurs endocriniens sont présents dans l'environnement sous une forme complexe de mélange de molécules et peuvent entraîner des effets létaux (perturbation de l'homéostasie, de la reproduction, du système immunitaire et de la neurotransmission) (van der Ven et al., 2005; Schultz et al., 2011). Dans cette thèse, la vitellogénine, marqueur d'exposition aux œstrogènes qui permet de prédire les modifications des mécanismes de reproduction, a été mesurée chez les mâles. Cette protéine est anormalement induite chez des poissons mâles exposés à des composés perturbateurs endocriniens. Pour mieux appréhender les effets de ces composés sur la fonction de reproduction, le dosage de la vitellogénine a été complété par la recherche de perturbations histologiques au niveau des gonades.

### 3<sup>ème</sup> partie : Stress multiple en milieu contrôlé (DDT et salinité)

La troisième partie de ce travail a eu pour but de caractériser l'impact de stress multiples sur *Sarotherodon melanotheron* en milieu contrôlé. Les effets du stress ont été appréhendés à grâce à l'exposition à du DDT et à des conditions variables de salinité. Les branchies font partie des principaux organes d'osmorégulation chez les poissons et constituent le site principal d'assimilation de polluants dissouts (Sancho et al., 1997). A leur niveau il existe des transporteurs qui jouent un rôle clef dans les échanges ioniques et leur exposition à différents niveaux de salinité peut entraîner leur localisation préférentielle à différents niveaux sur la membrane de l'épithélium branchial (Hiroi et al., 2008). La NKA au niveau des branchies qui joue un rôle central dans l'osmorégulation (Towle, 1981). Dans cette thèse, le dosage de l'activité de la NKA a permis d'appréhender l'impact du DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane) et de la salinité sur *S. melanotheron*.

### 4<sup>ème</sup> partie : Structure des populations (forme des otolithes et génétique)

La dernière partie de ce travail a eu pour objectif d'une part de connaître la structure génétique des populations de *Sarotherodon melanotherodon* dans la zone d'étude, et d'autre part de voir si la diversité génétique peut justifier des différences dans la forme des otolithes (concrétions de l'oreille interne enregistrant la croissance et servant à l'équilibration et à l'audition). Le stress chimique peut affecter la structure génétique au niveau des populations avec une perte de la diversité génétique pouvant avoir des conséquences écologiques (Guttman, 1994). La structure et le développement des otolithes sont influencés par la physiologie de l'individu et par des facteurs environnementaux externes, et peuvent varier d'une population à une autre (Campana & Neilson, 1985). Afin d'appréhender le lien entre les différences morphométriques des otolithes et la structure génétique de *S. melanotheron*, les tilapias ont été échantillonnés sur différents sites présentant des milieux différents.

Les résultats de ce travail de thèse ont permis de faire un état des lieux de la contamination et de ses effets sur *Sarotherodon melanotheron*, permettant ainsi d'établir un premier diagnostic de la qualité des milieux aquatiques sénégalais. Le premier chapitre de la thèse est donc une synthèse bibliographique qui décrit certains effets du changement climatique et de la pollution chimique (avec les contaminants mesurés dans cette étude et les mécanismes de réponses des organismes aquatiques au stress chimique). Le deuxième chapitre décrit les choix méthodologiques adoptés dans ce travail. Les résultats acquis au cours de notre étude sont présentés sous forme de chapitre. Les chapitres suivants (3 à 6) se présentent sous la forme d'un manuscrit publié ou en préparation. Enfin un dernier chapitre fait une synthèse et donne des perspectives à ce travail.





# **Chapitre 1 : Différents types de stress environnementaux en milieu aquatique**



# Chapitre 1 : Différents types de stress environnementaux en milieu aquatique

Dans cette étude seules les pressions liées au forçage dû aux changements climatiques et à la pollution chimique sur les écosystèmes aquatiques seront abordés.

Le changement global (eg. Climatique) et ses effets sur les systèmes physiques et biologiques sont attribuables à des causes naturelles ou aux activités humaines (GIEC/IPPC, 2007). Les activités anthropiques augmentent la production de gaz à effet de serre, entraînant ainsi un réchauffement global de la planète<sup>4</sup>. Ce changement global est un processus progressif qui peut avoir de lourdes conséquences avec le temps, telles que l'augmentation du niveau de la mer, la modification du régime des précipitations et des impacts sur la santé (Khasnis & Nettleman, 2005; VijayaVenkataRaman et al., 2012). Le réchauffement du système climatique semble sans équivoque (GIEC/IPPC, 2007). Au cours de ces dernières décennies, une augmentation de la température au niveau de la Terre a été observée avec deux périodes de réchauffement de 1910 à 1945, et de 1976 à nos jours (Walther et al., 2002). Le niveau moyen de la mer aurait globalement augmenté au cours du siècle passé. Ce réchauffement global est une menace croissante avec des conséquences diverses (Laurance et al., 2011). Par exemple entre 1900 et 2005, les précipitations ont diminué en Afrique dans le Sahel, en Méditerranée, en Afrique Australe et dans une partie de l'Asie du Sud, tandis qu'elles ont augmenté dans l'est de l'Amérique du Nord et du Sud, dans le nord de l'Europe et dans le nord et le centre de l'Asie (GIEC/IPPC, 2007).

Les écosystèmes côtiers sont vitaux pour la planète et revêtent une importance écologique et socio-économique considérable (Harley et al., 2006). Ces systèmes de transition sont continuellement exposés à différentes activités humaines car ils ont de fortes densités de populations. Ces activités exercent des pressions continues sur les écosystèmes, entraînant une

---

<sup>4</sup> Dans le monde scientifique il existe une controverse sur les origines anthropiques du réchauffement climatique. La plupart des scientifiques approuvent le rapport du GIEC Oreskes, N. (Ed.), 2012. Les marchands de doute aux Etats-Unis. Edwin Zaccai et al., Paris., mais certains restent sceptiques et ne valident pas ses conclusions. Ces derniers considèrent que le climat de la planète change globalement et naturellement, et que les causes anthropiques restent impossibles à distinguer du « bruit » naturel. Ils remettent ainsi en question l'impact des rejets de CO<sub>2</sub> sur l'augmentation de la température du globe et l'impartialité des données du GIEC Begley, S., 2007. « The Truth about Denial ». *Newsweek*. U.S. Edition, pp. 20-29..

Begley, S., 2007. « The Truth about Denial ». *Newsweek*. U.S. Edition, pp. 20-29

Oreskes, N. (Ed.), 2012. Les marchands de doute aux Etats-Unis. Edwin Zaccai et al., Paris.

perturbation de leurs fonctionnements, des services associés (Mooney et al., 2009) et une modification des facteurs environnementaux. La combinaison des perturbations associées aux impacts du changement climatique et d'autres facteurs anthropiques tels que la contamination des milieux et la surexploitation de leurs ressources peut avoir un impact sur la résilience de nombreux écosystèmes.

### **1.1. Changement climatique et milieux aquatiques**

Les gaz à effet de serre comme le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et le méthane (CH<sub>4</sub>) permettent naturellement un maintien de la température du globe à des niveaux cléments pour la vie. Plusieurs travaux ont montré que les activités humaines pouvaient impacter la concentration atmosphérique et la distribution de ces gaz à effet de serre (Hansen et al., 1981; Trenberth, 1997; Quay, 2002). La moitié du CO<sub>2</sub> produite par les activités humaines entre 1800 et 1994 est actuellement stockée au niveau des océans (Sabine et al., 2004). Selon le rapport du GIEC/IPPC (2007), les concentrations croissantes en gaz à effet de serre auront à terme d'importants impacts sur la biogéochimie des océans. L'augmentation du taux de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère peut aussi agir sur la couche d'ozone en entraînant l'augmentation potentielle des rayons ultraviolet à la surface de la terre. De même, une acidification des océans est prévue dans les siècles à venir avec l'accroissement continu du CO<sub>2</sub> atmosphérique (Harley et al., 2006; Eissa & Zaki, 2011). Les niveaux de gaz à effet de serre élevés coïncident également avec l'augmentation des températures moyennes (Hansen et al., 1981; GIEC/IPPC, 2001).

Différents impacts sur le milieu marin sont attribués au changement climatique, soit directement (modification de la température de la mer), soit indirectement (modification de la saisonnalité, de la distribution et de l'abondance des espèces) (OSPAR, 2010). La hausse des températures, l'élévation du niveau de la mer, l'acidification des océans, la modification de la pluviométrie, des niveaux des eaux souterraines et des fleuves, et l'apparition de phénomènes de sécheresse et d'inondation, ont été associées au changement climatique (Figure 2). Ces variations peuvent affecter tous les types de milieux aquatiques, des récifs coralliens aux lacs, en passant par les estuaires, les marécages, les fleuves et les rivières (Cochrane et al., 2009). Au niveau des écosystèmes côtiers, l'élévation du niveau de la mer, les variations des teneurs en dioxyde de carbone et l'accroissement de la température des eaux sont les conséquences majeures des effets du changement climatique (Laubier, 2003).

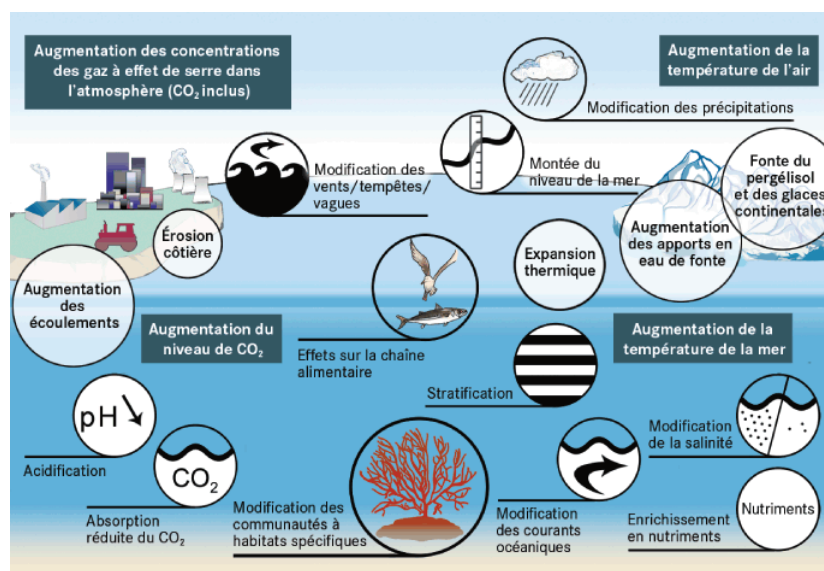


Figure 2 : Impacts dus au changement climatique et à l'acidification des océans (d'après OSPAR, 2010).

### 1.1.1. Changements des facteurs abiotiques

L'augmentation du CO<sub>2</sub> atmosphérique et le réchauffement climatique conduisent à de nombreuses modifications physiques et chimiques à la surface du globe (OSPAR, 2010). La hausse des températures des océans a été largement documentée dans l'Atlantique, le Pacifique et l'Océan Indien (Bindoff & Church, 1992; Parrilla et al., 1994; Levitus et al., 2000; Sheppard, 2001; Fukasawa et al., 2004). Avec l'augmentation deux fois plus rapide des températures minimales nocturnes que des températures maximales diurnes, on note une diminution des températures diurnes (Walther et al., 2002). Les variations de température ne sont pas uniformes à l'échelle mondiale, mais varient selon les régions et les zones de l'atmosphère inférieure (GIEC/IPPC, 2001). Des réchauffements ont été aussi constatés au niveau de la mer Méditerranéenne (Bethoux et al., 1990; Vargas-Yanez et al., 2010). Une hausse de quelques degrés de la température entrainera non seulement un réchauffement au niveau des océans, mais aussi des changements hydrologiques importants impactant les propriétés physiques et chimiques de l'eau (Roessig et al., 2004).

L'élévation du niveau de la mer est l'une des conséquences préoccupantes des effets du changement climatique (Cabanes et al., 2001; Carton et al., 2005). Cette hausse concorde avec le réchauffement et semble être due à l'augmentation thermique et la fonte des glaciers (GIEC/IPPC, 2007). Elle diffère cependant d'une région à une autre du fait de l'influence des

processus de circulation des courants au niveau des océans (Cochrane et al., 2009). Les risques liés à l'élévation du niveau de la mer sont très importants et peuvent être très variables d'une région à une autre, mais aussi très divers dans certaines zones comme les plaines côtières, les grands deltas et les îles coralliennes basses (Laubier, 2003).

Les océans constituent des réservoirs et des agents de redistribution de plusieurs constituants du système climatique (e.g. eau et CO<sub>2</sub>, Curry et al., 2003). Tandis que la majorité des études se sont focalisées sur le réchauffement global et les fluctuations de température dues aux entrées atmosphériques du carbone, il existe peu d'études menées sur les changements de salinité liées aux changements climatiques (Schlenk & Lavado, 2011). Des observations effectuées au niveau des océans Atlantique, Indien et Pacifique montrent une augmentation globale de la salinité (Curry et al., 2003; Boyer et al., 2005). L'augmentation de la salinité au niveau de la Méditerranée est l'une des conséquences possibles du réchauffement du globe (Bethoux et al., 1998). D'ailleurs l'une des conséquences directes de l'élévation du niveau de la mer est l'augmentation du niveau de salinité des estuaires et des aquifères (Hull & Titus, 1986). Au cours des deux derniers siècles l'exposition continue des océans au CO<sub>2</sub> a entraîné une diminution du pH des eaux de 0,1 unité (Cochrane et al., 2009). Et depuis la révolution industrielle on note une augmentation d'environ 30 % de l'acidité des eaux des océans (VijayaVenkataRaman et al., 2012).

### **1.1.2. Impacts du changement climatique sur les milieux côtiers**

Les zones côtières font partie des zones les plus vulnérables face aux effets du changement climatique (Klein & Nicholls, 1999). Les écosystèmes côtiers sont soumis à des forçages d'origine naturelle mais aussi anthropique (Klein & Nicholls, 1999; Scavia et al., 2002; Harley et al., 2006; Overland et al., 2010). Diaz et al. (2008) ont décrit une augmentation du nombre de "zones mortes"<sup>5</sup> au niveau des environnements côtiers dont la surface représente à l'heure actuelle 245000 km<sup>2</sup>. En Afrique de l'ouest les effets du changement climatique ont rendu les zones côtières très sensibles à l'érosion (Niasse et al., 2004). Les effets du changement climatique peuvent avoir des conséquences significatives sur le fonctionnement et la biodiversité de ces écosystèmes (Munang et al., 2010). Ces impacts ont été observés par

---

<sup>5</sup> Les "zones mortes" sont des régions dans lesquelles toute vie est impossible. Elles sont l'une des conséquences de l'impact de perturbations sur les écosystèmes marins. Leur formation est renforcée par l'augmentation de l'eutrophisation côtière.

(Parmesan, 2006) dans différentes parties du monde. L'influence du changement climatique sur les écosystèmes dans le monde constitue une des préoccupations majeures pour la communauté scientifique (Pörtner & Knust, 2007).

Les estuaires et les zones de mangroves sont particulièrement sensibles aux effets du changement climatique. Les estuaires répondent à plusieurs types de forçage (Najjar et al., 2010) : la qualité et la quantité des flux, les variations de température, de flux de CO<sub>2</sub>, d'apport d'eau douce et les fluctuations du niveau de la mer. La vulnérabilité d'un estuaire donné dépend de ces caractéristiques physiques, de sa géomorphologie et de la composition de ses communautés. Chaque estuaire peut donc être vulnérable aux effets du changement climatique à des degrés variables (EPA, 2009). La mangrove se développe entre la zone intertidale des régions tropicales et subtropicales et son état est susceptible d'être un indicateur précoce des effets du changement climatiques (Blasco et al., 1996). La dégradation des zones de mangrove peut conduire à une diminution de la qualité des eaux côtières, une baisse de la biodiversité, et une disparition des zones de nurserie pour les organismes aquatiques (Gilman et al., 2008). Les variations du niveau de la mer, de la température, des précipitations, les concentrations en CO<sub>2</sub> peuvent affecter la distribution et la composition des mangroves (Ellison & Stoddart, 1991; Short & Neckles, 1999).

Depuis plusieurs années, une attention particulière est portée à l'impact du changement climatique sur les systèmes biologiques qui révèle un impact négatif sur les traits d'histoire de vie et la biodiversité des organismes (Brander, 2007 ; Cochrane et al., 2009). La réponse des systèmes biologiques est cependant très variable (Overland et al., 2010). Des travaux ont relié par exemple la modification du sexe ratio observée chez certains mammifères marins, poissons, amphibiens et oiseaux aquatiques au réchauffement climatique (Eissa & Zaki, 2011). L'accroissement de la température peut aussi affecter le niveau d'oxygénation des estuaires entraînant une hausse de la production bactérienne et une augmentation des besoins métaboliques des organismes aquatiques (Najjar et al., 2010). La réduction du pH due aux concentrations croissantes de CO<sub>2</sub> a des implications marquées sur les processus physiologiques des organismes marins, ces effets étant plus marqués chez les invertébrés que chez les poissons (Pörtner et al., 2005). Les récifs coralliens, les mangroves, les estuaires, les marécages et les prairies marines sont parmi les écosystèmes les plus riches, mais également les plus menacés (Burke et al., 2001). L'impact de modifications associées au



changement climatique sur ces habitats est très complexe mais affecte la structure et le fonctionnement de ces écosystèmes.

Sachant que le réchauffement climatique peut affecter, outre la température, la concentration en oxygène, la salinité, et le pH de l'océan et la tolérance des organismes peuvent être impactés et les rendre plus vulnérables (Rijnsdorp et al., 2009). Les effets directs du réchauffement climatique peuvent être néfastes aux performances des organismes au niveau de leur croissance, de leur reproduction, de leur immunisation et de leur comportement (Portner & Farrell, 2008). Par exemple face à un stress thermique, la perturbation de la respiration est la première fonction qui peut limiter la tolérance et la capacité à fournir de l'oxygène aux tissus (Pörtner & Knust, 2007). La réponse des individus face aux changements est variable en fonction de la capacité d'adaptation des espèces (Freitas et al., 2007). Avec les modifications physiologiques, quand la température des eaux résiduelles dépasse un certain seuil, certains poissons modifient leur comportement (Berghahn, 2000), par exemple en augmentant leur vitesse de natation (Peck et al., 2006).

La variabilité de la dynamique des peuplements de poissons et des pêcheries associées est étroitement liée au temps et à la dynamique du climat (Lehadey et al., 2006). Les mécanismes d'action des effets du changement climatique sur les communautés restent encore peu connus car ils s'effectuent sur le long terme. Une modification de la composition et de l'abondance des espèces a été enregistrée suite au réchauffement climatique observé au cours du siècle dernier (Quéro et al., 1998). Friedland et al. (2003) ont décrit que les déclinés récents de l'abondance du saumon de l'Atlantique sont probablement dus aux effets du changement climatique global. Le changement climatique associé à d'autres facteurs comme l'exploitation, les modifications d'habitat et la pollution peuvent aussi modifier l'abondance des espèces marines et probablement causer localement des disparitions (Harley et al., 2006).

## **1.2. Pollution chimique des milieux aquatiques**

Les écosystèmes côtiers subissent d'importantes pressions liées aux stress chimiques, thermiques et bactériologiques. Les effluents urbains, agricoles et industriels sont des sources de polluants pour les milieux aquatiques. Au cours des dernières décennies, les travaux sur l'impact des contaminants se sont plutôt focalisés sur les polluants conventionnels "prioritaires", tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Japenga et al.,

1988; Benlahcen et al., 1997; Baumard et al., 1998), les polychlorobiphényles (PCB) (Roots, 1995; Thompson et al., 1999), les pesticides (Brambilla et al., 1993; Galassi et al., 1993; Sarkar et al., 1997) et les métaux (Di Giulio & Scanlon, 1984; Nriagu, 1992). Cependant ces groupes de composés ne constituent qu'une partie des polluants à prendre en compte dans l'évaluation des risques sur l'environnement (Daughton & Ternes, 1999). Plus récemment les composés perturbateurs endocriniens ont été pris en compte dans les études d'écotoxicologie. Une autre classe de substances émergentes, les produits pharmaceutiques et d'hygiène corporelle (PPCP), est aussi présente dans l'environnement. Parmi ces composés on retrouve les médicaments humains et vétérinaires, les cosmétiques, les compléments nutritionnels, les désinfectants et de nombreux autres composés. La majorité de ces composés sont solubles et persistants dans les environnements aquatiques, bioactifs et peuvent s'accumuler dans les différents milieux (voir synthèse de Brausch & Rand, 2011). Plusieurs travaux ont montré que ces composés sont présents dans les écosystèmes aquatiques (Kummerer, 2009; Fram & Belitz, 2011; Stuart et al., 2011) et ont des effets néfastes sur les organismes aquatiques (Hinfray et al., 2010; Sanchez et al., 2011). Dans la présente étude un intérêt particulier est porté sur la présence des contaminants classiques tels que les HAP, les PCB, les éthers diphenyliques polybromés (PBDEs), les pesticides et les composés perturbateurs endocriniens, et sont décrits ci-après. Ils ont également été mesurés pour caractériser les sites d'étude.

### **1.2.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**

Les HAP sont des composés organiques neutres apolaires, constitués d'atomes de carbones et d'hydrogènes avec au moins deux cycles aromatiques. Ils sont représentés par plus de 100 composés différents (Douben, 2003). Les hydrocarbures saturés et les hydrocarbures insaturés sont les deux grands groupes d'hydrocarbures classés en fonction du nombre d'atomes de carbone et de la nature des liaisons carbone-carbone. Parmi ces composés figurent les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui sont composés d'au moins un cycle benzénique et qui sont formés lors de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de composés organiques.

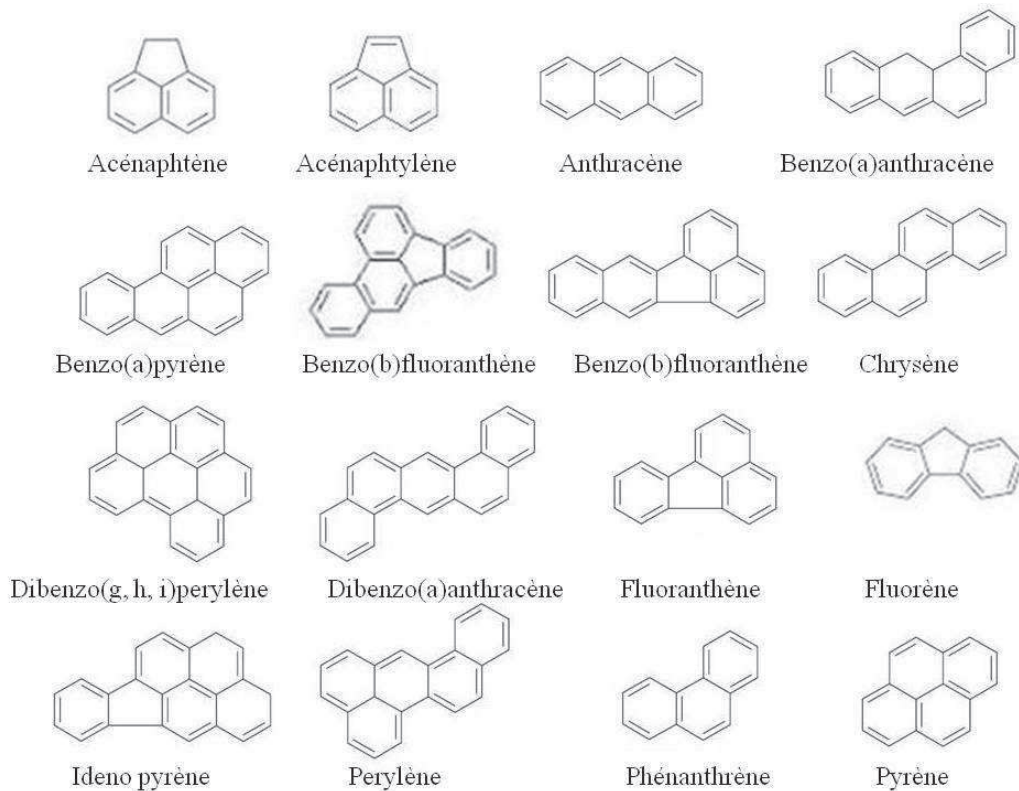
Les sources majeures d'émission des HAP sont naturelles, domestiques, industrielles et agricoles (Ravindra et al., 2008). Dans la nature les sources naturelles de HAP sont les incendies de forêts, les éruptions volcaniques et les filtres naturels du pétrole. Généralement

les concentrations de HAP dues à ces sources sont très faibles comparées à celles d'origine anthropique (Witt, 1995). Les émissions domestiques sont des sources possibles de HAP, principalement associés à la combustion du charbon, du pétrole et du gaz, des ordures ou d'autres substances organiques (Ravindra et al., 2008). Elles apportent une contribution significative aux émissions de HAP, surtout dans les pays en voies de développement. Tous les moyens de transport contribuent également de manière significative aux sources mobiles de HAP (Ravindra et al., 2008). Le secteur industriel représente l'une des plus grandes sources d'émission de HAP qui sont alors émis par les machines et les incinérateurs, et la fabrication de certains composés dans de nombreuses industries, particulièrement en pétrochimie.

Le transfert des HAP vers les zones côtières se fait par l'intermédiaire du compartiment atmosphérique et des eaux de surface. Une grande majorité des HAP se retrouve dans les milieux aquatiques suite à des fuites accidentelles d'hydrocarbures, à des rejets d'effluents industriels et domestiques, à des ruissèlements, aux émissions des véhicules et aux incendies de forêts (Baumard et al., 1999; Witt & Trost, 1999; Maioli et al., 2010). Dans l'environnement c'est au niveau des estuaires et des zones côtières, à proximité des zones urbaines, que les concentrations de HAP sont les plus élevées. Dans ces zones la concentration dans le sédiment est toujours plus élevée que dans la colonne d'eau à cause du faible taux de dégradation due en partie au manque d'oxygène nécessaire au clivage des HAP (Cardellicchio et al., 2007). Leur distribution est liée au type de sédiments (autochtones ou allochtones), à l'environnement sédimentaire (marécageux, limnique ou saumâtre-marin), au spectre de végétation, aux niveaux nutritifs (eutrophiques ou oligotrophes), mais aussi aux états physico-chimiques de l'environnement (pH, potentiel redox, température) (Ogala & Iwegbue, 2011). La distribution des HAP est aussi très largement contrôlée par leurs caractéristiques comme la solubilité et le caractère hydrophobe. On retrouve les HAP sous différentes formes dans l'environnement aquatique suite à leur dégradation par photodégradation, par biodégradation (micro organismes) et par métabolisation (autres organismes) (Douben, 2003).

Les HAP sont des composés qui sont volatiles à température ambiante avec des caractéristiques physiques et chimiques plus ou moins différents en fonctions de chaque produit. Parmi tous les HAP retrouvés dans la nature, 16 ont été sélectionnés comme prioritaires par l'Agence pour la protection de l'environnement des Etats Unis (EPA) (Figure

3). L'accumulation de ces composés dépend de la capacité de métabolisation et d'élimination par les organismes (Livingstone, 1993). La biotransformation des HAP se fait par 3 voies principales, dont la plus importante est la voie des diol-époxydes sous l'action des cytochromes. La voie des O-quinones et la voie du radical cation sont les deux autres voies possibles. Les HAP sont principalement métabolisés par l'activité catalytique liée au système du cytochrome P450 (Sturve et al., 2006).



**Figure 3 : Structure des 16 HAP prioritaires définis par l'EPA-US (Agence pour la protection de l'environnement des Etats Unis).**

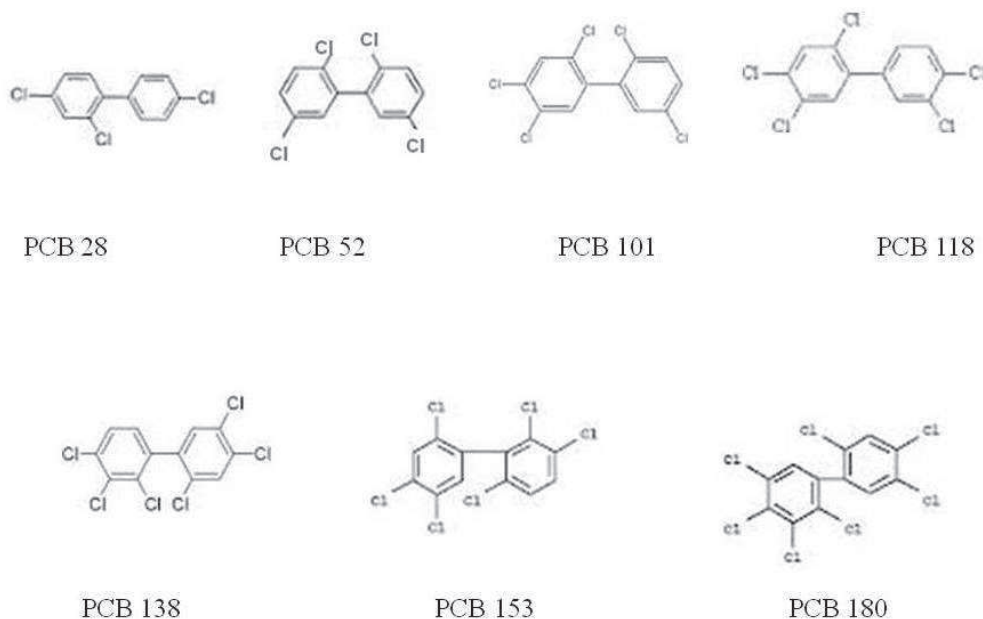
Une fois absorbés et métabolisés par les organismes, ces HAP peuvent s'accumuler et agir comme des procarcinogènes réactifs avec les groupements nucléophiles des macromolécules cellulaires (Douben, 2003). Leur toxicité est donc essentiellement due à l'accumulation de leurs métabolites au niveau de l'organisme.

La présence des HAP et de leurs métabolites chez les organismes aquatiques est largement documenté (van der Oost et al., 1994; Baumard et al., 1998; Payne et al., 2003). Les HAP sont généralement liposolubles et présentent une faible hydrosolubilité. Les Kow et Kd des 16 HAP prioritaires sont listés dans le Tableau 1.

Dans la présente étude la contamination par les 16 HAP prioritaires a été caractérisée dans les différents sites échantillonnés.

### 1.2.2. Polychlorobiphényles (PCB)

Les PCB sont des composés aromatiques de synthèse dont la structure est telle que les atomes d'hydrogène de la molécule de biphenyle (deux cycles benzéniques reliés par un seul lien carbone-carbone) peuvent être remplacés par un nombre d'atomes de chlore allant jusqu'à dix (Figure 4).



*Figure 4 : Structure de quelques PCB prioritaires.*

Les PCB sont des produits qui ont été largement utilisés dans les industries énergétiques, dans les transformateurs électriques, dans les condensateurs et les équipements hydrauliques (comme liquides diélectriques), les fluides hydrauliques, les fluides caloporteurs, les adjuvants des lubrifiants, les peintures, les vernis, les adhésifs et les plastiques (PNUE, 2001).

*Tableau 1 : Quelques propriétés chimiques des 16 HAP définis comme polluants prioritaires dangereux par l'EPA-US (d'après Mackay et al., 1992). Le coefficient de partage octanol-eau Kow correspond au rapport de la concentration de pesticide dans deux liquides non mélangés, l'octanol et l'eau. Les composés à forte valeur de Kow (c'est-à-dire facilement solubles dans l'octanol et moins dans l'eau) s'accumulent dans les organismes. Le coefficient de partage sol-eau Kd est le coefficient de partage d'une molécule entre la phase particulaire et la phase dissoute.*

<b>Substance</b>	<b>Masse molaire</b>	<b>Log Kow</b>	<b>Log Kd</b>
Naphthalène	128	3.37	1.30 × 10 <sup>4</sup>
Acénaphtylène	152	4.00	2.50×10 <sup>3</sup>
Acénaphène	154	3.92	4.60×10 <sup>3</sup>
Fluorène	166	4.18	
Phénanthrène	178	4.57	1.40×10 <sup>4</sup>
Anthracène	178	4.54	1.40×10 <sup>4</sup>
Pyrène	202	5.18	3.80×10 <sup>4</sup>
Fluoranthène	202	5.22	3.80×10 <sup>4</sup>
Benzo[a]anthracène	228	5.91	1.38×10 <sup>6</sup>
Chrysène	228	5.91	2.00×10 <sup>5</sup>
Benzo[b]fluoranthène	252	5.80	5.50×10 <sup>5</sup>
Benzo[k]fluoranthène	252	6.00	5.50×10 <sup>5</sup>
Benzo[a]pyrène	252	5.91	5.50×10 <sup>6</sup>
Dibenzo[a,h]anthracène	278	6.75	3.30×10 <sup>6</sup>
Indeno[1,2,3-dc]pyrène	276	6.50	1.60×10 <sup>6</sup>
Benzo(g,h,i)pérylène	276	6.50	1.60×10 <sup>6</sup>

*Tableau 2 : Kow de quelques PCB prioritaires (d'après Hawker & Connell, 1988).*

<b>PCB</b>	<b>Kow</b>
<b>28</b>	5,67
<b>52</b>	5,84
<b>101</b>	6,38
<b>118</b>	6,74
<b>138</b>	6,83
<b>153</b>	6,92
<b>158</b>	7,02
<b>180</b>	7,44

Les PCB sont largement distribués dans les environnements aquatiques. Les transports atmosphériques, les infiltrations, les rejets industriels et les pollutions accidentelles constituent les différentes sources de pollutions aux PCB dans les écosystèmes aquatiques (Binelli & Provini, 2003a). Il existe 209 congénères de PCB qui se différencient de par le nombre et la position des atomes de chlore sur une molécule de diphényle, mais aussi de par leur activité biologique et leur différentes toxicités (Cardellicchio et al., 2007). Leur production cumulée dans le monde est estimée à plus de 1,3 millions de tonnes (Breivik et al., 2007). Bien que leur commercialisation soit interdite depuis les années 1980 ils restent présents dans l'environnement. En Afrique de l'ouest même si les sources de PCB n'ont pas été explicitées dans l'inventaire des PCB dans le monde (Breivik et al., 2002), Gioia et al. (2011) ont montré qu'il y en avait d'importantes sources sur les côtes et des efforts sont nécessaires pour les localiser. Les PCB émis dans l'atmosphère peuvent être transportés sur de très longues distances (Wania & MacKay, 1996).

La persistance dans l'environnement des PCB découle de leurs propriétés physiques et chimiques particulières. Ils sont très peu solubles dans l'eau et sont généralement retrouvés dans le sédiment et les organismes. Ils ont tendance à s'accumuler dans les lipides des organismes et à s'adsorber sur les matières en suspension. Du fait de leur nature très lipophile et de leur stabilité, les PCB ont tendance à se bioaccumuler et à se bioconcentrer et sont fréquemment détectés au niveau des tissus (Safe, 1994). Les sédiments de tous les milieux aquatiques et les sols des milieux tempérés sont des endroits d'accumulation primaire des PCB dans l'environnement (Vives et al., 2007). Les PCB les plus faiblement chlorés sont les plus facilement biodégradables. A l'opposé la bioconcentration et la bioaccumulation des PCB fortement chlorés sont plus élevées et ils persistent dans l'environnement. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de PCB dans de nombreux cours d'eau (Chevreuil et al., 1987; Binelli & Provini, 2003a; Harrison & Whitfield, 2006). Leur présence a été aussi détectée chez de nombreux poissons (Yim et al., 2005; Moreau et al., 2007; Stahl et al., 2009).

Certains PCB sont considérés comme des perturbateurs endocriniens (Pait & Nelson, 2002). Certains de leurs métabolites sont des inhibiteurs d'œstradiol, et ils augmentent indirectement l'activité œstrogénique en augmentant leur biodisponibilité (Kester et al., 2000). Sept PCB ont été ciblés par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) et leurs Kow sont listés dans le tableau 2. Dans la présente étude ces 7 congénères ont été quantifiés lors de la caractérisation des sites d'échantillonnage.

### 1.2.3. Polybromodiphényles-éthers (PBDE)

Les PBDE sont d'autres composés qui ont une structure similaire à celle des PCB (Figure 5). Ils sont synthétisés par bromination d'un radical diphenyle-éther en présence d'un catalyseur (Rahman et al., 2001).

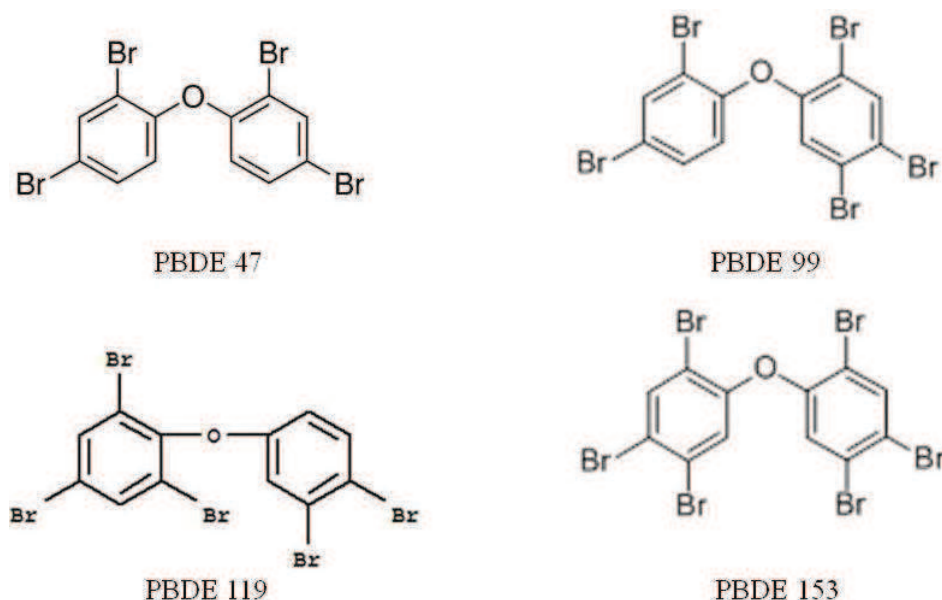


Figure 5 : Structure de quelques PBDE présents dans l'environnement.

Les PBDE ont été pendant longtemps utilisés comme des retardateurs de flamme dans les industries. Ils sont toujours utilisés comme additif dans les appareillages électriques et les textiles utilisés pour les équipements incendie (de Wit, 2002). Lors d'un feu, les radicaux libres formés dans la phase gazeuse agissent avec les PBDE (Rahman et al., 2001). Ils sont retrouvés dans l'environnement par des apports atmosphériques (McDonald, 2002). Parmi les principaux congénères de PBDE présents dans le biote on retrouve les BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 et BDE-154. Le BDE-47 est le plus abondant, représentant parfois plus de 50 % des PBDE totaux (Watanabe & Sakai, 2003). Dans l'environnement les composés retardateurs de flamme sont présents sous forme de mélange de congénères et sont retrouvés principalement au niveau des sédiments, de l'atmosphère, des sols et des organismes (Figure 6).



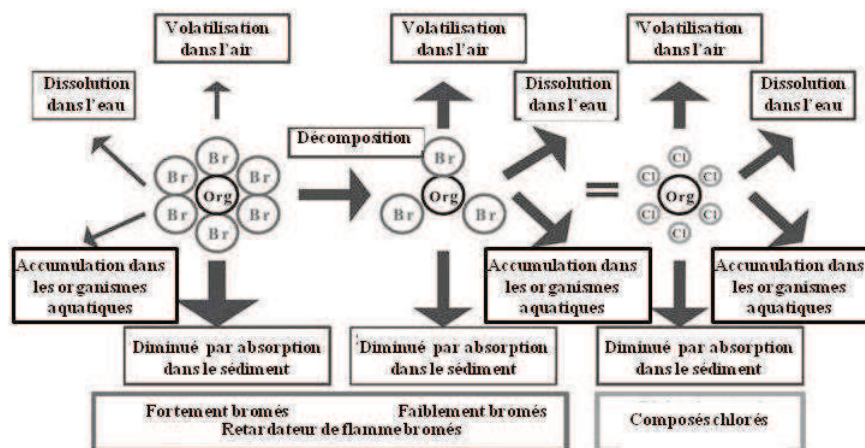


Figure 6 : Représentation schématique du devenir des retardateurs de flamme dans l'environnement (d'après Watanabe & Sakai, 2003).

Les PBDE ont tendance à s'accumuler dans le sédiment (de Wit, 2002). Ils ont une pression de vapeur faible, et leur Kow est compris entre 6,5 et 7,0 (Watanabe & Tatsukawa, 1990). Dans l'environnement les PBDE fortement bromés sont moins mobiles, du fait de leur faible volatilité, de leur faible solubilité dans l'eau, de leur capacité à se bioaccumuler, mais aussi de leur forte absorption dans le sédiment (Watanabe & Sakai, 2003). Les autres PBDE ont des comportements et des devenir similaires à ceux des PCB (Watanabe & Sakai, 2003). Ces composés très hydrophobes et résistants à la dégradation ont été détectés chez plusieurs espèces de poissons (Hale et al., 2001; Boon et al., 2002; Erdogrul et al., 2005), dans le sédiment, mais aussi chez l'homme.

Les retardateurs de flamme, et en particulier les PBDE, ont des effets cancérigènes, neurotoxiques et tératogènes (Legler & Brouwer, 2003). Certains PBDE sont également reconnus comme étant des perturbateurs endocriniens (Legler & Brouwer, 2003).

Dans la présente étude la contamination en PBDE (BDE 47, 99, 119, 153) a été caractérisée dans les différents sites échantillonnés.

### 1.2.4. Pesticides

Les pesticides et leurs résidus sont parmi les composés qui affectent le plus les écosystèmes et les organismes aquatiques (Islam & Tanaka, 2004). Un pesticide est défini comme « toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs (y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales) et les espèces

indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites...» (FAO, 2003).

Les pesticides peuvent être classés par catégorie selon leur utilisation et les cibles qu'ils visent. Parmi les pesticides les plus couramment utilisés figurent les insecticides qui sont utilisés pour lutter contre les insectes, les fongicides qui sont destinés à lutter contre les champignons et les moisissures et les herbicides qui permettent l'élimination des mauvaises herbes (OMS, 2004). La classification chimique scinde quant à elle 2 grandes catégories de pesticides : (1) les organiques naturels d'origine animale ou végétale ou de synthèses, (2) les inorganiques dérivés de minéraux (souffre, cuivre, sels, etc.). Les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les triazines appartiennent aux pesticides organiques. Ils sont retrouvés dans tous les types d'environnements. L'épandage aérien, les apports atmosphériques, les ruissellements des eaux de pluies, le lessivage des sols sont les principales sources de pollution aux pesticides au niveau des écosystèmes aquatiques. Les pesticides et les fertilisants sont abondamment utilisés pour faciliter l'augmentation de la production horticole, par exemple en Afrique de l'ouest (Manirakiza et al., 2003). Ils sont aussi utilisés dans la lutte contre les maladies vectorielles. Dans l'environnement les pesticides organochlorés sont retrouvés dans l'atmosphère, l'eau et le sédiment (Iwata et al., 1993). Bien qu'il existe une législation pour restreindre l'utilisation et la production des organochlorés, on note encore une production et la présence de stocks importants dans certains pays. Par exemple il a été reporté l'existence de plusieurs tonnes de stocks obsolètes de pesticides dans certains pays en voie de développement (Manirakiza et al., 2003; Roche & Tidou, 2009).

Prenons l'exemple d'un organochloré comme le dichloro-diphényltrichloroéthane (DDT) qui a été largement produit et utilisé dans l'agriculture et pour lutter contre les maladies vectrices dans les années 1940 (Figure 7). Le DDT et ses métabolites, le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) et le dichlorodiphényldichloroéthane (DDD) très persistants, se retrouvent dans l'environnement. Leur utilisation est limitée, voire interdite, dans de nombreux pays et depuis plusieurs années une législation et un contrôle permettent une régulation de leur utilisation. Bien que leur utilisation soit bannie depuis les années 70

dans les pays développés, ces composés restent présents dans l'environnement à cause de leur persistance. Le DDT est encore produit et utilisé en Asie, en Afrique et dans le Pacifique. Les tonnages restent élevés, au moins 3950 tonnes de substance active en 2007 selon l'estimation de PNUE (2009) malgré les restrictions à l'utilisation du DDT par la convention de Stockholm.

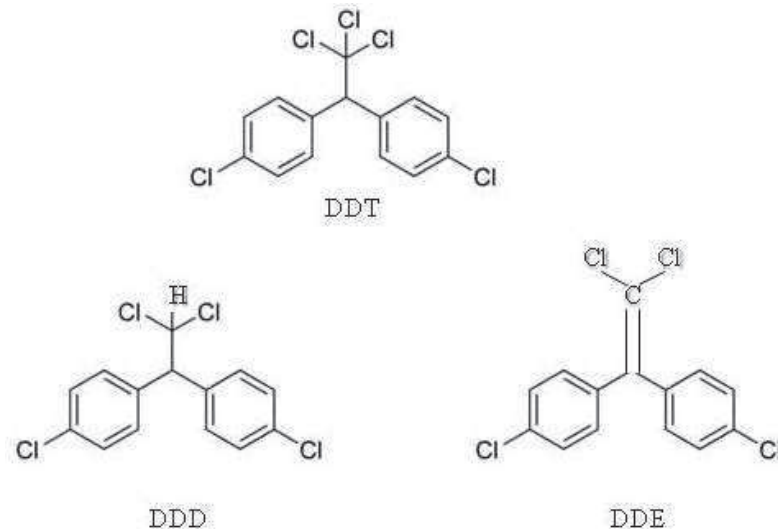


Figure 7 : Structure du DDT et de ses métabolites (DDD et DDE) présents dans l'environnement.

Les organophosphorés et les carbamates présentent les mêmes caractéristiques, ils inhibent la cholinestérase qui est une enzyme indispensable au fonctionnement du système nerveux. Ces classes de composés sont plus hydrosolubles que les organochlorés. Ces derniers et leurs métabolites sont très stables et peuvent s'accumuler à différents niveaux de la chaîne trophique (Binelli & Provini, 2003b). La majorité de ces pesticides n'étant pas rapidement dégradables, ils s'accumulent dans l'environnement en grand nombre. Leur utilisation abusive peut altérer la qualité de l'eau dans certaines zones et par conséquent les organismes qui y vivent. Au-delà de certaines concentrations dans l'eau, ils peuvent induire des effets toxiques sur les êtres vivants et perturber la production d'eau potable.

### 1.2.5. Perturbateurs endocriniens (PE)

Les PE sont des agents exogènes qui peuvent interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action, ou l'élimination d'hormones naturelles responsables du maintien, de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement dans l'organisme (EPA, 1997).

Une large variété de composés anthropiques de structures très diverses possèdent des effets œstrogénique (Jobling et al., 1995), anti-œstrogénique (Panter et al., 2002), androgénique (Katsiadaki et al., 2002) ou anti-androgénique (Bayley et al., 2003). L'exposition à des concentrations significatives de PE peut perturber la fonction cellulaire d'un organisme, mais aussi physiologique, en agissant sur les mécanismes de régulation endocrine. Les PE agissent à différents niveaux. Par exemple, ils peuvent (1) mimer l'action de l'hormone naturelle en prenant sa place au niveau du récepteur ; (2) empêcher l'hormone naturelle d'agir en entraînant la saturation de ses récepteurs et agir en tant qu'agonistes ou antagonistes de récepteur d'hormone, (3) changer la production d'hormone à sa source endocrinienne, (4) changer la production d'hormones entraînant une stimulation ou une inhibition de la tige pituitaire à l'hypothalamus, (5) changer la métabolisation enzymatique hépatique des hormones, et (6) changer la concentration ou le fonctionnement d'hormones libres dans le sérum (Guillette & Gunderson, 2001).

Les PE<sup>6</sup> sont capables d'imiter ou d'induire une réponse œstrogénique chez les organismes (Campbell et al., 2006). Par exemple ils ont la capacité de se fixer aux récepteurs hormonaux. L'un des récepteurs les plus largement étudié est le récepteur des œstrogènes (ER). Ces récepteurs ont pour rôle de moduler l'expression de gène cible en présence d'œstrogène. Les PE sont capables de se lier avec ces récepteurs des œstrogènes (ER) et d'entraîner la transcription de gènes œstrogène-dépendants ou de bloquer le site actif de la fixation de l'œstrogène naturel. Des études basées sur différents mécanismes d'action moléculaires et cellulaires ont utilisé plusieurs essais *in vivo* et *in vitro* pour détecter l'activité œstrogénique des polluants présents dans l'environnement (Petit et al., 1999; Laville et al., 2004). Ces études ont permis d'avoir une meilleure compréhension sur l'action de ces PE.

Dans l'environnement les PE peuvent se retrouver dans les eaux de surface, les eaux usées, les eaux résiduelles, les eaux souterraines, les organismes aquatiques et même dans l'atmosphère (Figure 8) (Campbell et al., 2006). Leur transport et leur répartition dans l'environnement dépendent de leurs propriétés physico-chimiques. Dans les eaux douces, les estuaires et les milieux marins, les PE ont été retrouvés avec des concentrations plus élevées dans les sédiments comparées aux autres compartiments (Mills & Chichester, 2005; Campbell et al., 2006).

---

<sup>6</sup> Dans tout le manuscrit « PE » désignera un perturbateur endocrinien œstrogénique.

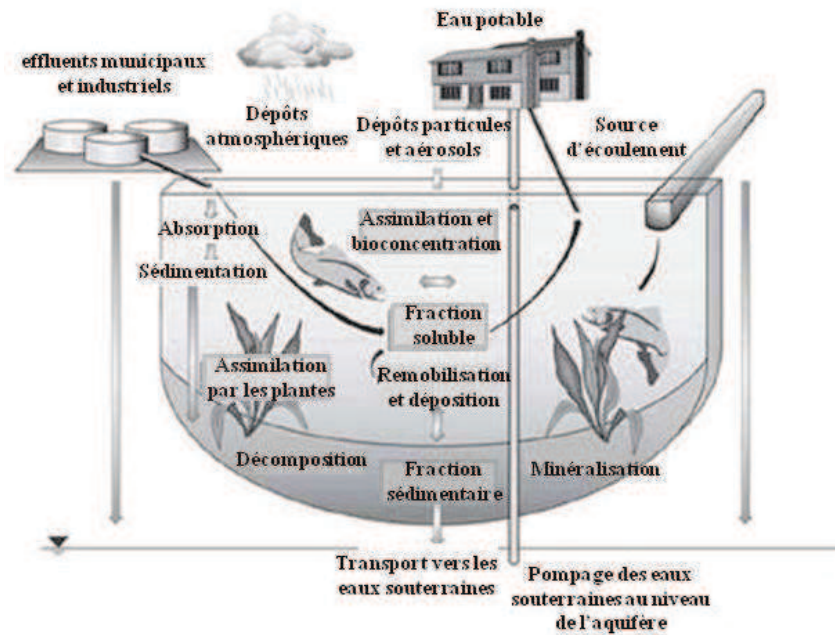


Figure 8 : Différentes sources potentielles du transport et du devenir des perturbateurs endocriniens œstrogéniques dans l'environnement (d'après Campbell et al., 2006).

Les différentes classes de composés perturbateurs endocriniens sont : les hormones stéroïdiennes (Desbrow et al., 1998), les phytoestrogènes et les mycoestrogènes (Singleton & Khan, 2003), les phthalates (Vethaak et al., 2005), les PCB (Vega-López et al., 2006), les pesticides (Roy et al., 2009) et PBDE (Hamers et al., 2006). Le mécanisme d'action et les propriétés de certains de ces composés sont maintenant bien connus (tableau 3).

*Tableau 3 : Quelques composés à activité œstrogéniques confirmée (ou suspectée) et leurs propriétés retrouvées dans la littérature. (ND) non disponible. Koc caractérise la capacité d'un composé à être adsorbé par la matière organique. (a) facteur d'équivalence œstrogénique exprimé en équivalents en estradiol. (b) facteur d'équivalence œstrogénique exprimé en équivalents en 17-β-estradiol. (pKa) constante d'ionisation (d'après Campbell et al., 2006).*

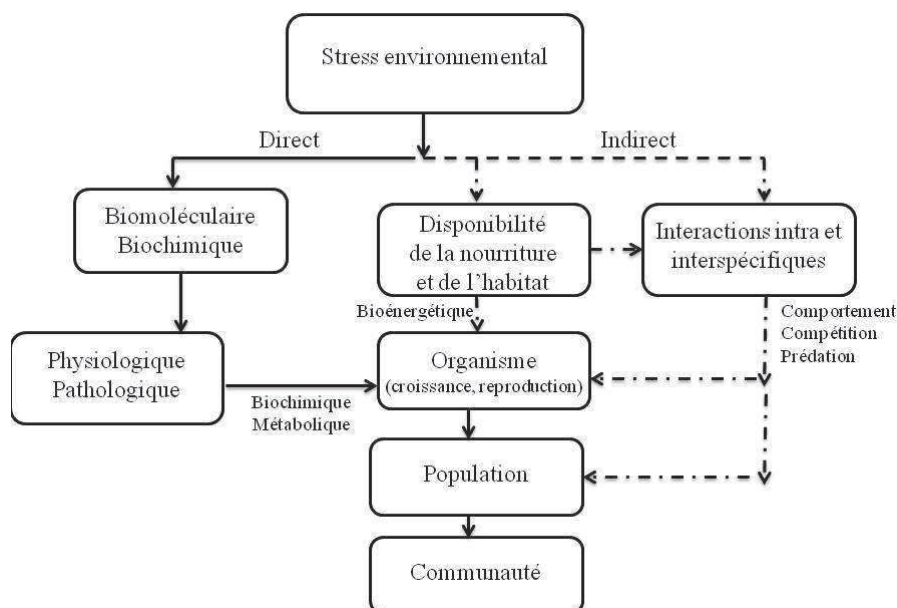
Perturbateurs endocriniens	Log Koc (1/kg)	Solubilité (mg/l)	Facteur d'équivalence œstrogénique	pKa
<b>Estradiol</b>	2,55 - 4,01	13,0 - 32,0	1,0a	10,5 - 10,71
<b>17 β-Estradiol (E2)</b>	3,10 - 4,01	13	1,0b	10,71
<b>Estrone (E1)</b>	2,45 - 3,34	6,0 - 13,0	0,1 -1,0a ; 0,01 - 0,1b	10,3 - 10,8
<b>Ethinylestradiol (EE2)</b>	2,91 - 3,04	4,8	0,8 - 1,9b	ND
<b>Estriol (E3)</b>	2,13 - 2,62	32	0,01 - 0,08b	10,4
<b>Bisphénol A</b>	2,50 - 6,60	120 - 300	2,3x10 <sup>-5</sup> - 9,0x10 <sup>-4</sup> a	9,6 - 11,3
<b>Nonylphénol (NP)</b>	3,56 - 5,67	4,9 - 7,0	2,3x10 <sup>-5</sup> - 9,0x10 <sup>-4</sup> a 7,2x10 <sup>-7</sup> - 1,9x10 <sup>-2</sup> b	10,28
<b>Ethoxylates de nonylphénol (NP1EO- NPnEO)</b>	3,91 - 5,64	3,02 - 7,65	2,0x10 <sup>-7</sup> - 1,3x10 <sup>-5</sup> b	ND
<b>Octylphénol</b>	3,54 - 5,18	12,6	1,0x10 <sup>-5</sup> - 4,9x10 <sup>-4</sup> b	ND

La majorité des PE et leur métabolites peuvent se bioaccumuler et se biomagnifier à cause de leur lipophilie et leur persistance dans l'environnement en est accrue (Fossi et al., 2002). Chez des organismes aquatiques exposés à des PE, ces composés entraînent des réponses physiologiques anormales avec une induction de la vitellogénine chez les mâles (Arukwe et al., 2000; Rodgers-Gray et al., 2000; Barucca et al., 2006). Des modifications du comportement sexuel ont été observées chez des poissons mâles exposés à des perturbateurs endocriniens tels que E2 et ocyplphenol (Gray et al., 1999; Bjerselius et al., 2001). D'autres auteurs ont observé une suppression de ce comportement chez des mâles exposés aux E2 (Oshima et al., 2003). Plusieurs travaux en laboratoire ont montré que l'exposition à des PE pouvait avoir des effets sur la reproduction des poissons (Brion et al., 2004; Nash et al., 2004).

Les PE font parti des composés préoccupant que l'on retrouve dans l'environnement. Du fait de la diversité des PE, la présente étude s'est focalisée sur l'évaluation de leur œstrogénicité, au lieu de déterminer le profil des PE présent sur la zone d'étude.

### **1.3. Biomarqueurs et impact du stress environnemental à différents niveaux d'organisation chez les poissons**

Les écosystèmes côtiers ont des fonctionnements relativement complexes soumis à des variations spatiales et temporaires et à de multiples stress (Adams, 2005). Les effets de ces stress ont été largement documentés (van der Oost et al., 2003) et peuvent se manifester à différents niveaux d'organisation biologique allant des processus moléculaires au maintien des populations (Clements, 2000; Geeraerts & Belpaire, 2010). Lors du contact entre un organisme et un polluant, les premières réponses de l'organisme sont observées au niveau moléculaire. Ces réponses précoces sont susceptibles d'apporter une information relative au risque encouru par l'individu, voire par la population. Le stress environnemental peut induire diverses réponses biologiques chez les poissons, de la réponse biochimique à la population et jusqu' à la communauté (Figure 9) (Adams, 2002).



*Figure 9 : Relations entre stress environnemental et effets directs et indirects sur les systèmes biologiques. Les effets directs affectent les organismes principalement via les processus biochimiques et métaboliques, tandis que les effets indirects sont influencés par le biote via la disponibilité de la nourriture, de l'habitat et des interactions intra et interspécifiques (d'après Adams, 2005).*

### 1.3.1. Réponses biochimiques et moléculaires

#### 1.3.1.1. Métabolisme des xénobiotiques

La biotransformation des composés naturels ou synthétiques se fait en plusieurs étapes et produit des molécules plus hydrosolubles. Au cours de cette réaction, les composés sont transformés en métabolites après une réaction de fonctionnalisation (ajout d'un groupement fonctionnel) suivie d'une réaction de conjugaison (ajout d'un groupement polaire) (Livingstone, 1998). Chez les animaux la majeure partie des enzymes permettant la biotransformation est présente en grande quantité dans le foie (Livingstone, 1998). Un nombre important de ces enzymes est induit par les xénobiotiques. Les variations des activités des enzymes ont été largement documentées chez les poissons et utilisées comme indicateur dans la surveillance des milieux aquatiques (Lindstrom-Seppa & Oikari, 1989, 1990; Celander & Forlin, 1995).

Plusieurs enzymes sont donc sollicitées lors de la biotransformation des xénobiotiques. Lors de la réaction de phase I, la majorité des xénobiotiques est catalysée par les enzymes à monooxygénase microsomale telles que les cytochromes P450, les cytochromes b5, et les



NADPH cytochrome P450 réductase (van der Oost et al., 2003). Ces enzymes sont responsables de l'hydroxylation des liaisons saturées carbone-hydrogène, de l'époxidation des doubles liaisons carbone-carbone, de l'oxydation des hétéroatomes, des réactions de désalkylation (Meunier et al., 2004). Chez les poissons les monoxygénases à cytochrome P450 sont parmi les enzymes jouant un rôle majeur dans le métabolisme oxydatif de phase I (van der Oost et al., 2003). Les cytochromes P450 (CYP) sont des hémoprotéines intervenant dans le métabolisme oxydatif des substances endogènes lipophiles et exogènes. Ces réactions d'oxydation nécessitent la présence du NADPH et du NADP comme cofacteur (Figure 10). Le cycle catalytique du cytochrome débute par l'interaction du substrat au niveau d'un groupement hydrophobe avec le site actif. Le transfert d'un électron provenant de la NADPH (NADPH-cytochrome P450 réductase) à cette liaison provoque une modification entraînant une réduction du fer. Le complexe obtenu se lie à un ligand tel que l'O<sub>2</sub> et est réduit par un second électron provenant du cytochrome b5. Ce nouveau complexe est protoné par une molécule d'eau par exemple. Un second transfert d'un proton (H<sup>+</sup>) entraîne la libération une molécule d'eau. Le substrat hydroxylé se détache et l'enzyme revient à son état initial en fixant un nouveau substrat. Cependant en absence de substrat, le cycle catalytique reste fonctionnel et peut générer la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ERO).

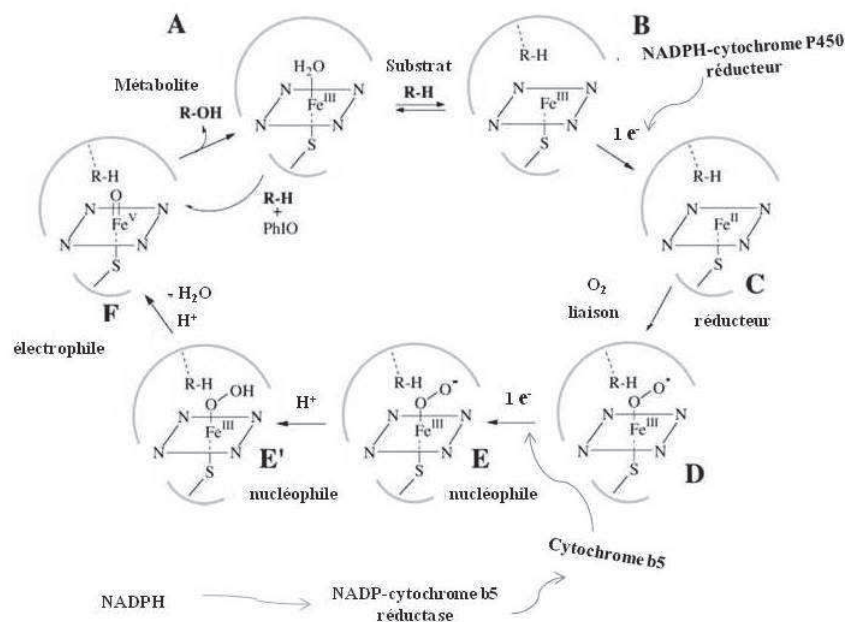


Figure 10 : Cycle catalytique du cytochrome P450 (d'après Meunier et al., 2004).

Chez les poissons, le CYP 1A représente la sous famille qui prend en charge la biotransformation d'une multitude de xénobiotiques (HAP, PCB, dioxines, etc) (van der Oost et al., 2003). L'expression de cytochrome P450 1A est régulée de façon à permettre une adaptation de l'organisme, mais peut aussi être influencée par plusieurs facteurs. La transcription du gène de CYP 1A est liée au récepteur AhR (récepteurs aux hydrocarbures aromatiques). L'AhR est un récepteur nucléaire, dont les ligands peuvent être endogènes ou exogènes. La plupart des enzymes de phase II est aussi régulée par des récepteurs nucléaires. Ces composés tels que le TCDD (2,3,7,8 tétrachlorodibenzo-p-dioxin) et les HAP sont des composés exogènes types du récepteur AhR. La fixation du ligand sur le récepteur AhR entraîne son détachement du complexe protéique dans lequel il se trouvait (Figure 11). Le complexe ligand-récepteur formé va migrer dans le noyau et former un dimère avec l'Arnt. Le complexe AhR-Arnt se fixe au niveau des promoteurs des gènes cibles, entraînant ainsi leur transcription. Cependant il est possible que des composés comme les imidazoles induisent l'expression du CYP 1A via une voie de signalisation intracellulaire alternative (Babin et al., 2005). Il est maintenant connu que la synthèse du CYP peut être modulée par des hormones telles que l'œstrogène (Navas & Segner, 2001).

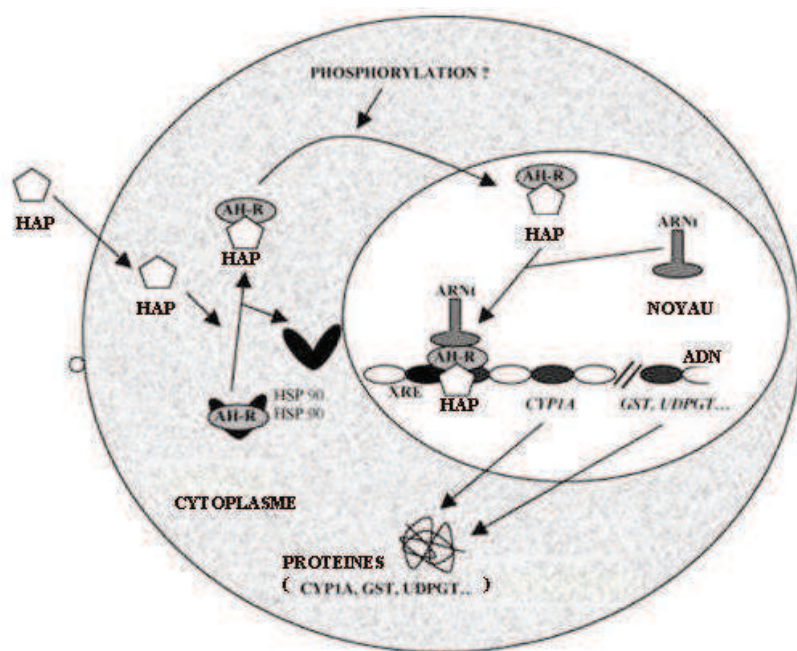


Figure 11 : Mécanisme d'induction du CYP P450 1A par les HAP (d'après Reynaud & Deschaux, 2006).

L'induction des enzymes de biotransformations tel quel l'UDP glucuronosyl-transférase (UDPGT) et la glutathione S-transférase (GST) peut aussi se faire via le récepteur AhR (Figure 10). Le substrat obtenu après la phase I peut alors être éliminé, se fixer ou subir

alors une réaction de fonctionnalisation. Au cours de la réaction de phase II, les GST, les UDPGT et la sulfotransférase, la NADPH ménadione oxydoréductase et l'aldéhyde déshydrogénase participent au métabolisme (van der Oost et al., 2003).

#### ***1.3.1.1.1. Activité EROD***

Au cours de la réaction de phase I un groupement polaire est attaché sur les xénobiotiques lipophiles par oxydation, réduction ou hydrolyse (Behrens & Segner, 2001). Chez les poissons cette réaction se fait en partie via l'intermédiaire du cytochrome P450, plus particulièrement le cytochrome de la sous famille P4501A, qui joue un rôle majeur dans la métabolisation de ces composés. Cette enzyme peut être induite par de nombreux composés environnementaux tel que les PAH, les PCB, les dibenzodioxines polychlorées (PCDD), les dibenzofuranes polychlorés (PCDF) ou les pesticides (Goksoyr & Forlin, 1992; Bucheli & Fent, 1995). L'induction du CYP 1A par les xénobiotiques peut passer par l'activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) (Figure 11). Chez les poissons, plusieurs techniques ont été utilisées pour mesurer l'induction du cytochrome. Parmi ces techniques la mesure de l'activité catalytique par le dosage de l'activité 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD), largement utilisée chez les poissons, semble être la plus sensible pour la détermination des réponses induites du CYP 1A (Martinez-Gomez et al., 2006). Plusieurs travaux ont montré une induction de cette enzyme chez les tilapias (Gadagbui et al., 1996; Shailaja & D'Silva, 2003; Pathiratne et al., 2009). L'exposition à des métaux (Sanchez et al., 2005), à des perturbateurs endocriniens (Arukwe et al., 1997) et à des pesticides (Figueiredo-Fernandes et al., 2006) peuvent entraîner une inhibition de l'activité EROD chez les poissons. Par contre Chandrasekera et al. (2008) n'ont pas observé d'effets significatifs à la suite de l'exposition au cadmium du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*). L'induction de cette enzyme peut être considérée comme un marqueur d'exposition à des contaminants chez les poissons. En plus d'être corrélée avec la présence de certains composés, il existe aussi une corrélation entre la réponse de l'activité EROD et d'autres indicateurs comportementaux. La corrélation entre la réduction des performances de nage observées chez le gobie (*Pomatoschistus microps*) et le bar (*Dicentrarchus labrax* L.), et l'inhibition de l'activité EROD mesurée après exposition à des métaux et des pesticides (respectivement) suggère l'existence d'une liaison entre ces observations qui pourrait être justifiée par une réduction de la capacité de détoxification (Vieira et al., 2009; Hernandez-Moreno et al., 2011). Ces modifications du comportement chez les poissons sont des indicateurs sensibles au stress environnemental (Scott & Sloman,

2004), Cependant la réduction du taux de croissance observée sur le bar est corrélée à l'induction de l'activité EROD (Kerambrun et al., 2011) très coûteux en terme énergétique. La métabolisation des xénobiotiques entraîne un coût énergétique pour l'organisme, ce qui peut réduire l'énergie allouée à d'autres processus physiologiques. Dans l'environnement les fonctions physiologiques sont essentielles pour la survie et les performances des poissons (Scott & Sloman, 2004). La corrélation de l'activité EROD avec des perturbations qui sont observées à un niveau plus élevé d'organisation biologique telle que l'individu montre le potentiel prédictif du dosage de l'activité EROD. La mesure de l'activité EROD semble être un indicateur écologique pertinent qui permet de prédire l'impact des contaminants sur certains processus comme le comportement, la croissance et la reproduction.

### ***1.3.1.1.2 Activité GST***

La GST est une enzyme de biotransformation, mais aussi une enzyme antioxydant. La réaction de conjugaison par les enzymes de phase II est également importante lors de la détoxification de certains produits chimiques. La GST est parmi les enzymes de phase II les plus induites par les contaminants environnementaux (Deville et al., 2005). Il existe plusieurs types de GST probablement due à la nécessité de traiter une très large variété d'électrophiles (Ketterer et al., 1989). L'action de la GST est très importante car elle empêche les composés électrophiles de réagir avec les centres nucléophiles des protéines, de l'ADN et de l'ARN (Ronisz et al., 1999). En plus de catalyser la conjugaison des substances électrophiles par le GSH (glutathion), la GST joue aussi un rôle dans le système de défense antioxydant (Ketterer et al., 1989). Cette enzyme largement documentée chez plusieurs espèces de poissons est induite par les divers xénobiotiques organiques (Viganò et al., 2001; Fenet et al., 2006; Monteiro et al., 2006). Chez plusieurs espèces de téléostéens l'altération des performances de nage a été mise en lien avec l'activité GST (Solé et al., 2009) car le comportement peut être affecté par les contaminants (Weis & Candelmo, 2012). La réduction des performances de nage observée chez le poisson *Jenynsia multidentata* semble être liée à une redistribution de l'énergie allouée en faveur de la détoxification du microcystine<sup>7</sup> (Cazenave et al., 2008). Etant donné qu'il existe un lien entre la réponse de l'activité GST et les perturbations comportementales, la mesure de l'activité de cette enzyme permet d'évaluer l'effet des

---

<sup>7</sup> Les microcystines sont des toxines cyanobactériennes

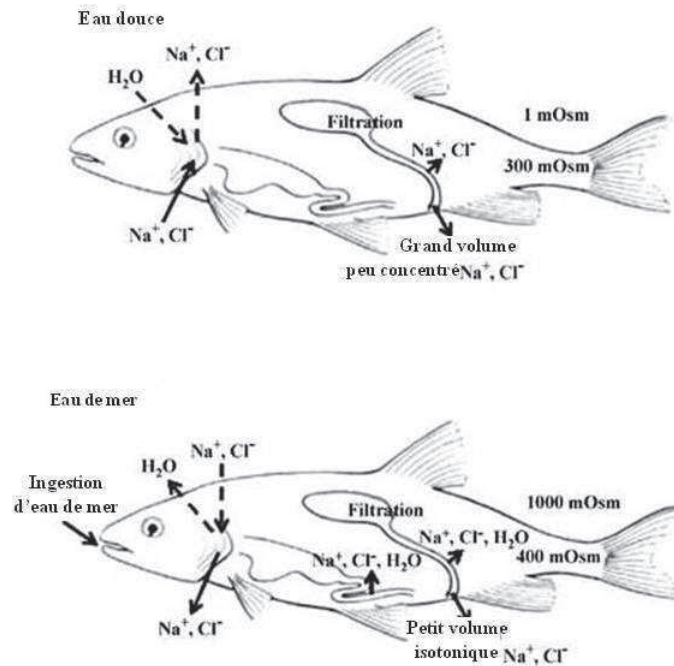
contaminants et de prédire leur impact au niveau des individus. Elle peut être considérée comme un marqueur écologique pertinent.

### ***1.3.1.2. Osmorégulation***

Les poissons téléostéens régulent et maintiennent leur pression osmotique grâce à des mécanismes d'osmorégulation qui permettent les échanges d'eau et d'électrolytes. Ces échanges se font en majorité aux niveaux :

- branchie
  
- rénal
  
- sanguin
  
- gastro-intestinal.

Cette régulation peut être hypo ou hyperosmotique (Figure 12), la branchie étant l'un des principaux organes osmorégulateurs. Elle est le siège de nombreux processus physiologiques qui sont essentiels pour le maintien de l'homéostasie face aux changements internes (e.g., acidoses) et aux variations des conditions environnementales (e.g., salinité) (Evans et al., 2005). De nombreux échanges se font au niveau de la surface épithéliale des branchies, par exemple pour l'acclimatation des téléostéens euryhalins (Evans, 2008). L'épithélium branchial est composé de plusieurs types de cellules, avec en majorité des cellules pavimenteuses (PVC) et des cellules à chlorure (MRC). Les PVC occupent la grande partie de la surface des filaments branchiaux et jouent un rôle important dans les échanges gazeux. Les MRC riches en mitochondries occupent une petite partie de l'épithélium branchial et sont communément appelés ionocytes. Chez les poissons l'acclimatation à la salinité nécessite l'activation de la pompe NKA (Wilson & Laurent, 2002) comme démontré par des travaux en immunohistochimie (Wilson & Laurent, 2002). Certains groupes de téléostéens euryhalins (e.g. tilapias, saumons) répondent à l'acclimatation à la salinité avec une augmentation de l'activité NKA, mais aussi une importante densité des MRC (Marshall & Singer, 2002). Les ATPases régulent l'entrée et la sortie de différents ions à travers la membrane pour maintenir les processus physiologiques de la cellule (Agrahari & Gopal, 2008). En général l'activité NKA est associée au système de transport actif responsable de l'extrusion de  $\text{Na}^+$  et de l'accumulation de  $\text{K}^+$  dans les cellules (Stagg et al., 1992).



**Figure 12 : Mécanisme d'osmorégulation chez les poissons téléostéens.** En eau douce pour faire face à la perte d'ions et à l'entrée d'eau, l'organisme met en place un système de compensation avec l'excrétion d'un grand volume d'urine diluée et l'absorption active de NaCl au niveau des branchies. En eau de mer les poissons doivent faire face à une perte osmotique d'eau et un gain de NaCl à travers les branchies. Dans ce contexte les mécanismes de compensation mis en place incluent l'ingestion d'eau de mer, l'absorption intestinale de NaCl et d'eau, l'excrétion d'un petit volume d'urine isotonique et la sécrétion active de NaCl à travers l'épithélium branchial (d'après Evans, 2008).

Au niveau des branchies, la pompe NKA est une force d'entraînement responsable du maintien du gradient osmotique (Kirschner, 2004). La pompe est localisée au niveau de la membrane basolatérale de l'épithélium branchial et assure la sortie du Na<sup>+</sup> (Evans et al., 2005). De nombreux travaux ont montré une corrélation positive entre la salinité environnementale et l'analyse biochimique de l'activité NKA chez les téléostéens (McCormick, 2001). Une induction de l'activité NKA a été montrée en réponse au changement de la salinité du milieu (Alam & Frankel, 2006; Fiess et al., 2007). La corrélation négative entre l'activité NKA branchiale et le niveau d'ion plasmatique chez le téléostéen euryhalin *Fundulus heteroclitus* après leur transfert dans l'eau de mer montre le rôle de la pompe à sodium dans son transport au niveau des branchies (Mancera & McCormick, 2000). Le dosage de l'activité NKA chez les poissons est un bon indicateur de l'adaptation à la salinité environnementale. Une inhibition de l'activité NKA est possible au niveau des branchies chez des poissons exposés à des pesticides (Glover et al., 2007), des effluents (Parvez et al., 2006) ou de la carbamazépine<sup>8</sup> (Li et al., 2009). Agrahari et al. (2008) ont

<sup>8</sup> La carbamazépine est un médicament antiépileptique.

montré une inhibition de l'activité NKA chez le poisson d'eau douce *Channa punctatus* exposé au monocrotophos<sup>9</sup>. L'inhibition de cette enzyme peut avoir des effets néfastes pour l'organisme et les xénobiotiques peuvent altérer le fonctionnement de la NKA en perturbant l'énergie allouée à différents processus ou en interagissant directement avec l'enzyme (Alam & Frankel, 2006).

### 1.3.1.3. Protection vis-à-vis du stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défense antioxydants et les pro-oxydants (ERO, espèces réactives de l'oxygène) en faveur de ces derniers. Cette situation qui est généralement due à une surproduction d'ERO, peut aussi être due à une défaillance des systèmes de défense. Les ERO sont constituées de radicaux libres et de produits non radicalaires (ROOH et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les radicaux libres sont des molécules instables qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés. L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>), le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>), le radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>) et le radical alcoxyde (RO<sup>•</sup>) sont différents types de radicaux libres.

Face à la production d'ERO et pour minimiser les dommages oxydatifs l'organisme met en place un système de défense antioxydant. Ce système constitué de molécules de poids moléculaire diverse (Livingstone, 2001), permet de maintenir l'équilibre des ERO dans l'organisme. Le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) sont des enzymes antioxydantes majeures qui agissent de manière coordonnée pour éliminer les ERO (Figure 13). Le glutathion (GSH) et les molécules de faible poids moléculaire telles que les vitamines font aussi parti du système de défense antioxydant.

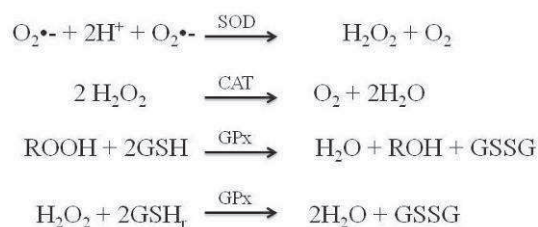


Figure 13 : Représentation simplifiée des réactions du système antioxydant enzymatique.

<sup>9</sup> Le monocrotophos est un insecticide organophosphoré.

Plusieurs classes de contaminants tels que les composés organiques et les métaux peuvent entraîner la formation d'ERO. Pour lutter contre ce stress oxydant l'organisme met en place des mécanismes de régulation permettant la synthèse d'enzymes et de molécules antioxydants (Halliwell, 1999). Cette induction des enzymes antioxydantes va permettre à l'organisme de s'adapter suite à l'exposition à certains composés. Si les antioxydants ne peuvent pas réguler la production excessive d'ERO, cet excès peut entraîner des mécanismes d'oxydation de l'ADN, des protéines, des glucides, des lipides pouvant endommager les cellules et les tissus. Parmi ces mécanismes, la lipopéroxidation est aussi considérée comme l'un des plus importants par lequel les radicaux libres peuvent endommager les tissus (Rikans & Hornbrook, 1997). La peroxydation lipidique est un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras membranaires conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables (ROOH). Lorsqu'elle n'est pas induite par la présence de xénobiotiques, la peroxydation lipidique est un phénomène physiologique naturel qui intervient dans la dégradation de nombreux métabolites cellulaires (hormones, acides gras).

La lipopéroxidation induite par les ERO est un processus délétère qui joue un rôle majeur dans la médiation des dommages oxydatifs des cellules (Kamat et al., 2000). Les hydroperoxydes qui se forment, peuvent se dégrader et libérer des alcanes, des alcools ou des aldéhydes. La malondialdéhyde est la plus représentative des produits de dégradation. La quantification de composés comme la malondialdéhyde est utilisée dans l'évaluation du stress oxydant (Janero, 1990). Le dosage des TBARS (substance réactive à l'acide thiobarbiturique) traduit la peroxydation lipidique et est donc utilisé pour mesurer les effets du stress oxydant pour les espèces exposées à des métaux, des pesticides, des composés organiques et des effluents aussi bien *in situ* qu'en laboratoire (Oakes & Van der Kraak, 2003; Sayeed et al., 2003; Almroth et al., 2005; Sanchez et al., 2007; Falfushynska et al., 2011; Toni et al., 2011; Zagal & Mazmanci, 2011). L'intérêt de l'utilisation du dosage des TBARS comme indicateur est qu'elle permet de prédire les dommages. Même si le stress oxydant est en partie induit par l'exposition à des contaminants, certains facteurs abiotiques peuvent moduler la production des ERO. Les variations de ces facteurs abiotiques comme la température, l'oxygène et la salinité peuvent causer un stress supplémentaire chez les organismes aquatiques (Lushchak, 2011). Par exemple une augmentation des apports en oxygène peut entraîner une augmentation des produits de lipoperoxydation (Lushchak & Bagnyukova, 2006). Il est donc nécessaire de connaître l'influence de ces facteurs sur le niveau des TBARS lors de leur utilisation comme biomarqueurs de stress oxydant. De plus Berntssen (2003) ont relié la



perturbation du comportement chez des saumons atlantiques exposés à du méthyle mercure à une certaine dose avec les TBARS. Les TBARS permettent donc de prédire les effets des contaminants au niveau des individus.

#### ***1.3.1.4. Transmission de l'influx nerveux***

L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui facilite la transmission des signaux au niveau des synapses. La diffusion de cette substance au niveau de la fente synaptique se fait après leur hydrolyse par les cholinestérases. Ces enzymes neurotransmettrices présentes chez les organismes aquatiques sont divisées en deux classes : les acétylcholinestérases (AChE) et les butyrylcholinestérases (BChE). L'acétylcholinestérase est sécrétée au niveau des gaps synaptiques et des jonctions neuromusculaires. Habig et al. (1991) ont montré que comparée aux BChE, l'AChE est l'enzyme la plus représentée au niveau du cerveau des poissons.

Certains composés comme les pesticides organophosphorés, les carbamates, les métaux, les HAP et des toxines algales ont des propriétés anticholinestérasique chez les organismes aquatiques. Plusieurs travaux ont montré l'utilisation de l'inhibition de l'AChE comme biomarqueur de neurotoxicité pour évaluer l'impact des composés neurotoxiques chez le poisson (Burgeot et al., 1996; Sturm et al., 1999; Fulton & Key, 2001). L'inhibition de cette enzyme peut être considérée comme un marqueur de l'état physiologique. Pour une meilleure interprétation de l'inhibition de l'AChE due aux effets de la pollution, il est nécessaire de prendre en compte la variabilité naturelle de ce marqueur. Dans les écosystèmes aquatiques en général et dans les estuaires et les eaux saumâtres en particulier, il est nécessaire de distinguer les variations dues à la pollution et celles causées par les facteurs biotiques et abiotiques (Pfeifer et al., 2005). Hogan et al. (1971) ont montré une variation de cette activité chez le clapet arlequin (*Lepomis macrochirus*) à la suite de fluctuations de la température. Certains HAP, métaux et pesticides entraînent une inhibition de l'activité AChE chez différentes espèces de poissons et une réduction de leur performance de nage (Vieira et al., 2009; Hernandez-Moreno et al., 2011; Oliveira et al., 2011; Almeida et al., 2012). Cette inhibition est mise en lien avec les modifications du comportement chez les poissons en entraînant une accumulation d'acétylcholine au niveau de la jonction synaptique. Etant donné l'importance de l'activité cholinestérase dans le fonctionnement d'une grande quantité de processus physiologiques incluant ceux directement impliqués dans la croissance, l'inhibition de cette enzyme peut être considérée comme marqueur prédictif d'impact de ces contaminants.

### ***1.3.1.5. Reproduction***

De nombreux composés chimiques de diverses origines (hormones naturelles et de synthèse, pesticides organochlorés, certains herbicides, HAPs, PCBs) et présents dans l'environnement sont des perturbateurs endocriniens, car ils sont capables d'interagir sur le système endocrinien et d'affecter différents processus physiologiques essentiels comme ceux liés au développement, à la reproduction, au métabolisme général et/ou au comportement (Propper, 2005). L'induction de la vitellogénine (VTG) (Van den Belt et al., 2003), l'inhibition de la croissance testiculaire (Jobling et al., 1996), la présence d'ovotestis (Minier et al., 2000), les anomalies testiculaires (Vasquez et al., 2009) ont été observées chez les poissons après exposition à des PE. La nature et l'intensité des effets reproducteurs sont dépendants de la concentration et du temps d'exposition à l'E2 (Brion et al., 2004). Certaines effets sont permanents (relatifs à la différenciation sexuelle), tandis que d'autres sont réversibles, par exemple l'induction de la VTG (Brion et al., 2004). Pour évaluer le potentiel œstrogénique des composés et leurs effets sur la reproduction, il est important de doser les concentrations en VTG (Brion et al., 2000). La VTG est une glycoprotéine synthétisée au niveau du foie des femelles matures des vertébrés ovipares. Sa synthèse et sa sécrétion est normalement régulées par le taux d'œstrogène. Le gène *VTG* est aussi naturellement présent chez les mâles adultes, mais avec peu ou pas de VTG mesurée en période normale. La synthèse de la VTG chez les mâles est maintenant largement documentée et le dosage de l'induction de la VTG, peut être considéré comme un marqueur d'œstrogénicité. La concentration de VTG chez les poissons mâles est donc utilisée pour évaluer la présence de composés œstrogénique dans l'environnement (Tyler et al., 1996; Hinfrey et al., 2010; Sanchez et al., 2011).

Dans de nombreuses études l'augmentation de la production de VTG chez les mâles est corrélée avec les altérations observées au niveau des gonades (Bjerregaard et al., 2006). Jobling et al. (1998) ont même observé l'existence d'un lien entre l'induction de la VTG et l'incidence de l'intersexe chez les gardons (*Rutilus rutilus*) provenant de plusieurs rivières recevant des effluents. Les PE peuvent avoir également des effets à long terme sur la reproduction et impacter sur le développement des populations de poissons en milieu naturel (Kidd et al., 2007). L'induction de la VTG peut donc être considérée comme un indicateur prédictif des effets des perturbateurs endocriniens sur les populations.

### 1.3.2. Quelques réponses individuelles

#### 1.3.2.1. Atteintes cellulaires et tissulaires

Les effets du stress au niveau des tissus ont une position intermédiaire dans l'organisation biologique et se situent entre les effets biochimiques et les effets physiologiques (Hinton, 1990). Cette position constitue un avantage pour leur utilisation comme indicateur pour évaluer les effets des stress environnementaux aussi bien chimiques que physiques et biologiques. L'évaluation des dommages tissulaires donne des indications sur l'état de santé des organismes (Teh et al., 1997) car un stress peut entraîner des altérations tissulaires au niveau de plusieurs organes tels que les gonades, le foie, les reins et les branchies (Bernet et al., 1999). Les gonades et les branchies étant des organes intégrateurs, dans cette partie nous ne développerons que les altérations au niveau de ces organes.

Les fibroses, les nécroses, les foyers inflammatoires, l'hypertrophie ou l'atrophie des cellules germinales sont des modifications morphologiques de gonades soumises à des stress (Viganò et al., 2001; Blazer et al., 2007). Ces modifications surviennent à la suite d'exposition des organismes à des contaminants environnementaux ou à des pathogènes. Une exposition à des contaminants œstrogéniques peut entraîner des altérations et des modifications morphologiques des gonades (Metcalf et al., 2000; Brion et al., 2004). La présence de fibrose et l'atrophie des cellules germinales ont été observées chez des carpes (*Cyprinus carpio*) mâles suite à l'exposition au tert-pentylphénol 4 (TPP) et à l'œstradiol (E2) (Gimeno et al., 1998). Des cellules germinales femelles (oocytes) ont également été observées sur le tissu testiculaire de poissons chats (*Clarias gariepinus*) collectés dans des milieux recevant plusieurs effluents (Barnhoorn et al., 2004). La présence d'intersexe<sup>10</sup> a été observée chez des goujons (*Gobio gobio*) exposés à des effluents urbains et pharmaceutiques (Sanchez et al., 2011) et chez des gardons (*Rutilus rutilus*) exposés à des effluents contaminés (Jobling et al., 2002). La présence d'altération au niveau du tissu gonadique peut être mise en lien avec des informations sur la fitness et la reproduction des organismes (Sanchez et al., 2011).

Les MRC occupent une petite fraction de la superficie de l'épithélium branchial mais sont les sites primaires des processus physiologiques au niveau des branchies (Evans et al.,

---

<sup>10</sup> L'intersexe correspond à la présence d'oocytes dans les gonades masculines (Nolan et al., 2001).

2005). Sur l'épithélium branchial le canal chlore régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR), le transporteur  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$  (NKA) et le cotransporteur  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$  (NKCC) jouent des rôles clefs dans le mécanisme d'osmorégulation des téléostéens. En eau de mer, au niveau de la membrane apicale des ionocytes, le canal à chlorure CFTR permet la sécrétion des ions chlorure (Figure 14). La présence de jonctions lâches entre les cellules accessoires et les cellules à chlorure permettent la sécrétion de  $\text{Na}^+$  grâce à un gradient électrochimique. Au niveau de la membrane basale, le transporteur NKA, le cotransporteur NKCC et le canal  $\text{K}^+$  (Kir) permettent l'échange d'ions entre le milieu intérieur et le milieu intra cellulaire. Les NKCC permettent l'accumulation des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  et la NKA permet l'accumulation du potassium dans la cellule et le transport des  $\text{Na}^+$  vers le milieu intérieur. Le Kir assure la sécrétion des ions  $\text{K}^+$ .

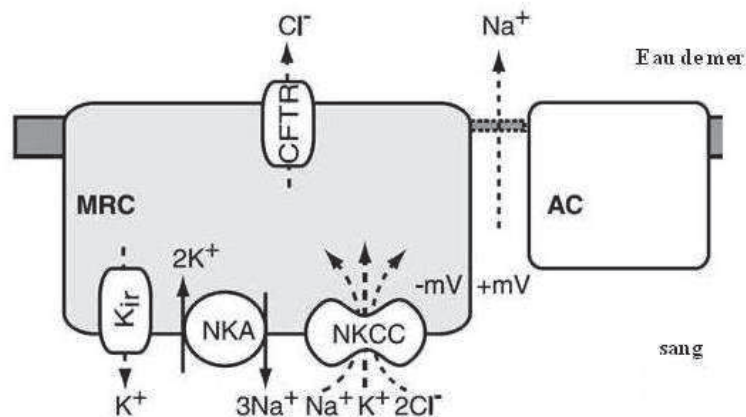


Figure 14 : Mécanisme de transport d'ions au niveau des MRC des branchies des téléostéens en eau de mer (d'après Evans et al., 2005; Evans, 2008).

Face à un choc osmotique la composition cellulaire de l'épithélium branchial change avec des changements de localisation des ionocytes au niveau des lamelles et des filaments et une augmentation du nombre et du volume des ionocytes (McCormick et al., 2003; Evans et al., 2005). Chez le *S. melanothron* des changements significatifs de la localisation, du nombre et du volume des ionocytes ont été observés à la suite de leur adaptation dans une eau plus salée (Ouattara et al., 2009). La NKA a été immunolocalisée au niveau des lamelles et des filaments des branchies avec une augmentation de l'occurrence des ionocytes au niveau des lamelles avec la salinité, alors qu'en eau douce elle est observée au niveau des filaments (Ouattara et al., 2009). Des résultats similaires ont été observé chez des *Sarotherodon* collectés dans des stations ayant une salinité allant de 34 à 51 (Lorin-Nebel et al., 2012).

### *1.3.2.2. Modifications des traits de vie*

Les traits de vie (croissance, reproduction, migration, alimentation, etc.) sont les principaux facteurs qui déterminent la dynamique des populations. Les indicateurs de traits de vie (par exemple taux de croissance, taille de première maturité sexuelle, etc.) sont une manière simple et rapide de prendre en compte les conséquences des altérations biochimiques et physiologiques chez les poissons au niveau des individus et des populations (Goede & Barton, 1990). Des corrélations existent entre ces indicateurs et les perturbations anthropiques et ils sont utiles pour l'évaluation de la qualité des habitats (Amara et al., 2007).

Le facteur de condition (FC) est une variable individuelle qui estime la relation entre la longueur et le poids du poisson. C'est un indicateur général de l'état « d'embonpoint » qui permet d'évaluer l'état de santé global de l'individu. Facilement mesurable, il est couramment employé car il intègre plusieurs processus à différents niveaux d'organisation individuelle (Sanchez et al., 2007). Il peut aussi fournir des informations sur les impacts potentiels de la pollution ou d'états physiologiques étant donné qu'un compromis métabolique est nécessaire par exemple dans la détoxification (Fang et al., 2009). Une corrélation existe entre le FC et la concentration en métaux au niveau du foie (Clements & Rees, 1997). Une baisse du facteur de condition a été observée avec une concentration élevée de carbamazépine<sup>11</sup>(Li et al., 2011). Le FC peut être aussi affecté par des facteurs autres que les contaminants comme la saison, le statut nutritionnel, les maladies, les variations de température ou l'eutrophisation (Huuskonen & Lindstrom-Seppa, 1995; Flammarion & Garric, 1997; van der Oost et al., 2003; Zimmerli et al., 2007). De ce fait l'interprétation de sa mesure est souvent complexe.

La croissance individuelle est un indicateur absolu de la santé car elle intègre un certain nombre de variables biotiques et abiotiques agissant sur l'organisme, et elle peut aussi révéler les effets secondaires du stress sur l'organisme (Smolders et al., 2002). Le taux de croissance est un indicateur essentiel de la fitness (Laroche et al., 2002) et du statut physiologique de l'individu. Meng et al. (2001) suggèrent que les nutriments et les effluents d'origine anthropique affectent la qualité des habitats en réduisant l'oxygène dissout qui entraîne une baisse du taux de croissance chez les poissons. D'autres facteurs comme l'hypoxie et l'augmentation de la salinité peuvent aussi induire une réduction de la croissance

---

<sup>11</sup> La carbamazépine est un médicament antiépileptique.

de certains espèces estuariennes (Panfili et al., 2004; Stierhoff et al., 2009). Plusieurs travaux ont montré une baisse de la croissance individuelle dans des écosystèmes contaminés (Laroche et al., 2002; Evrard et al., 2010). Le taux de croissance peut être une variable cruciale pour évaluer la qualité des habitats (Amara et al., 2007).

### **1.3.3. Quelques réponses populationnelles**

La présente étude se focalise sur la différenciation de plusieurs populations d'un modèle de tilapia, ce chapitre présentera donc brièvement deux outils permettant de tester les réponses au niveau des populations : l'analyse morphométrique des otolithes et la structuration génétique des populations.

#### ***1.3.3.1. Variabilité morphométrique des otolithes***

Les otolithes sont des pièces calcifiées qui permettent l'équilibre et l'audition chez les téléostéens (Campana, 1999). Chez les poissons les otolithes sont utilisés en particulier dans l'étude des traits d'histoire de vie. Ils sont des enregistreurs permanents des variations de la croissance individuelle car ils grandissent tout au long de la vie du poisson en enregistrant des marques de croissance journalières et saisonnières (Panfili et al., 2002). Ces marques sont utilisées pour estimer l'âge et les taux de croissance.

La croissance des otolithes est un phénomène complexe qui intègre divers facteurs endogènes ou exogènes, bien qu'elle soit régulée par la physiologie du poisson (Morales-Nin, 2000). La forme des otolithes est d'abord spécifique et régulée par le génome (Campana & Casselman, 1993) et les applications qui en découlent pour la reconnaissance des espèces sont donc immenses (Panfili et al., 2002). La taille corporelle, les facteurs biologiques (reproduction et régime alimentaire) et de nombreux autres facteurs environnementaux physiques et chimiques (température, salinité, pH, éléments lourds de l'eau) peuvent avoir une influence sur la croissance des otolithes (Campana & Casselman, 1993; Lombarte & Lleonart, 1993; Morales-Nin, 2000). L'altération du métabolisme général peut entraîner des différences morphologiques (Bang et al., 2006). L'analyse de la forme des otolithes est un moyen indirect qui permet d'étudier les relations entre l'organisme et l'environnement dans lequel il se trouve (Morat et al., 2008). L'analyse de la forme des otolithes a fait l'objet de nombreuses études sur la discrimination de populations de poissons (Tuset et al., 2003; Stransky et al., 2008;

Ferguson et al., 2011). Les différences significatives de forme des otolithes observées chez la morue (*Gadus morhua*) ont fourni une base phénotypique pour la discrimination des stocks (Cardinale et al., 2004). Les facteurs confondant telles que l'âge et la taille du poisson n'affectent pas la forme des otolithes (Gagliano & McCormick, 2004). L'analyse de la forme des otolithes peut fournir des informations sur les conditions et la trajectoire des poissons en relation avec leur croissance, leur développement et leur statut (Gagliano & McCormick, 2004). Comme les otolithes ne subissent pas de changement à court terme et de remaniement la morphologie est conservée durant toute la vie (Campana & Casselman, 1993). Cependant si l'analyse de la forme des otolithes permet de différencier les populations, elle ne permet pas d'expliquer les causes de cette différenciation, qui peuvent être génétiques et/ou environnementales mais sont exprimées via la physiologie (Cardinale et al., 2004). La forme de l'otolithe ne varie pas pour les individus d'une espèce provenant d'environnements comparables, même si des différences génétiques ont été observées (Smith et al., 2002). L'analyse de la forme des otolithes semble donc être un bon indicateur pour différencier des populations provenant de différents environnements (Agüera & Brophy, 2011; Ferguson et al., 2011).

#### ***1.3.3.2. Diversité génétique des populations***

Le stress environnemental (particulièrement chimique) due aux activités anthropiques constitue une menace pour les organismes, et les peuplements qui le subissent, pouvant conduire à terme à la dégradation des écosystèmes et de la biodiversité (Knapen et al., 2009).

L'exposition à des contaminants a des effets multiples et complexes sur la diversité génétique d'une population soumise à un ou plusieurs stress (Hebert & Luiker, 1996; Viarengo et al., 2007). Selon leur nature et leur concentration, les contaminants peuvent induire des effets mutagènes et sélectifs sur le génome d'un organisme et entraîner ainsi des changements de fréquences alléliques et de variabilité génétique (Bickham et al., 2000). L'altération de la structure de l'ADN et les mutations génétiques sont les conséquences directes de l'exposition des organismes à ces contaminants (Viarengo et al., 2007). Seuls les génotypes les plus adaptés (les génotypes dit «résistants») au stress seront conservés dans la population, ceci à plus ou long terme selon l'intensité de la pression de sélection (fitness des génotypes) (Bickham et al., 2000). Outre ces effets directs et ciblés sur la diversité génétique,

des effets plus aléatoires et plus larges peuvent être observés lorsque le stress implique une forte mortalité au sein de la population.

En favorisant les génotypes plus tolérants et en causant des goulots d'étranglements démographiques, l'exposition à des contaminants peut entraîner des modifications de la composition génétique d'une population (Van Straalen & Timmermans, 2002). Les goulots d'étranglement et la dérive génétique peuvent entraîner une réduction de la diversité génétique (Matson et al., 2000) et à plus ou moins long terme compromettre la capacité d'adaptation d'une espèce face aux changements environnementaux (Larno et al., 2001; Marchand et al., 2010). L'étude menée chez des gambusies transférés en 1977 d'un site vers un point d'eau contaminé par des radionuclides a montré que quelques années après leur transfert une augmentation du pourcentage de polymorphismes et d'hétérozygotie ont été observés chez les poissons collectés dans le site contaminé comparé à ceux du site d'origine (Theodorakis & Shugart, 1997). Cette modification de la diversité génétique observée sur les sites contaminés peut être expliquée par l'apparition de nouveaux génotypes dans les zones contaminées ou par des flux de gènes asymétriques avec un flux de gènes limités (Theodorakis et al., 2006).

Cependant l'analyse de la structure génétique des truites (*Salmo trutta* L) exposés à des métaux a montré que la présence de métaux n'était pas une barrière au flux de gènes (Durrant et al., 2011). La pression sélective potentielle principalement induite par le stress peut entraîner une évolution génétique des fréquences alléliques des populations de flet (*Platichthys flesus*) au vieillissement dans l'estuaire de la Vilaine qui tendent à ressembler à celle des populations de l'estuaire de la Seine (plus polluée) (Evrard et al., 2010). Nowak et al. (2012) soulignent que la diversité génétique contribue fortement à la survie des populations exposées à la pollution chimique.

Les travaux de génétique des populations menés jusqu'à présent chez *S. melanotheron* ceux sont surtout intéressés à la structure des populations et moins à l'impact du stress sur son génome. En Afrique de l'Ouest, Agnès et al. (2009) en étudiant la structuration génétique des populations de *S. melanotheron* ont pu mettre en évidence l'existence d'une importante différenciation génétique entre différentes régions. Cependant Pouyaud et al. (1995) ont montré que cette variabilité génétique est plus importante dans les zones occidentales d'Afrique de l'ouest. Toutes les populations de cette zone du Sénégal et de la Gambie correspondraient à la sous-espèce *S. melanotheron heudelotii* (Adepo-Gouréne et al., 1998; Falk et al., 2003). Cette



espèce présente une structure génétique extrême cohérente avec leur mode de reproduction endogamique (Pouyaud et al., 1999).

#### **1.4. Effets des contaminants face aux effets du changement climatique**

L'impact du changement climatique peut être ressenti de différentes manières en fonction des milieux. La pression anthropique croissante couplée aux effets du changement climatique semble être la véritable source de la dégradation des écosystèmes. Par exemple la hausse de la température peut modifier le transport, le dépôt, et la remobilisation des contaminants, et par conséquent augmenter la réémission des contaminants comme les PCB dans l'environnement (Carere et al., 2011).

Généralement en présence de températures élevées, les organismes aquatiques sont très sensibles à la toxicité de contaminants comme les métaux et les pesticides (Cairns et al., 1975). La température peut perturber la chimie de certains polluants chimiques et entraîner une modification significative de leur toxicité chez les organismes aquatiques (Schiedek et al., 2007). Les poissons font partie des espèces particulièrement vulnérables aux effets combinés de la hausse des températures et des contaminants présents dans leur milieu (Noyes et al., 2009). Ainsi les poissons vivant à la limite de leurs tolérances physiologiques ont une capacité restreinte pour faire face à l'exposition simultanée des effets du changement climatique et des contaminants. Leur tolérance thermique diminue suite à l'exposition à certains contaminants comme le cadmium, les herbicides et les insecticides (Carrier & Beitinger, 1988; Howe et al., 1994; Messaad et al., 2000). L'espèce, la saison, la localisation, la nutrition, le stade de développement et l'âge sont des facteurs qui ont un impact sur les effets des contaminants chez les poissons (Carere et al., 2011). Les variations de température peuvent moduler la métabolisation et la toxicité (Noyes et al., 2009). Face à une hausse de la température et en présence d'une quantité élevée de contaminants, l'organisme peut être contraint à faire un compromis physiologique pour assurer sa survie (Patra et al., 2007). Par exemple l'augmentation de la température entraîne une hausse des processus métaboliques qui permettent l'accumulation, l'élimination et la détoxification des contaminants au niveau de l'organisme (Heugens et al., 2003), mais en augmentant la demande tissulaire en oxygène (Howe et al., 1994).

Dans les écosystèmes côtiers, la salinité est l'un des facteurs pouvant affecter les organismes. Ils doivent non seulement faire face aux gradients de salinité, mais aussi très souvent à la présence de contaminants (Schiedek et al., 2007). L'accumulation biologique accrue et l'augmentation de la toxicité des contaminants est possible dans les zones subtropicales affectées par des niveaux de salinité élevés. Cependant l'influence de la salinité semble être très variable. Heugens et al. (2003) ont montré que la toxicité des insecticides organophosphorés pouvait augmenter avec l'augmentation de la salinité. Par contre la toxicité des métaux augmente avec une baisse de la salinité.

## **Chapitre 2 : Choix méthodologiques**



## Chapitre 2 : Choix méthodologiques

Les sites d'étude (Figure 15) ont été choisis en fonction de leur niveau de salinité et également en fonction des différents types de pressions. Différents types de milieux dulçaquicole, marin et estuarien ont été échantillonnés pour mieux prendre en compte les différents niveaux de salinité. 9 sites ont été échantillonnés :

- Missirah, Foundiougne et Kaolack sur l'estuaire du Saloum
- Koular sur l'estuaire de la Gambie
- Baie de Hann (marin), Niayes 1 (hyperhalin) et Niayes 2 (dulçaquicole) à Dakar
- Lac de Guiers (dulçaquicole)
- St Louis sur l'estuaire du fleuve Sénégal

Le tilapia *Sarotherodon melanotheron* est l'une des rares espèces de poissons que l'on retrouve dans tous ces milieux au Sénégal.

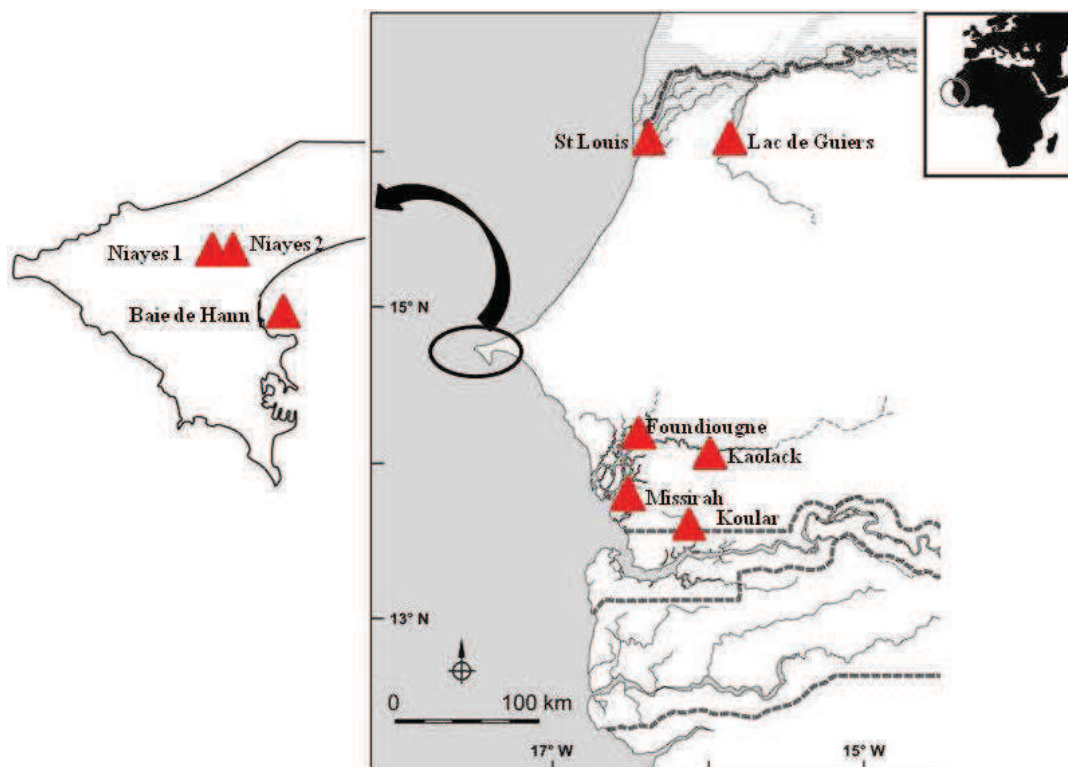


Figure 15 : Les différents sites d'étude au Sénégal.

## 2.1. Ecosystèmes aquatiques choisis au Sénégal

La zone côtière au Sénégal s'étend sur plus de 700 km le long de paysages très variables. Les écosystèmes traversés sont constitués de côtes sableuses, de cotes rocheuses, de zones humides côtières, d'îles sableuses, de bolongs et de vasières. Le fleuve Sénégal, le delta du Sine Saloum et le fleuve Casamance sont les 3 grands fleuves qui alimentent le littoral sénégalais. Sur la Presqu'île du Cap Vert les niayes sont des dépressions interdunaires à sol hydromorphe et remplies d'eau. Comme la majorité des pays sahéliens, le Sénégal est caractérisé par une pluviométrie très variable mais cantonnée à une courte saison (sur 4 mois). Les centres d'actions de Sainte Hélène, des Açores et de la zone saharo-libyenne contrôlent la circulation atmosphérique au Sénégal caractérisant ainsi la climatologie de la zone (Fall et al., 2006).

La circulation atmosphérique facilitée par l'absence d'obstacles montagneux place aussi le pays sous l'effet de vents comme l'harmattan<sup>12</sup>, de l'alizé<sup>13</sup> et de la mousson<sup>14</sup>. La dessiccation au sahel constitue une des conséquences les plus marquées du changement des précipitations au cours de ces dernières décennies (Hulme, 1995). En effet des épisodes de sécheresse due au déficit en précipitations ont entraîné des sursalinisations de milieux et engendré des difficultés socioéconomiques dans tout le pays (Fall et al., 2006). Les effets liés à la sécheresse se sont ajoutés à des pressions anthropiques multiples au cours des dernières années.

Dans cette zone le climat est de type soudano-sahélien caractérisé par l'alternance de 2 saisons. La saison sèche est scindée elle-même en 2 avec une période fraîche de novembre à mars et une période chaude d'avril à juin. Elle est marquée par la présence de vents alizés maritimes frais et de vents continentaux secs tels que l'harmattan. La saison des pluies qui s'étend de juillet à octobre est chaude et humide et caractérisée par la présence de vents de direction ouest et sud-ouest (mousson).

---

<sup>12</sup> L'harmattan est un vent de direction Est dominante et caractérisé par une grande sécheresse.

<sup>13</sup> L'alizé est un vent constamment humique issu de l'anticyclone des Açores de direction Nord à Nord-est.

<sup>14</sup> La mousson est un vent qui provient de l'alizé issu de l'anticyclone des Sainte-Hélène dans l'atlantique Sud.

Durant les 100 dernières années les précipitations ont baissé d'au moins 20% dans les zones sahéliennes (Batterbury & Warren, 2001). Cette diminution est due à la sensibilité de ces zones au changement climatique. Elles sont caractérisées par un climat subtropical où l'évaporation est susceptible de dépasser l'approvisionnement en eau douce provenant des précipitations et de l'écoulement des fleuves. De nombreuses baies, estuaires et de nombreux environnements côtiers sont caractérisés par des circulations d'eau inversées et des zones hypersalines (Gräwe et al., 2010). Les observations effectuées au Sénégal au cours des 50 dernières années montrent une diminution des précipitations de l'ordre de 30 % avec de très fortes variations spatio-temporelles (CSE, 2010). Dans la région de Dakar par exemple les précipitations ont baissé d'environ 50% entre 1950 et 2000 (Figure 16). Les variations des précipitations couplées à la sécheresse peuvent impacter les ressources en eau, les écosystèmes mais aussi les secteurs économiques tels que l'agriculture, la pêche et l'élevage. L'élévation du niveau de la mer couplée à la baisse des précipitations ont entraîné l'augmentation de l'intrusion d'eau salée dans certains aquifères côtiers, particulièrement aux alentours de Dakar et dans les estuaires du Saloum et de la Casamance (Niang et al., 2010). Les impacts potentiels de l'élévation du niveau de la mer sont plus marqués au niveau de l'estuaire du Saloum. La baisse des précipitations couplée au taux d'évaporation élevé et à l'élévation de la mer peut induire des disparitions, des apparitions ou une salinisation de certains points d'eau appelés Niayes (Niang et al., 2010). Les effets de la sécheresse apparaissent aussi à travers l'hypersalinisation des marigots de la Basse Casamance, ou dans la remontée spectaculaire du biseau salé dans le fleuve Sénégal (Ndong, 1995).

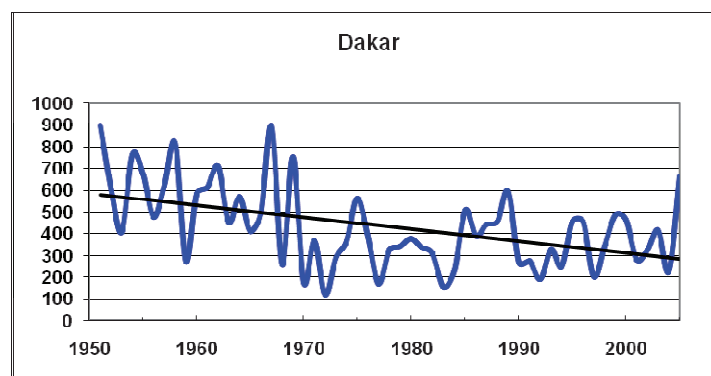


Figure 16 : Variation de la pluviométrie moyenne (mm) de la station de Dakar-Yoff (d'après CSE, 2010).

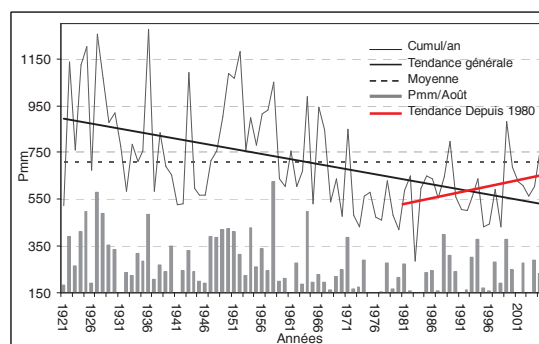
En plus de ces facteurs relatifs au changement climatique, les écosystèmes côtiers au Sénégal subissent d'importantes pressions anthropiques. L'érosion et l'assèchement des côtes,

la salinisation des eaux et la dégradation des mangroves font de la zone côtière du Sénégal un environnement vulnérable. Les activités au niveau des zones côtières sont économiquement soutenues et constituent des sources de pressions majeures. La majeure partie des activités économiques du pays repose sur la pêche, l'agriculture, le tourisme et l'industrie, donc particulièrement sur les zones côtières. La coexistence de toutes ces activités entraîne une pression anthropique croissante sur ces écosystèmes.

Les différents écosystèmes aquatiques échantillonnés au Sénégal dans le cadre du présent travail sont décrits ci-après.

### 2.1.1. Estuaire du Saloum

L'estuaire du Sine-Saloum draine un bassin versant de 29720 km<sup>2</sup> dont le relief est en général plat et la pente très faible. Il est constitué de 3 bras principaux, du sud au nord le Bandiala, le Dioboss et le Saloum. Le Saloum constitue le bras le plus long et s'étend sur plus de 115 km. Il est considéré comme un estuaire inversé (Pagès & Citeau, 1990) : la salinité augmente de l'aval vers l'amont aussi bien en saison sèche qu'en saison des pluies. Le niveau de salinité dépend essentiellement de la pluviométrie qui représente le seul apport d'eau douce. Cette pluviométrie est très variable d'une année à une autre (Figure 17). En amont de l'estuaire, des niveaux élevés de salinité ont été observés tout au long de l'année et peuvent atteindre jusqu'à 130 à la fin de la saison sèche (Simier et al., 2004). Les travaux de Diouf (1996) ont permis une meilleure connaissance de l'environnement de l'estuaire du Saloum et les différentes ressources associées. La présence de nombreux sites touristiques et l'urbanisation croissante combinés aux phénomènes d'hypersalinisation rendent cette zone extrêmement vulnérable. Elle est réserve de la biosphère depuis 1980 et a été classée au patrimoine mondial de l'UNESCO en juin 2011.





*Figure 17 : Variation de la pluviométrie moyenne (mm) sur la station de Kaolack dans le Saloum (d'après CSE, 2010).*

### **2.1.2. Baie de Hann**

La baie de Hann est située sur la façade sud-est de la presqu'île du Cap vert au niveau de Dakar, entre la pointe de Bel Air et le village de Mbao, et s'étend sur environ 10 km (Niang-Diop et al., 2002). Ce secteur abrite le quai de pêche de Hann et une très vaste zone industrielle. La proximité du port autonome de Dakar et la présence des industries pétrochimiques, chimiques, textiles et alimentaires rendent cette zone extrêmement vulnérable (Faye, 2010). La baie est le réceptacle des eaux usées de la ville de Cambéréne, mais aussi des eaux usées brutes industrielles et domestiques. L'urbanisation tout le long de la baie et la croissance rapide des villages traditionnels de pêcheurs (Hann, Mbao, Thiaroye) participent à l'augmentation des déchets ménagères et des rejets d'eaux usées domestiques (CSE, 2010; FAO, 2010). La baie de Hann est souvent citée comme l'une des baies les plus polluées d'Afrique occidentale et pourtant c'est l'un des principaux sites de pêche de la région de Dakar.

### **2.1.3. Niayes**

Les Niayes sont des dépressions interdunaires à sols hydromorphes, formant une série de cuvettes et de chenaux remplis d'eau, et délimités par des cordons dunaires. Ils se situent sur le littoral nord de Dakar et jusqu'à l'embouchure du fleuve Sénégal (Cissé et al., 2006; Rejiba et al., 2012), le long d'une côte de 5 à 30 km de large et de 185 km, caractérisée par l'alternance de dunes de sable et de dépressions humides (Sall & Vanclooster, 2009). La nappe phréatique subaffleurante maintient ces zones humides avec une présence permanente d'eau qui abrite plusieurs espèces aquatiques. D'un niaye à l'autre le niveau de salinité peut varier de l'eau douce à l'eau hypersalée. La pêche et l'horticulture constituent les majeures sources économiques des niayes (Fall et al., 2000). Ces écosystèmes sont perturbés par l'urbanisation, les activités anthropiques variées et la salinisation des terres (CSE, 2010). Les pesticides sont utilisés de façon hasardeuse et abusive dans ces zones pour lutter contre la présence d'insectes, d'acariens, de champignons et de nématodes. Cissé et al. (2006) ont recensé les pesticides les plus utilisés dans les niayes (Figure 18). En plus de cette contamination, le drainage d'eaux usées, urbaines et brutes dans les niayes exploités constitue des sources majeures de pollution (Niang, 1999).

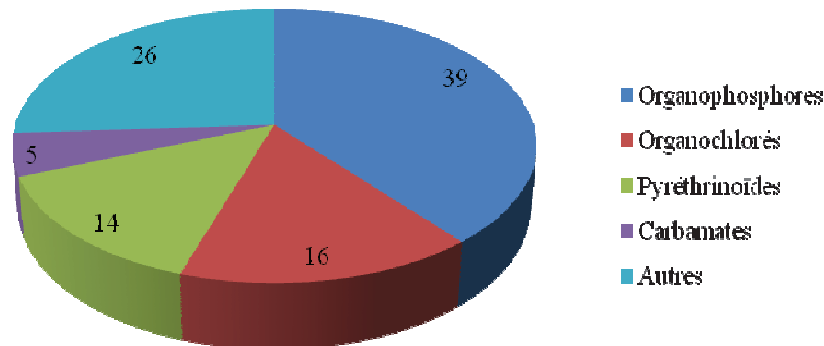


Figure 18 : Pesticides utilisés dans la zone des Niayes (d'après Cissé et al., 2006).

#### 2.1.4. Lac de Guiers

Le lac de Guiers est situé dans la vallée du Ferlo au nord du Sénégal. Il est le plus grand lac du pays avec une superficie de 300 km<sup>2</sup> et un volume de 600 × 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup> (Bouvy et al., 2006). Il est localisé sur la rive gauche du fleuve Sénégal qui l'alimente et il constitue la principale réserve d'eau douce du pays. La pluviométrie dans la zone du lac est d'environ 200 et 250 mm par an (Bouvy et al., 2006), mais le niveau de l'eau et l'intrusion d'eau salée ont été stabilisés par la construction des barrages de Diama (1985) et de Manantali (1987) dans la vallée du fleuve Sénégal (Cogels et al., 2001). Au niveau du lac de Guiers la température de l'eau peut varier de 19,7 à 30,3 °C (Berger et al., 2006; Kâ et al., 2006) et le pH de 7,3 à 7,8 (Kâ et al., 2006). A la station de Keur Momar Sarr plusieurs paramètres physicochimiques ont été mesurés (Mendoza-Vera et al., 2008) et les résultats montrent une très faible intrusion de l'eau salée. L'agriculture et la pêche sont les activités économiques caractéristiques de cette zone. Cependant l'urbanisation rapide et non contrôlée constitue un des problèmes dans cette zone (Varis & Fraboulet-Jussila, 2002). Les effluents d'eaux usées et ceux provenant de l'irrigation des plantations de cannes à sucre situées au Nord du lac le polluent (Cogels et al., 2001). L'eutrophisation observée au niveau du lac est due à l'augmentation de la pression anthropique avec l'irrigation pratiquée dans cette zone (Varis & Fraboulet-Jussila, 2002). Les pesticides peuvent aussi être retrouvés dans cet écosystème car on note leur utilisation croissante due à l'intensification de l'agriculture. Les pressions urbaines et agricoles sont donc les sources potentielles de pollution du lac de Guiers.

### **2.1.5. Estuaire du fleuve Sénégal**

L'estuaire du fleuve Sénégal est un plan d'eau long de 50 km, orienté du nord (depuis le barrage de Diama) au sud (jusqu'à la boucle de l'Océan Atlantique) et longe la côte atlantique (Champalbert et al., 2007). Sa profondeur moyenne est approximativement de 8,1 m près du barrage, de 7,5 m au milieu de l'estuaire et inférieure à 4,5 m à l'embouchure. Du fait de son emplacement, il a une importance stratégique pour les populations, la conservation de la biodiversité, la pêche, l'agriculture et l'approvisionnement en eau (Baklouti et al., 2011). Les infrastructures liées à la pêche sont les pressions majeures observées sur cet estuaire.

### **2.1.6. Estuaire de la Gambie**

L'estuaire de la Gambie est un estuaire "normal", avec une gamme de salinité allant de l'eau douce à 39 (Simier et al., 2006). L'estuaire de la Gambie reçoit des apports importants d'eau douce du fleuve. Contrairement à la plupart des estuaires en Afrique de l'ouest, cet estuaire de la Gambie reste modérément exploité par la pêche à petite échelle (Laë et al., 2004).

## **2.2. Modèle biologique choisi : le tilapia**

### **2.2.1. Systématique et morphologie**

La famille des Cichlidae regroupe des poissons qui appartiennent à l'ordre des Perciformes. Les Cichlidae font partie des plus importantes ressources halieutiques des systèmes aquatiques continentaux en Afrique tropicale (Fryer & Iles, 1972) et sont de loin les plus abondants dans la faune ichthyologique continentale, avec près de 143 genres et 900 espèces (Lévêque & Paugy, 2006). Elles représentent une part importante des pêches artisanales continentales avec plus de 50% des captures annuelles (Ayoade & Ikulala, 2007).

Chez les Cichlidae le corps est de forme variable mais jamais très allongée est comprimé et recouvert d'écailles cycloïdes ou cténoïdes (Lévêque et al., 1992). C'est une famille constituée de plusieurs genres dont les tilapias, *Sarotherodon* et *Oreochromis* qui sont largement représentés en Afrique de l'ouest. Les espèces de ces 3 genres sont communément appelées 'tilapia' (Canonico et al., 2005). Les tilapias font partie des groupes dominants dans les captures halieutiques mondiales en 2008 (FAO, 2010). Le genre *Sarotherodons* se distingue par les caractères suivants : les écailles sur le ventre ont presque la même taille que

celles des flancs ; la papille génitale du mâle est petite et simple ; l'os pharyngien intérieur est plus long que large ou aussi long que large et sa partie dentée est plus courte que la partie antérieure ; les dents pharyngiennes postérieures sont bicuspidées ou ont une cuspide inférieure réduite ou sans cuspide nette (Lévêque et al., 1992). Les espèces qui constituent ce genre pratiquent l'incubation buccale des œufs. L'espèce *Sarotherodon melanotheron* se différencie des autres de par la présence de taches noires sur la tête et le corps. Plusieurs sous-espèces différenciées sur la base de caractères morphologiques ont été décrites en Afrique (Trewavas, 1983). La sous espèce *S.melanotheron Heudoletti* est caractérisée par une coloration bleu-nacrée, plus foncée vers l'arrière. La partie inférieure de la tête et du ventre sont blanches ; la nuque, la partie dorsale de la tête et le museau sont pourpres ; les nageoires sont mauves virant au rose sur la partie molle de la dorsale ; lèvres inférieures blanches ; parfois des traces de bandes verticales sur les flancs (Lévêque et al., 1992).

### **2.2.2. Habitat et répartition**

La famille des Cichlidae regroupe des poissons particulièrement adaptés aux eaux douces et saumâtres. Ils peuvent coloniser divers types d'habitats permanents ou temporaires, différents types de cours d'eau, de lacs, d'estuaires et de lagunes (Trewavas, 1982). *Sarotherodon melanotheron* est l'une des espèces de Cichlidae les plus abondantes dans les lagunes et les estuaires en Afrique de l'ouest (Falk et al., 1999). Cette espèce d'origine estuarienne peut coloniser les milieux marins côtiers, les eaux douces, saumâtres ou hyperhalines (Panfili et al., 2004; Panfili et al., 2006; Tine et al., 2007). Cette espèce endémique d'Afrique (Faunce, 2000) a été introduite en Asie et en Amérique (Pullin & Lowe-McConnell, 1982). La répartition de *S. melanotheron* en Afrique de l'ouest varie en fonction de ses sous-espèces : 5 sous-espèces sont réparties du Sénégal au Congo (Trewavas, 1983). Les études de Falk et al. (1999) sur la phylogénie de *S. melanotheron* ont confirmé la présence de ces sous espèces (Figure 19). La sous espèce *Sarotherodon melanotheron heudelotii* est répartie du Sénégal jusqu'en Guinée, les populations de Côte d'Ivoire, du Ghana, du Togo et du Bénin représentent la sous espèce *Sarotherodon melanotheron melanotheron* (Figure 20) et la sous espèce *Sarotherodon melanotheron nigripinnis* est distribuée au Congo (Falk et al., 1999).

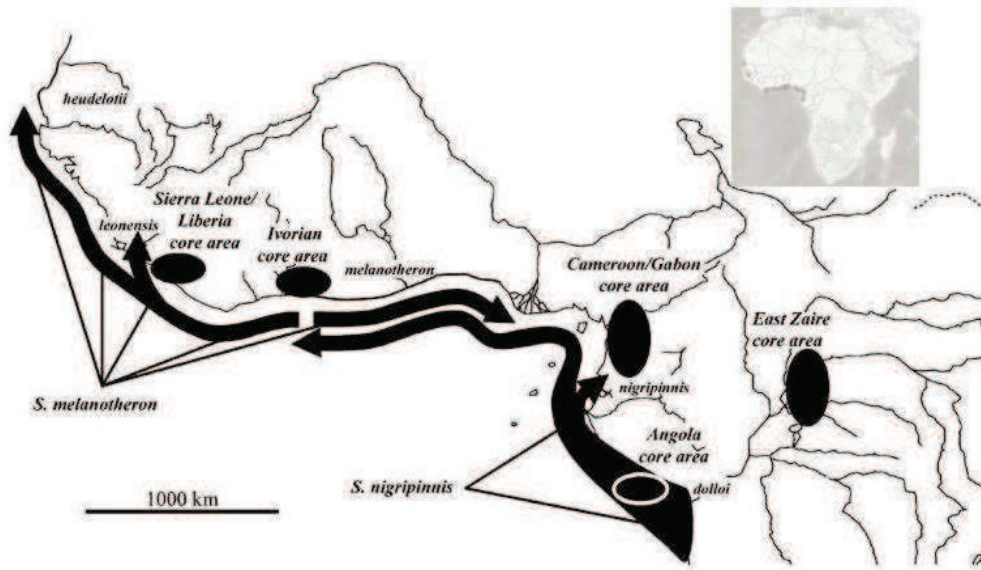


Figure 19 : Répartition de l'espèce *Sarotherodon melanotheron* et de ses sous-espèces en Afrique de l'ouest et centrale (d'après Falk et al., 2003).



Figure 20 : Le *Sarotherodon melanotheron*.

### 2.2.3. Biologie et écologie

La biologie du genre *Sarotherodon* a fait l'objet d'études très détaillées (Legendre & Ecoutin, 1989). Les Cichlidae sont caractérisés par une grande diversité de comportements reproducteurs. *Sarotherodon melanotheron* est une espèce qui pratique l'incubation buccale. La fréquence de la reproduction semble être plus élevée durant la période chaude de la saison sèche que durant la saison des pluies (Legendre & Ecoutin, 1989). La période et la fréquence de la reproduction est très variable en fonction des milieux. La reproduction des *Sarotherodon*

dans l'estuaire du Saloum et de la Gambie, est très intense durant la saison des pluies et baisse au début de la saison sèche (Panfili et al., 2004). En milieu naturel, après fertilisation des œufs dans des dépressions préalablement construites à la surface du sédiment par la femelle, le mâle les récupère et les incube. Les alevins sont ensuite libérés au bout d'une quinzaine de jours (Legendre & Ecoutin, 1989; Kishida & Specker, 2000). Cette espèce est capable de changer de stratégie de reproduction en fonction du milieu (Koné & Teugels, 1999). Le dosage des concentrations d'androgènes, d'œstrogènes et de VTG a participé à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires liés à ce mode de reproduction (Kishida & Specker, 2000).

*Sarotherodon melanotheron* est une espèce omnivore capable d'adapter son mode d'alimentation en fonction des conditions du milieu (Kone & Teugels, 2003). L'alimentation est très diversifiée mais essentiellement composée de phytoplancton, de zooplancton, de détritiques organiques et d'algues (Pauly et al., 1988 ; Kone & Teugels, 2003). Au stade juvénile *S. melanotheron* se nourrit essentiellement de zooplancton. *Sarotherodon melanotheron* est une espèce sédentaire (Pouyaud et al., 1999 ; Diouf et al., 2006).

#### **2.2.4. Tolérance face aux variations des paramètres environnementaux**

*Sarotherodon melanotheron* est une espèce qui présente une tolérance aux variations de plusieurs paramètres environnementaux tels que la salinité (Lemarié et al., 2004), la température (Albaret, 1987) ou l'oxygène dissout (Philippart & Ruwet, 1982). Seule la tolérance face aux variations des niveaux de salinité est détaillée ci-après car ce sera le facteur environnemental majeur pris en compte dans la présente étude.

*Sarotherodon melanotheron* est une espèce euryhaline qui peut vivre et se reproduire dans des milieux caractérisés par des niveaux de salinité très variés (Albaret, 1987), pouvant aller jusqu'à 130 (Panfili et al., 2006). C'est une espèce qui s'acclimate très bien à la salinité en milieu contrôlé, pour un gradient allant de 0 à 70 (Tine et al., 2008) et même jusqu'à 90 (Ouattara et al., 2009). L'espèce a largement contribué à la compréhension de l'adaptation des poissons face à la salinité. Cette adaptation utilise des changements dans la structure et le fonctionnement de certains organes osmorégulateurs tels que les branchies. En milieu contrôlé une augmentation significative du nombre d'ionocytes et une modification de leur localisation ont été observées après transfert des individus de l'eau douce à l'eau de mer et en conditions

hypersalées (Ouattara et al, 2009). Tine et al. (2007) ont montré que l'expression de l'ARNm de la prolactine (PRL1) chez cette espèce reflète les salinités. Legendre & Ecoutin (1996) ont aussi montré la remarquable plasticité de la reproduction et de la croissance de *S. melanotheron* en fonction des conditions plus ou moins favorables de l'environnement. Dans les estuaires du Saloum et de la Gambie, les variations environnementales affectent les traits d'histoire de vie de *S. melanotheron* au niveau de la croissance et de la reproduction (Panfili et al., 2004). Diouf et al. (2006) ont observé dans l'estuaire du Saloum que la concentration en strontium incorporé dans les otolithes est en relation avec le niveau de salinité et varie fortement si les variations de salinité excèdent un certain seuil.

### **2.2.5. Choix du *Sarotherodon melanotheron* en écotoxicologie**

Les espèces de tilapias sont utilisées dans de nombreux travaux en écotoxicologie (Parente et al., 2004; Matos et al., 2007). La majorité de ces études se sont focalisées sur le genre *Oreochromis* qui se caractérise par une relative tolérance aux polluants (Gadagbui et al., 1996; Almeida et al., 2002; Shailaja & D'Silva, 2003) et qui semble avoir les caractéristiques requises pour représenter une espèce sentinelle (Peixoto et al., 2006). Il existe peu d'études sur *Sarotherodon melanotheron* en écotoxicologie. L'avantage de l'utilisation cette espèce est qu'elle est présente dans la majorité des écosystèmes aquatique. Des inductions de la synthèse de la VTG ont été réalisées chez *Sarotherodon* (Okoumassoun et al., 2002). Le dosage de la VTG chez *S. melanotheron* au Bénin montre l'intérêt de leur utilisation dans la surveillance des perturbateurs endocriniens tels que les pesticides organochlorés (Okoumassoun et al., 2002). C'est dans ce contexte que le *S. melanotheron* a été choisi dans cette étude comme modèle biologique. Les traits de vie du *Sarotherodon* sont déjà décrits et leurs techniques d'étude mises au point. Plusieurs résultats laissent penser que *S. melanotheron* pourrait être utilisé comme une espèce sentinelle de la qualité d'un milieu. L'espèce est présente dans la plupart des écosystèmes aquatiques au Sénégal. Outre le fait qu'elle soit ubiquiste et sédentaire, elle montre une relative plasticité en fonction des conditions plus ou moins favorables du milieu, ce qui lui permet de s'adapter face au stress environnemental. De plus c'est une espèce facile à collecter sur le terrain et à élever en laboratoire. Le choix de *S. melanotheron* semble donc évident par rapport aux autres espèces de poissons présents dans la zone d'étude.

### **2.3. Paramètres étudiés**

Les campagnes d'échantillonnage ont été réalisées en juin et juillet 2009 et en octobre 2009 dans les différents sites d'étude. Comme évoqué précédemment l'échantillonnage a tenu compte de la pression environnementale liée à la pollution chimique et du niveau de salinité au niveau de chaque site. Au Sénégal les mois de juin et juillet correspondent à la fin de la saison sèche, période où la salinité est maximale dans les milieux du fait de l'absence de pluie. La deuxième période d'échantillonnage au mois d'octobre correspond à la saison des pluies, marquée par une baisse de la salinité générale dans tous les milieux. Le site de Koular sur l'estuaire de la Gambie a été échantillonné seulement durant la saison sèche. Huit sites ont donc été échantillonnés aux 2 saisons en fonction de leur niveau de salinité et de pollution (Cf. Chapitre 2) : 3 sites dans l'estuaire du Saloum (Missirah, Foundiougne et Kaolack), 3 sites à Dakar (Baie de Hann marine, Niayes 1 hypersalé et Niayes 2 dulçaquicole), 1 site dans l'estuaire du Sénégal (St Louis) et 1 site sur le lac de Guiers (dulçaquicole). L'échantillonnage aux 2 saisons a eu pour but d'étudier d'éventuelles variations saisonnières des paramètres mesurés. A chaque site la salinité de l'eau a été mesurée à l'aide d'un réfractomètre. Les sédiments ont été collectés à l'aide d'une cuillère en aluminium et placés dans des barquettes en aluminium puis stockés congelés à -20°C dans l'attente de leurs analyses.

Les poissons ont été capturés par des pêcheurs professionnels sur chaque site à l'aide d'un épervier à mailles fines (5 mm). Pour chaque individu le sang a été immédiatement prélevé à partir de la veine caudale avec une seringue puis mis dans un tube héparine-lithium pour éviter la coagulation. Ensuite chaque individu a été mesuré, pesé, sexé et disséqué. Afin de prélever les organes suivants : le foie, le cerveau et les branchies (conservés dans du tampon SEI). Ces organes ont été immédiatement stockés dans de l'azote liquide puis congelés à -80°C avant leur analyse au laboratoire. Pour chaque individu un morceau de nageoire a été coupé et conservé dans de l'alcool 96° pour le typage génétique, puis leurs otolithes (sagittae) ont été extraits, nettoyés à l'eau et conservés à sec dans des tubes référencés pour l'étude de la croissance et des variations de leur forme.

#### **2.3.1. Analyses chimiques**

*Ces analyses chimiques ont été faites au laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (UMR EPOC) de l'Université de Bordeaux I.*



### ***2.3.1.1. Concentrations de POP et HAP dans les sédiments***

Les POP et les HAP ont été extraits des sédiments par immersion dans un solvant organique, le dichlorométhane (DCM), et par chauffage microondes focalisées à pression ambiante selon le protocole de Budzinski (2000). Les étalons internes ont été ajoutés par gravimétrie avant l'extraction et un blanc d'extraction est avec chaque série d'extraction. Les échantillons ont été extraits pendant 10 minutes à 15 Watts.

Le principe est basé sur l'élimination des autres composés et molécules pouvant entraîner des interférences matricielles avec les POP et les HAP. Le protocole est similaire à ceux utilisés par Tapie et al. (2008; 2011). L'échantillon a été filtré et séparé en deux sous-échantillons, l'un pour la détermination des HAP et l'autre pour les POP.

#### ***2.3.1.1.1. Analyses des POP***

Le principe de la purification est basé sur l'élimination des autres composés et molécules pouvant entraîner des interférences matricielles avec les organochlorés. Les PCB, PBDE et les pesticides ont été élués avec 3x5 ml de mélange de pentane/dichlorométhane 90/10 (v/v). L'extrait a été purifié sur une colonne de silice acidifiée. L'éluât obtenu après purification a été concentré, repris dans de l'isooctane et standards (Octachloronaphtalène) ajoutés en quantité connue dans l'éluât avant l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC/ECD).

L'analyse de la fraction organochlorée présente dans les sédiments a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (Thompson & Budzinski, 2000). Le principe de la GC est basé sur l'affinité du composé avec la phase stationnaire ou avec la phase mobile. Plus l'affinité entre le composé et la phase stationnaire est forte et plus le temps de rétention est long. Le principe de l'ECD est basé sur la détection sélective par capture d'électron. Le chromatogramme (traduction du déficit de potentiel due à la capture d'électron libre par la molécule électrophile) obtenu, est caractéristique de chaque composé et est lié au degré d'affinité électronique du composé. Quatre congénères de PCB (30, 103, 155 et 198) ont été utilisés comme des étalons internes pour la détermination des PBC et des PBDE et le DDT-d8 pour les pesticides. Ces substances ont été quantifiées par comparaison de leur temps de rétentions avec ceux des étalons.

### ***2.3.1.1.2. Analyses des HAP***

Le principe de la purification est basé sur l'élimination des autres composés et molécules présents dans l'extrait afin d'éviter les interférences matricielles. L'extrait a été dans un premier temps purifié, les HAP ont été élués avec 15 ml de dichlorométhane dans une colonne d'alumine et après concentration et reprise dans de l'isooctane, ils ont été élués avec dichlorométhane /pentane 35/65 (v/v) dans une colonne silice. L'éluât obtenu après les 2 étapes de purification a été concentré, repris dans de l'isooctane et les standards (perdeuterated pyrene and benzo(b)fluoranthene) ont été ajoutés en quantité connue dans l'éluât avant l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

L'analyse de la fraction aromatique présente dans les sédiments a été effectuée par GC/MS suivant le protocole de (Baumard et al., 1999). Le principe du GC est basé sur l'affinité du composé avec la phase stationnaire ou avec la phase mobile. Le temps de rétention est caractéristique de chaque substance analysée. Plus l'affinité entre le composé et la phase stationnaire est forte et plus le temps de rétention est long.

Le principe du MS est basé sur l'ionisation des composés sous vide permettant ainsi leur séparation en fonction de leurs propriétés physiques et chimiques, et leur quantification par extrapolation avec les étalons internes. C'est une technique très sensible qui permet de séparer les composés qui sont co-élués au cours du passage par GC. Quelques HAP perdeutérés (phénanthrène, fluoranthène, chrysène, benzo(e) pyrène, benzo (a) pyrène et benzo (ghi) péryléne) ont été utilisés comme des étalons internes. Ces substances sont quantifiées par comparaison de leur temps de rétentions avec ceux des étalons.

### ***2.3.1.1.3. Validation de la méthode***

Pour tester la sensibilité et la validité de la méthode de quantification, des solutions standard (certains pour les HAP et d'autres pour les POP) contenant des étalons internes en quantité connu ont été régulièrement injectées en GC/MS et GC/ECD. Ces solutions sont utilisées d'une part pour calculer les facteurs de réponse des composés en comparaison aux étalons internes. D'un autre coté elles sont utilisées pour tester la précision de la méthode de quantification. Le contrôle a montré que la précision et la reproductibilité de la méthode de quantification étaient comprises respectivement entre 95 et 102% et entre 1 et 4%. Le

protocole a été validé par utilisation d'une matrice certifiée de sédiments marins SRM 1944 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Le dosage de 5 reliquats de cette matrice a montré une répétabilité de 80 à 100% avec une variabilité comprise entre 5 et 15% selon les composés.

### ***2.3.1.2. Concentration de DDT, DDD et DDE dans l'eau et les tissus***

L'eau a été analysée suivant le protocole de microextraction sur phase solide (SPME). Le protocole est basé sur l'extraction de composés par adsorption sur une fibre entraînant ainsi un équilibre entre la quantité de composés adsorbés sur la fibre et la quantité présente dans l'échantillon. 10 ml d'échantillon d'eau ont été analysés avec 100µm de fibre polydiméthylsiloxane (PDMS). La fibre a été immergée dans l'eau pendant 30min à 40°C et 250 trs/min. Après l'adsorption, la fibre a été désorbée et les composés identifiés après leur passage au GC/ECD. Les analyses ont été faites avec l'échantillonneur polyvalent automatique et le DDT-d8 a été utilisé comme étalon interne. Les calibrations ont été faites avec de l'eau ultra pure et de l'eau salée dopées avec les composés d'intérêt et l'étalon interne.

Les échantillons de muscle, foie et branchies ont été utilisés. Le protocole d'extraction-purification a été fait sous champ micro-onde couplé à une purification sur une colonne de silice acidifiée protocole de (Thompson et al., 1999). L'extraction a été effectuée avec du dichlorométhane suivant un programme contrôlé (40 °C à 80 °C pendant 5min à 800W, puis à 80 °C pendant 5min à 400W). Les étalons internes (DDT-d8) ont été ajoutés par gravimétrie avant l'extraction et un blanc d'extraction est réalisé lors de chaque série d'extraction d'après Tapie (2008). Les composés élués avec 3x5 ml de mélange de pentane/dichlorométhane 90/10 (v/v). L'extrait a été purifié sur une colonne de silice acidifiée. L'éluât obtenu après purification a été concentré, repris dans de l'isooctane et les standards (octachloronaphthalène) ont été ajoutés en quantité connue dans l'éluât avant l'analyse par GC/ECD.

Le protocole d'analyse de l'eau a été validé par utilisation d'une matrice certifiée SRM 22261. Le DDT, DDD et le DDE ont été quantifiés en comparaison avec les étalons internes. Les facteurs de réponses des composés ont été mesurés par injection d'un mélange de matrice de référence (SRM 22261), d'étalon interne et d'octachloronaphthalène utilisés comme standards. Un blanc a été passé à chaque série d'extraction et les concentrations des

échantillons de la même série ont été normalisés par rapport au blanc. Le protocole d'analyse des tissus a été validé par utilisation d'une matrice certifiée SRM 2977. Le pourcentage de recouvrement des composés analysés a été > à 90% avec une variabilité inférieure à 10 %.

### **2.3.2. Analyses biochimiques**

*Ces analyses ont été faites au sein de l'unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo de l'INERIS, de Verneuil-en-Halatte sauf le dosage de l'activité NKA réalisé au laboratoire AEO (UMR ECOSYM) de l'Université de Montpellier II.*

Les méthodes de dosages biochimiques ont été déjà mises au point au laboratoire pour d'autres espèces. Etant donné que les concentrations optimales des dosages peuvent différer d'une espèce à une autre, le transfert de ces méthodes chez le tilapia a été fait. Cette étape a permis de déterminer pour chaque biomarqueur la concentration protéique ou la dilution optimale des échantillons lors des dosages.

#### **2.3.2.1. Préparation des échantillons**

Le cerveau ou un morceau de foie a été broyé dans un mélange contenant 200 µL tampon phosphate (100 mM)/20 % glycérol (v/v)/ fluorure de phénylméthanésulfonyle (PMSF) (inhibiteur de protéase) (0,2M). La fraction post-mitochondriale obtenue après broyage, puis centrifugation (10000g, 4°C, 15 min), est stockée à – 80°C. Les branchies ont aussi été broyées dans du tampon MIIM (milieu isotonique d'isolation de membranes), puis centrifugées et l'homogénat récupéré a été stocké à –80°C. La concentration en protéine dans un échantillon a été déterminée par la méthode modifiée de Bradford (1976). Le principe est basé sur une réaction colorimétrique réalisée sur microplaque. Les protéines de l'échantillon diluée dans du tampon phosphate réagissent avec le bleu de Coomassie G250 0,05% en milieu acide (acide phosphorique, méthanol). La lecture se fait sur un spectrophotomètre. On mesure l'absorbance à 570 nm de 10µL d'échantillon ou de standard mélangé avec 190µL de réactif. Les résultats ont été exprimés en g/L de protéines présentes dans l'échantillon, contre une gamme étalon (0 à 200 g/L) de BSA (Albumine Sérique Bovine).

### **2.3.2.2. Dosage des Biomarqueurs**

#### **2.3.2.2.1. Activité EROD**

Le principe est basé sur la mesure de l'apparition de la résorufine par spectrofluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et à une longueur d'onde d'émission de 590 nm. La résorufine est un composé fluorescent obtenu après transformation de la 7-éthoxyrésorufine (7-ERF) par la 7-éthoxyrésorufine-o-dééthylase (EROD) en présence d'un cofacteur le NADPH. La réaction se fait dans des microplaques noires (Flammarion et al., 1998).

La gamme étalon a été réalisée avec de la résorufine 2,3  $\mu$ M diluée dans du tampon phosphate. Les échantillons ont été dilués dans du tampon phosphate 100 mM pH 7,8. L'ajout de 10  $\mu$ L NADPH 0,5 mM au mélange (10  $\mu$ L d'échantillon et 200  $\mu$ L de 7-éthoxyrésorufine) a déclenché l'apparition de la résorufine. La quantité de résorufine qui se forme a été déterminée par comparaison avec une gamme standard de résorufine. L'activité EROD a été exprimée en pmol de résorufine formée par minute et par mg de protéine.

#### **2.3.2.2.2. Activité GST**

Le principe est basé sur la mesure de l'absorbance à 340 nm de l'apparition du thioether issu de la réaction du chloro dinitro benzène (CDNB) et de la GSH catalysée par la GST (Habig et al., 1974).

Les échantillons ont été dilués dans du tampon phosphate 100 mM pH 7,8. Le mélange réactionnel était constitué de 95,2 % de tampon phosphate pH 6,5 ; de 2,4% de CDNB 42Mm et de 2,4% de GSH 42Mm. La gamme étalon a été réalisée avec une solution de GST standard d'origine équine dont la concentration varie entre 0 et 4 U/MI. 10  $\mu$ l d'échantillon ou de standard ont été déposés par puits avec 133  $\mu$ l du mélange. Les résultats ont été exprimés en U/g de protéines.

#### **2.3.2.2.3. Activité Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase**

Le principe est basé sur la mesure de l'absorbance à 630 nm de l'apparition du Pi (phosphate inorganique) issu de l'hydrolyse de l'ATP en présence de Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (Flik et al., 1983).

Le Pi a été utilisé comme standard. Pour chaque échantillon le dosage a été fait dans deux milieux, l'un avec ouabaine et l'autre avec KCl et l'écart entre les deux concentrations

Pi obtenu correspondait à la concentration de Pi catalysée par la Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Les échantillons ont été dilués dans du tampon MIIM. Dans chaque puits 20 µg/mg de saponine ont été ajoutés à 10 µl d'échantillon. Dans le premier milieu 100 µl d'ouabaïne ont été ajoutés à chaque puits et 100 µl de KCl dans le deuxième milieu et l'ensemble a été mis à incuber pendant 20 minutes à 37°C. Après incubation 200 µl mélange réactionnel constitué de TCA 10 % et de reactif coloré (v/v) ont été ajoutés à chaque puits pour arrêter la réaction. L'activité a été exprimée en µmol Pi/h/mg de protéine.

#### **2.3.2.2.4. *Activité AChE***

Le principe est basé sur la mesure de l'absorbance à 405 nm de l'apparition du TNB issu de la réaction du DTNB avec l'acétylthiocholine catalysé par l'acétylcholinestérase (Ellman et al., 1961).

Les échantillons ont été dilués dans du tampon phosphate 100 mM pH 7,8. Le mélange réactionnel était constitué de DNTB (0,2 mM) dilué dans du tampon phosphate. La gamme étalon a été réalisée avec une solution d'AChE standard. 10 µl d'échantillon ou de standard et 200 µl du mélange ont été déposés par puits. Après incubation 10 µl d'acétylthiocholine (2 mM) ont été ajoutés à chaque puits avant la lecture de la plaque. Les résultats ont été exprimés en U/g de protéines.

#### **2.3.2.2.5. *TBARS***

Le principe est basé sur la mesure par fluorimétrie du complexe MDA-TBA à une longueur d'onde d'excitation de 515 nm et à une longueur d'onde d'émission de 553 nm (Ohkawa et al., 1979). En milieu acide et à une certaine température, les hydroxydes lipidiques et leurs dérivés aldéhydiques (dont le malonedialdéhyde ou MDA) forment avec l'acide thiobarbiturique un complexe rose.

Soixante µL d'échantillon ou de standard dilué dans du tampon phosphate et 345 µL du mélange réactionnel ont été déposés par puits. Le mélange réactionnel était constitué de 58,5% de tampon phosphate 100 mM/EDTA 10 mM ; de 3,1% de BHT ; de 15,4% de TCA et de 23% de TBA. La gamme étalon a été réalisée avec du MDA dilué de 0 à 1 µM dans du tampon 100 mM/EDTA 10 mM / BSA 5 g/L. L'ensemble a été incubé pendant 40 minutes à 70-80°C. Le surnageant a été récupéré après centrifugation à 16000 g pendant 10 minutes. Les

complexes MDA-TBA présents dans le surnageant ont été dosés contre une gamme étalon de malonedialdéhyde. Les résultats ont été exprimés en nmoles par gramme de protéines totales.

#### **2.3.2.2.6. Validation dosage ELISA**

Le principe de l'ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) compétitif est basé sur la compétition entre un standard adsorbé sur une microplaque et une protéine contenue dans l'échantillon, pour un anticorps reconnaissant cette protéine. Le développement d'une méthode ELISA nécessite donc de disposer d'une préparation utilisable comme standard (e.g. VTG purifiée) et d'un anticorps reconnaissant, de manière spécifique, la protéine d'intérêt.

Des tilapias mâles et femelles ont été échantillonnés sur le site de la Baie de Hann. Les poissons ont été acclimatés 1 semaine au laboratoire dans une eau de salinité 20‰. Une injection intra péritonéal de 5mg/kg de poids a été faite sur chaque poisson une seule fois. 14 jours après l'injection, le sang a été prélevé et les poissons sacrifiés ont été pesés et mesurés. Le sang a été centrifugé dans un tube héparine lithium et le plasma obtenu a été récupéré et conservé à -80°C pour la purification.

La purification a été faite en deux étapes avec la méthode de Brion et al. (2000). Les échantillons collectés chez les mâles ont été poolés et représentent l'échantillon mâle. Les échantillons prélevés chez les femelles ont été poolés et représentent l'échantillon femelle. Les échantillons obtenus sont filtrés séparément et dilués avec du tris/HCL 100 Mm Ph 8,5. Les protéines ont été éluées avec un gradient de NaCl (70%/6 min avec 6 ml/min) dans une colonne échangeuse d'ion. Les différentes fractions obtenues pour chaque échantillon ont été poolées et concentrées après centrifugation. Après passage dans la colonne anionique, l'éluât obtenu a été filtré et conservé à 4°C jusqu'à l'utilisation en gel filtration. Avant passage de l'échantillon la colonne de gel filtration a été équilibrée avec du tampon de coating (carbonate, bicarbonate) pH 9,5. L'échantillon dilué avec du Tp de coating a été injecté dans la boucle et la charge protéique de l'éluât a été déterminée par la méthode de Bradford et al. (1976).

Une partie de la protéine purifiée (tVTG) a été utilisée pour la production d'Ac et le reste a été aliquoté et conservé à -80°C. L'Ac a été produit par immunisation de lapin avec la tVTG purifiée (COVALAB). Le sang du lapin a été prélevé à J0, J39 pour vérifier la réactivité des Ac produits. A J59 le sérum récupéré et purifié a été utilisé comme Ac primaire dans les dosages ELISA.

Le poids moléculaire a été déterminé par gel filtration. Un kit standard de poids moléculaire contenant la thyroglobuline (669 kDa), la ferritine (440 kDa), la catalase (232 kDa), l'aldolase (158 kDa) et le BSA (67 kDa) a été utilisé pour calibrer le poids de la VTG de tilapia. Le volume d'élution du bleu de dextran correspondait au  $V_0$ . Le volume d'élution ( $V_e$ ) de chaque protéine a été déterminé. La droite d'étalonnage obtenue a permis de déterminer le poids moléculaire de la tVTG en utilisant son  $V_e$ . Le poids moléculaire de la protéine isolée a été déterminé par gel filtration et était égal à environ 482 kDa. Le poids moléculaire obtenu (Figure 21) était comparable avec ceux obtenus par gel filtration chez des téléostéens (Specker & Sullivan, 1993).

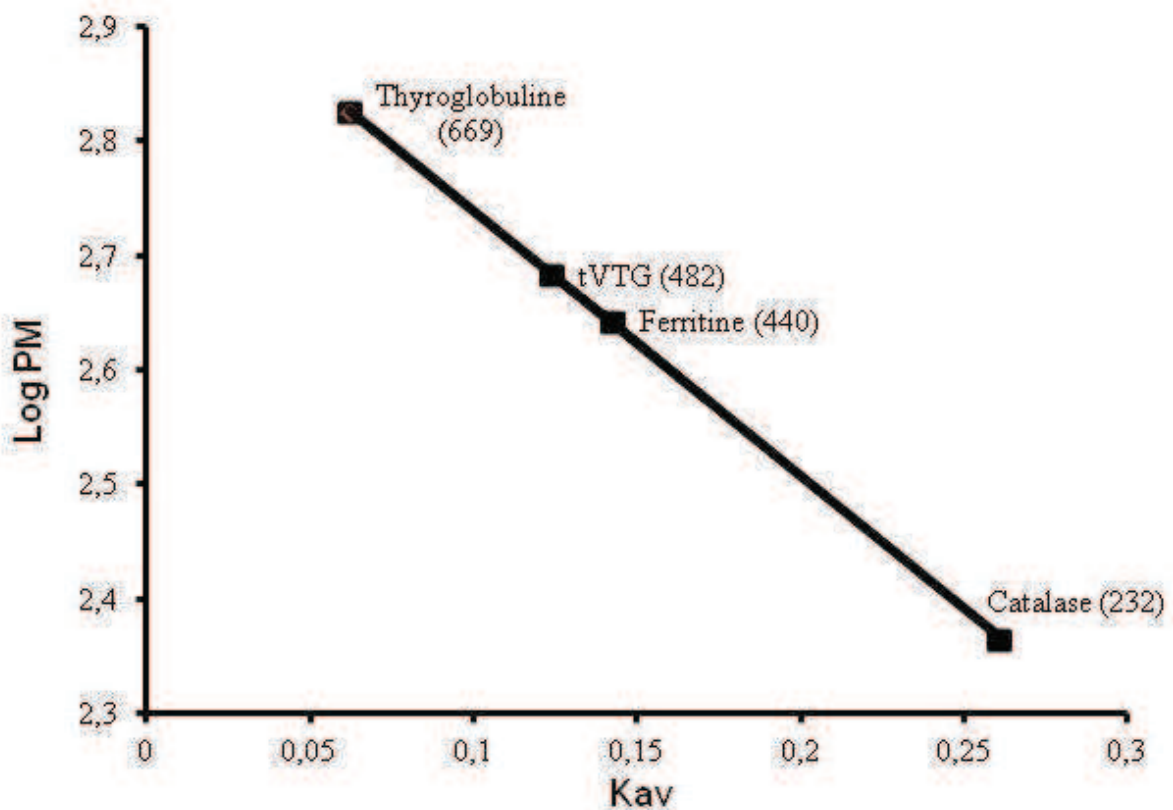


Figure 21 : Poids moléculaire estimé de la VTG de tilapia par gel filtration.

L'ELISA direct avait pour but de tester la spécificité de l'anticorps mais aussi de déterminer les concentrations optimales d'antigène et d'anticorps à utiliser lors du dosage de la tVTG dans les échantillons.

La gamme de concentration de « coating » et d'anticorps qui a été utilisée, a permis de sélectionner plusieurs couples (coating/ anticorps), dont les absorbances mesurées sont



comprises entre 0,5 et 2. Lors des dosages par ELISA compétitive la concentration de coating et d'anticorps retenu était de 35 ng/ml pour le coating et 1/30000 concentration finale pour l'anticorps. L'ELISA compétitive a été utilisée pour le dosage de la tVTG dans les échantillons. La formule suivante a permis de calculer le pourcentage de liaison :  $[Bi/Bo\% = (Abs-NSB)/(Abso-NSB)\times 100]$ . Le maximum de liaison a été déterminé par le blanc de la gamme. La liaison non spécifique NSB correspondait au contrôle négatif. La liaison dans l'échantillon ou le standard correspondait à Bi. Les coefficients de variation intra et inter essai à 90, 80, 50, 20 et 10% ont été calculés. La caractérisation de la réponse faite avec des échantillons non induits et induits a montré un parallélisme entre les échantillons femelles et le standard de tVTG (Figure 22).

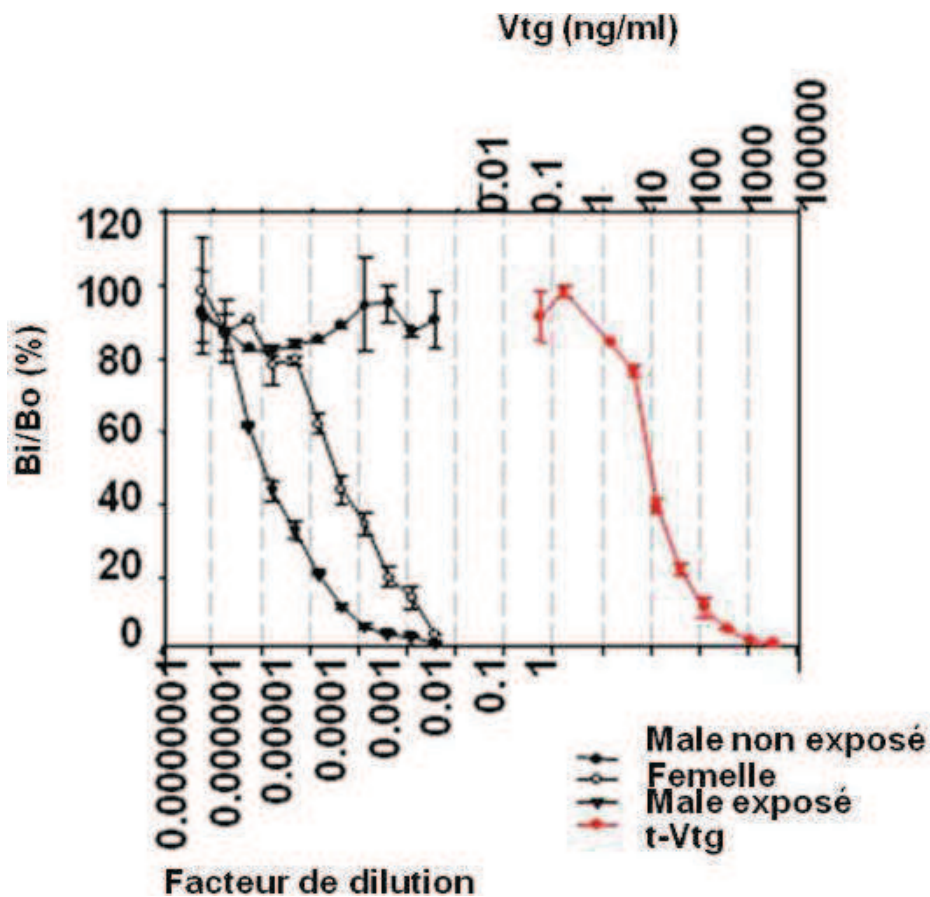


Figure 22 : Parallélisme des courbes obtenues avec des échantillons de femelles, de mâles induits et non induits et de standard purifié en utilisant le dosage ELISA de la vitellogénine avec une concentration de coating de 35 ng/mL et une dilution d'anticorps primaire de 1/30000.

*Tableau 4 : Coefficients de variation (CV) intra- et inter-essais pour le dosage ELISA de la vitellogénine avec une concentration de coating de 35 ng/mL et une dilution d'anticorps primaire de 1/30000.*

	<b>Liaison</b>			
	<b>90%</b>	<b>80%</b>	<b>50%</b>	<b>20%</b>
<b>tVTG (ng/ml)</b>	1,81	4,14	16,85	70,7
<b>CV intra-assay (%)</b>	37,39	29,07	13,80	8,55
<b>CV inter-assay (%)</b>	54,01	44,63	22,49	6,10

Plusieurs paramètres (limite de détection, la limite de quantification, la reproductibilité et la répétabilité) ont été déterminés pour permettre la validation de la méthode (Tableau 4).

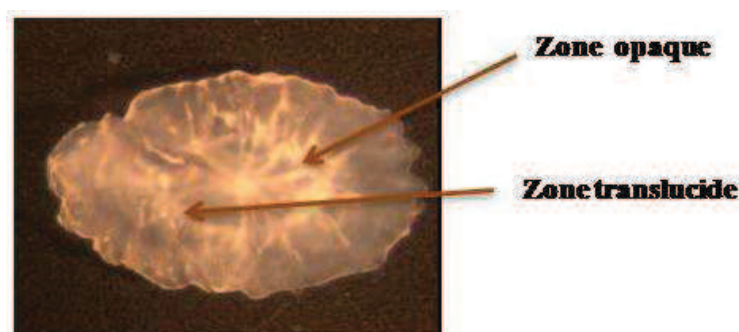
### 2.3.3. Modification des traits de vie

*Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Poissons en Afrique de l'Ouest (LABEP-AO) à l'IFAN-CAD (Institut Fondamental d'Afrique Noire Cheikh Anta Diop, Dakar).*

Le facteur de condition a été calculé à partir de la longueur à la fourche et du poids total du poisson. Le FC, exprimé en g/cm, a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$FC = P / LF^3 \times 100$$

Les otolithes ont été utilisés pour l'estimer l'âge individuel et le taux de croissance selon la méthode validée pour cette espèce par Panfili et al. (2004). L'acquisition des images des otolithes a été faite avec le logiciel TNPC (Visilog, Noesis®) sous un microscope binoculaire en lumière réfléchiée sur fond noir (Figure 23). Le comptage des zones opaques pour estimer l'âge a été fait directement sur les images. Cette interprétation a été facilitée par la construction d'une base de données d'images permettant de réexaminer les résultats à tout moment. Les zones opaques ont été validées comme des marques déposées annuellement sur les otolithes et l'âge individuel a été calculé en tenant compte de la date de naissance, de la date de capture et du nombre de zones opaques Panfili et al. (2004). L'âge a été estimé en nombre d'années et en mois. Le taux de croissance à la première année a été calculé par la mesure du rayon de croissance du premier anneau de l'otolithe (donc sur une année). Le taux de croissance a été exprimé en mm/an.



*Figure 23 : Acquisition d'image d'otolithe de Sarotherodon melanotheron sous un microscope binoculaire en lumière réfléchiée sur fond noir.*

### 2.3.4. Analyses histologiques

*Ces analyses ont été faites au sein de l'unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo de l'INERIS de Verneuil-en-Halatte.*

L'histologie des gonades a été réalisée selon le protocole de Sanchez et al. (2011). Les gonades fixées dans du liquide de Bouin ont été déshydratées avec de l'éthanol, dégagées avec du toluène et incluses dans de la paraffine. Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été réalisées et colorées avec de l'hématoxyline-éosine-safran. Elles ont ensuite été examinées au microscope photonique pour confirmer le genre, le stade de maturation et les éventuelles anomalies.

### 2.3.5. Analyse morphométrique des otolithes

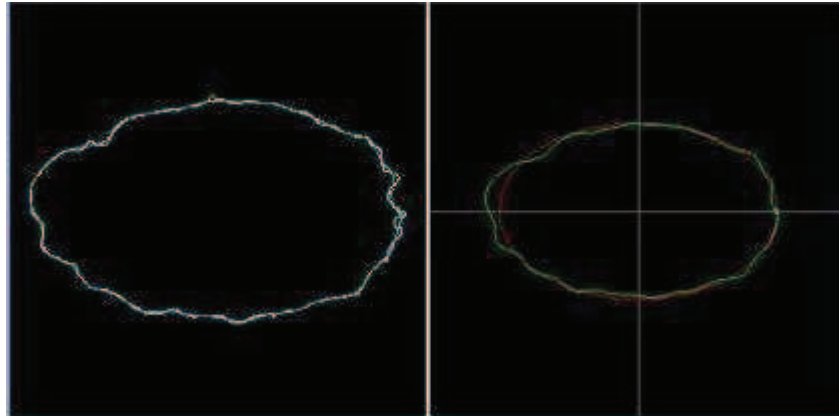
*Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire de Biologie et d'Ecologie des Poissons en Afrique de l'Ouest (LABEP-AO) à l'IFAN-CAD (Institut Fondamental d'Afrique Noire Cheikh Anta Diop, Dakar).*

Les mesures ont été faites sur les images des otolithes à l'aide du logiciel freeware Image J. Les images des otolithes entiers ont été seuillées puis binarisées pour extraire automatiquement les différentes variables. Les indices de formes (Tableau 5) et les coefficients de Fourier ont été utilisés pour décrire la morphologie des otolithes. Ces variables donnent des informations sur la similitude des caractéristiques par rapport à un cercle, à un rectangle et sur les variabilités de formes. Des tests de normalité et d'homogénéité des variances suivi d'une ANOVA ont permis de tester les différences significatives entre les échantillons provenant de différents sites.

*Tableau 5 : Paramètres de taille des otolithes et indices de forme utilisés dans l'analyse.*

Paramètres mesurés	Indices de forme
Surface (A)	Circularité = $P^2 / A$
Périmètre (P)	Rectangularité = $A / (FL \times FW)$
Largeur (FW)	Facteur de forme = $(4\pi A) / P^2$
Longueur (FL)	Rondeur = $4A / (\pi FL^2)$
	Ellipticité = $(FL - FW) / (FL + FW)$

La méthode d'analyse de Fourier Elliptique permet de quantifier les contours (Kuhl & Giardina, 1982). Le principe est basé sur la décomposition de la forme de l'otolithe en série de sinusoides (harmoniques) (Figure 24).



*Figure 24 : Représentation schématique de l'otolithe de Sarotherodon melanotheron par le logiciel SHAPE.*

La forme de l'otolithe est caractérisée par 2 fonctions  $X_N$  et  $Y_N$  qui utilisent des coefficients de Fourier (Kuhl & Giardina, 1982) :

$$X_n = a_0 + \sum_{n=1}^N \left( a_n \cos \frac{2n\pi t}{T} \right) + \sum_{n=1}^N \left( b_n \sin \frac{2n\pi t}{T} \right)$$

$$Y_n = c_0 + \sum_{n=1}^N \left( c_n \cos \frac{2n\pi t}{T} \right) + \sum_{n=1}^N \left( d_n \sin \frac{2n\pi t}{T} \right)$$

$a_n$ ,  $b_n$ ,  $c_n$  et  $d_n$ , sont les coefficients de Fourier,  $T$  périmètre du contour,  $t$  longueur d'un segment à partir d'un point de départ arbitraire,  $N$  nombre d'harmoniques.

Ces 4 coefficients de Fourier caractérisent chaque harmonique et ont été calculés en utilisant le logiciel Shape. La puissance de Fourier permet une estimation du nombre d'harmonique nécessaire pour une meilleure estimation du contour de l'otolithe (Morat et al., 2012).

$$PF_n = \frac{a_n^2 + b_n^2 + c_n^2 + d_n^2}{2}$$

Les analyses de la puissance de Fourier cumulée sur 32 otolithes sélectionnés de manière aléatoire ont montré que les 15 premiers harmoniques justifient 99,99% de la puissance cumulée (Figure 25). Les coefficients de la première harmonique n'ont pas été utilisés.

L'AFD réalisée avec 56 ( $4 \times 14$ ) coefficients de Fourier a permis de déterminer la variation spatiale.

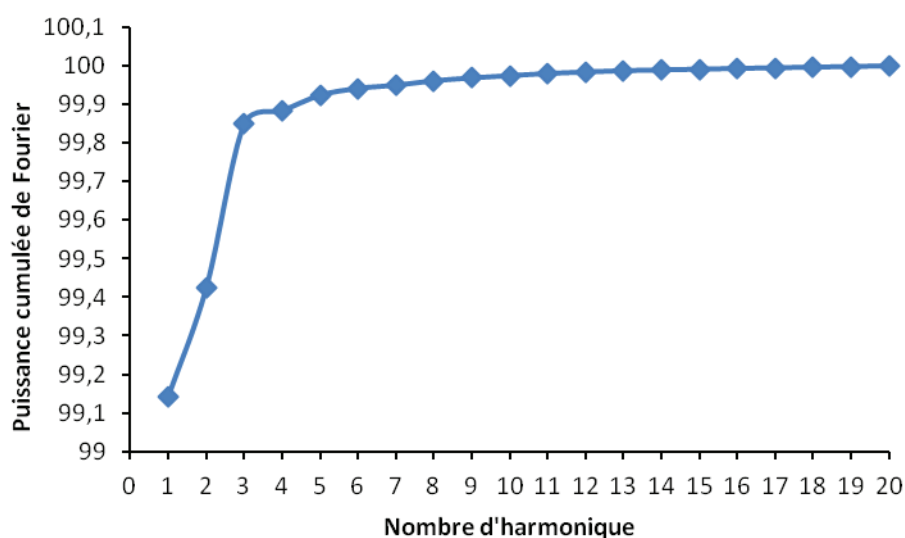


Figure 25 : Détermination du nombre d'harmoniques nécessaire pour l'analyse de Fourier.

### 2.3.6. Analyse génétique des populations

Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire « Evolution des poissons » de l'UMR 5554 ISEM de l'Université de Montpellier II et à l'UMR ECOSYM au campus IRD/ISRA de Dakar.

Tableau 6 : Loci microsatellites utilisés dans cette étude.

Loci	Genbank	Motif répété	5'-3' séquence	Ta (°C)	Fluorochromes
UNH 860	G68195	(GT)	F: ACTGTTTACCCACTGCGACA R: AGATGTGTCTGAGCCATCCA	55	cy3
UNH 874	G68202	(GT)	F: AGTAAAATGGGCGAACGTGT R: TGAAGCTGGGAGTTTCTGT	55	6 Fam
UNH 887	G68210	(CA)	F: ACCTTTCGTACAGGGCACAG R: CCACAATGACAACCTCAACACC	55	Tamra
UNH 1003	G68280	(CA)	F: CAGTGTTAAGTGGCTTCACCA R: AGCAAGGAACTCGAGAGCTG	55	cy3
PrII	AY995119	(CA)	F: GTTAGCCCCCTCCTCACTCT R: ACCTTGCTCGTCACACCTG	55	Tamra
SmelI	U69153	(CAA)	F: ACAAGTTGTGTAATACTGCTC R: CTTTCTAATGCTTCAAAGGTG	53	cy3

L'extraction de l'ADN total des échantillons de *S. melanothron* a été réalisée par la méthode phénol/chloroforme selon le protocole de Sambrook et al, (1989). Un bout de nageoire est incubé à 55°C pendant 2h après ajout de 250 µl de tampon d'extraction (1 M TRIS pH 8, SDS 10 % and 0,5 M EDTA) et 20 µl de protéinase K. L'ADN est extrait avec 270µl de phénol/chloroforme et récupéré après centrifugation. L'ADN contenu dans le surnageant est précipité dans de l'éthanol 100 % avant d'être lavé avec de l'éthanol 70 %. Le précipité est séché et repris dans 100 µl d'eau ultra pure et stocké à -20°C. La pureté de l'extraction a été vérifiée sur gel agarose 2 % dans du TAE (Tris Acetate EDTA) 0,5 X (40min/100V) et visualisés sous UV après coloration au BET (Bromure d'éthidium).

La diversité et la structure génétique des populations ont été caractérisées à l'aide de 6 loci microsatellites (Tableau 6) utilisés dans des études antérieures (Pouyaud et al., 1999; Carleton et al., 2002; Agnèse et al., 2009).

La spécificité des différentes paires d'amorces (Tableau 6) a été testée sur une dizaine d'individus. L'amplification par PCR a été faite dans un volume réactionnel contenant 10 µl de tampon TAQ polymerase (Promega), 5 µl de BSA 0,2 %, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 1,85 µl dNTPs, 0,5 µl de chaque amorce (forward et reverse), à 0,25 µl TAQ DNA polymerase (Promega) et 27,9 µ d'eau auquel on ajoute 1 µl d'ADN. Le programme d'amplification modifié de Agnèse et al. (2009) a été utilisé pour l'ensemble des amorces. L'amorce forward des différents couples ont été marquées par un fluorochrome (TAMRA, 6-FAM ou CY3) afin de visualiser le polymorphisme de tailles sur le gel d'acrylamide.

Les produits PCR obtenus avec les amorces marqués ont été dilués avec du formamide et dénaturés à 95°C/5 min, puis conservés sur la glace. Le mélange est déposé sur un gel acrylamide 8 %. En fonction des locus la migration peut durer de 50 min à 1h. La lecture du gel est réalisée un Scanner FMBIO 2 qui permet une estimation de la taille des différents allèles.

L'analyse des fréquences alléliques a été réalisée avec le programme Micro-Checker 2,2,3 (Van Oosterhout et al., 2004) pour déterminer la présence d'allèles nuls et le cas échéant de les corriger. Les déviations aux fréquences de l'équilibre de Hardy-Weinberg(HWE)<sup>15</sup> et les *F*-statistiques de Wright (Fis, Fit et Fst) ont été évaluées en utilisant GENETIX version

---

<sup>15</sup> Equilibre de Hardy-Weinberg (HWE) c'est un modèle théorique centrale de la génétique des populations dont l'hypothèse est l'équilibre de la fréquence des allèles et des génotypes au cours d'une génération

4,03 (Belkhir et al., 2004). Le nombre d'allèle par locus ( $N_a$ ), l'hétérozygotie observée ( $H_o$ ) et l'hétérozygotie attendue ( $H_e$ ) obtenus avec GENETIX ont permis d'évaluer la variabilité génétique. L'Analyse Hiérarchique de Variance Moléculaire (AMOVA) réalisée avec ARLEQUIN (Excoffier et al., 2005) a permis l'estimation du niveau de différenciation des populations et la structure génétique du *S. melanothron*. La différence entre les individus de toutes les populations ( $F_{it}$ ), les individus dans une population ( $F_{is}$ ), les populations au sein d'un groupe ( $F_{sc}$ ) et les différents groupes ( $F_{ct}$ ) représentent les composantes de la variance totale. L'écosystème, l'écotype et la distance géographique ont été utilisés pour définir différents groupes.

L'assignation des individus à des groupes génétiques a été réalisée avec le logiciel TESS (Jakobsson & Rosenberg, 2007). Cette analyse a permis la détection de clines au sein de l'échantillon et de différents pools génétiques.



**Chapitre 3 : Evaluation *in situ* des niveaux de  
réponses des biomarqueurs  
physiologiques et biochimiques  
chez le tilapia *Sarotherodon melanotheron* :  
influence potentielle de la salinité**



# **Chapitre 3 : Evaluation *in situ* des niveaux de réponses des biomarqueurs physiologiques et biochimiques chez le tilapia *Sarotherodon melanotheron* : influence potentielle de la salinité**

## **Synthèse du manuscrit 1**

Cette partie du travail avait pour objectif d'évaluer la capacité du tilapia *Sarotherodon melanotheron* à répondre au stress multiple dans l'environnement. La mesure d'un seul biomarqueur ne permet pas d'évaluer les effets des contaminants sur le biota à cause de la complexité des écosystèmes, mais aussi à cause de l'influence des facteurs exogènes multiples sur la réponse des biomarqueurs (Adams, 2005). Les conditions du milieu et les organismes peuvent influencer la toxicité et la biodisponibilité des contaminants. Parmi les organismes aquatiques, les poissons sont des intégrateurs sensibles des effets des contaminants qui peuvent s'accumuler et causer des effets létaux (van der Oost et al., 2003). Ces effets peuvent atteindre les niveaux les plus élevés d'organisation biologique, affectant les fonctions vitales liée à la survie des organismes (De Maagd & Vethaak, 1998). Les réponses des biomarqueurs et les variations des indices physiologiques sont des paramètres qui permettent une détection précoce des effets des contaminants avant que les altérations soient observables au niveau des populations (Arinc et al., 2000).

Huit sites ont été choisis selon un gradient de salinité croissant (eau douce à eau hypersalée) et de contaminant chimique (faiblement à fortement impacté). Dans cette étude un ensemble d'indicateurs complémentaires a été utilisé chez des *S. melanotheron* échantillonnés *in situ* au Sénégal. Pour une meilleure discrimination des sites, les contaminations ont été quantifiées et leurs effets ont été évalués à l'aide d'un ensemble de biomarqueurs complémentaires (EROD, GST, AChE et TBARS) et d'indicateurs de modifications de traits de vie (condition et taux de croissance). Comme d'une saison à l'autre les milieux aquatiques sénégalais sont soumis à de forts contrastes physico-chimiques, les poissons ont été échantillonnés à deux saisons (sèche et humide) pour prendre en compte l'impact de la

Chapitre 3. Evaluation *in situ* des niveaux de réponses des biomarqueurs physiologiques et biochimiques chez le tilapia *Sarotherodon melanotheron* : influence potentielle de la salinité

variation saisonnière sur la réponse des biomarqueurs. Parallèlement la caractérisation des contaminants présents dans chaque site d'étude a été réalisée sur des échantillons de sédiments.

L'article issu de cette étude et publié a montré des niveaux de contamination relativement différents d'un site à un autre, mais aussi d'une saison à une autre. Les niveaux de contamination étaient plus importants en HAP qu'en PCB, PBDE et pesticides. Certaines réponses étaient en accord avec le niveau de contaminants mesurés sur la zone d'étude. La proximité des industries et des ports de la baie de Hann à Dakar et de la station de Foundiougne dans le Saloum ont permis d'expliquer les niveaux élevés de HAP observés sur ces sites. Le couplage des données relatives à la réponse des biomarqueurs et à la contamination chimique des milieux a permis de discriminer les sites. Ces résultats ont montré que le tilapia répond à la présence de contaminants dans le milieu. Plus récemment des effets néfastes d'autres contaminants présent dans l'environnement ont été observés (Sanchez et al., 2011). Par exemple il semble nécessaire de prendre en compte également les effets des perturbateurs endocriniens dans la surveillance des écosystèmes aquatiques et cela a été l'objet du prochain Chapitre sur l'évaluation des effets oestrogéniques de la contamination chez le tilapia.

Chapitre 3. Evaluation *in situ* des niveaux de réponses des biomarqueurs physiologiques et biochimiques chez le tilapia *Sarotherodon melanotheron* : influence potentielle de la salinité

**Manuscrit 1. Multiparametric approach for assessing environmental quality variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species, paru à 'Environmental Sciences and Pollution Research'**

# Multiparametric approach for assessing environmental quality variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species

Awa Ndiaye · Wilfried Sanchez ·  
Jean-Dominique Durand · Hélène Budzinski ·  
Olivier Palluel · Khady Diouf · Papa Ndiaye ·  
Jacques Panfili

Received: 9 January 2012 / Accepted: 9 May 2012 / Published online: 30 May 2012  
  Springer-Verlag 2012

**Abstract** The study highlights the potential of the black-chinned tilapia to be used as a sentinel to assess environmental contaminants based on the use of a set of biomarkers. The usefulness of fish species as sentinels for assessing aquatic environment contamination was tested using a set of biomarkers in Senegalese environments characterized by

multi-pollution sources. The black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) was selected as a sentinel because of its abundance, wide distribution in all coastal aquatic ecosystems and physiological properties. The potential influence of confounding factors such as salinity on biomarker in the tilapia has been examined. Individuals were sampled during two seasons (dry and wet) in eight sites characterized by various degrees of anthropogenic contamination and different salinities (from 0 to 102 psu). Biomarkers—including growth rate (GR), condition factor (CF), biotransformation enzymes such as 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and glutathione-*S*-transferase (GST), lipid peroxidation (TBARS) and acetylcholinesterase (AChE)—were measured. Chemical contaminant [polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs)] levels showed different sources of contamination with relatively high concentrations of PAHs in the Hann Bay and Foundiougne locations. The most sensitive biomarker present in different sites according to the principal component analysis is EROD. Few variations of the AChE activity and TBARS levels were found. No clear relationship was found between biomarker responses and salinity, but GR and CF were lower in hypersaline conditions. Tilapia is responsive to environmental contaminants such as PAHs, OCPs and PCBs. The *S. melanotheron* multiparametric approach showed a better discrimination of sites.

Responsible editor: Henner Hollert

**Highlights** A multiparametric approach investigated the capacity of tilapia in biomonitoring aquatic ecosystems. •The biochemical and physiological responses were measured in wild fish collected from different sites. •PAHs, PCBs and OCPs decrease during the wet season. •The impact of salinity might be considered when using tilapia for monitoring pollution.

A. Ndiaye (✉) · J.-D. Durand  
UMR 5119 ECOSYM, Université Montpellier 2,  
place Eug ne Bataillon, CC 093,  
34095 Montpellier Cedex 5, France  
e-mail: awa.ndiaye@ird.fr

J. Panfili  
IRD, UMR 5119 ECOSYM, LABEP-AO,  
B.P. 1386, 18524 Dakar, Senegal

W. Sanchez · O. Palluel  
INERIS, DRC, Unité d' cotoxicologie BP 2,  
60550 Verneuil en Halatte, France

H. Budzinski  
UMR 5805 EPOC/LPTC,  
Université Bordeaux 1, 351 Cours de la Lib ration,  
33405 Talence, France

K. Diouf · P. Ndiaye  
IFAN, Laboratoire de Biologie Marine, LABEP-AO, UCAD,  
B.P. 206, Dakar, Senegal

**Keywords** Biomarkers · Chemical pollutants · Sentinel species · Aquatic ecosystem · Integrative approach · Salinity

## Introduction

Freshwater, estuarine and coastal aquatic ecosystems are contaminated by complex mixtures of chemicals discharged by human activities. This contamination involving heavy metals; persistent organic pollutants (POPs)—such as polychlorinated biphenyls (PCBs), organochlorine pesticides (OCPs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated dibenzofurans or polychlorinated dibenzop-dioxins (PCDDs)—various pesticides; and also emerging pollutants including hormones and pharmaceutical compounds is well described around the world. Many studies report the environmental contamination effects on aquatic organisms at the biochemical, histological and physiological levels (see, for review, van der Oost et al. 2003). Pollutants can disturb various biological functions such as xenobiotic metabolization, immunity, growth, reproduction, and behaviour and can induce fish population disturbances or collapse (Kidd et al. 2007). Since the last decade, climate change has appeared as a new threat for aquatic environments. One of the consequences of this global phenomenon is the increase of water temperature and the increase of hypersaline environments. Several experimental studies have investigated the effects of temperature increase on fish and have reported adverse effects on key physiological functions. For example, temperature has a substantial influence on salinity tolerance in both seawater-acclimated tilapia hybrids and those transferred to a hypersaline environment (Sardella et al. 2004). However, a water temperature increase is not the only consequence of climate change for aquatic ecosystems: reduction of oxygen concentration, increase of salinity, disturbance of physicochemical processes including thermal stratification and nutrient cycling are also described as consequences of climate change (Ng and Gray 2011). Such direct consequences can interact with environmental contamination and cause an increase of chemical concentrations due to high evaporation, a change in precipitations and remobilization of pollutants in sediments due to flooding (Carere et al. 2011). Also, in a context of climate change, wild fish species are exposed to a mixture of environmental pressures that can interact with physiological processes and disturb fish assemblages. Temperature and salinity were also found to be important factors affecting the distribution and abundance of fishes in estuaries in several parts of the world (Harrison and Whitfield 2006). Ecosystems are also subjected to high environmental pressure due to anthropogenic forcing, such as eutrophication, overfishing, bank reclamation and general environmental degradation (Martinho et al. 2008). Pagès and Citeau (1990) reported that some northern West African coastal environments, however, have received little or no freshwater input except for rainfall for several decades and, under the intense evaporation regime of the area, have become highly saline

or even hyperhaline. For example, after 30 years of drought in the area, two Senegalese estuaries—the Casamance and Saloum estuaries—have shifted to a status of hyperhaline “inverse estuaries” (Debenay et al. 1994; Pagès and Citeau 1990; Panfili et al. 2004).

The present study was designed to assess the adverse effects of chemical pollutants and environmental change on the wild black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron* Rüppell) in Senegalese ecosystems. This euryhaline fish species can live in all types of water bodies (from marine to freshwater and even hypersaline) and tolerates a wide range of salinities, from 0 to 134 psu (Panfili et al. 2006). This species was tested as a sensitive model in our study area. Tine et al. (2010, 2007) showed in previous studies the relationships between salinity and gene expressions in *S. melanotheron* living in a natural environment. These results confirmed its capacity to get acclimated to freshwater with the expression of the prolactin 1 gene and genes related to osmotic homeostasis. Hypersaline conditions constrain life history traits and reduce both the growth and the size at maturity (Panfili et al. 2004). More recently, Tine et al. (2010) have shown the impact of salinity on the relative expression of Hsp70 in the species in the Saloum estuary, with the highest Hsp70 mRNA level matching the highest salinity. Even if other aspects of the ecology of *S. melanotheron* have also been investigated (Ecoutin et al. 1989; Faunce 2000; Kone and Teugels 1999; Legendre and Ecoutin 1989), showing a high tolerance to temperature and dissolved oxygen variation, the impact of contaminants was not taken into consideration. To go further with this line of thought, it is necessary to use an integrated approach that would at least consider both salinity and contaminants.

The combined effects of aquatic environment pollution and environmental change reflected by salinity variation were investigated in the present study by considering a set of complementary biomarkers. The biochemical effects were measured using biomarkers related to the xenobiotic metabolism, including 7-ethoxoresorufin-*O*-deethylase (EROD) and glutathione-*S*-transferase (GST), to the oxidative stress adverse effect reflected by lipid peroxidation and to the neurotoxicity indicator such as brain acetylcholinesterase (AChE) activity. These tools are recognized as powerful to address the adverse effects of pollutants in wild organisms, including the bioavailability and the metabolization of chemicals, the sensitivity of selected model fish species, and the complex interactions between the environment and organisms (Sanchez and Porcher 2009). To complete this approach, fitness disturbances were investigated by measuring the condition factor (CF) and the growth rate (GR).

**Materials and methods**

**Study area and sampling**

The sampling sites (Fig. 1) in Senegal are water bodies of different salinities. In this area, the climate is characterized by an extended dry season, cool from November to March and warm from April to June, and by a short wet and warm season from July to October (Simier et al. 2004). The sampling was carried out at eight locations in May and October 2009. Around the Senegalese capital Dakar, Hann Bay is characterized by urban activities, chemical industries, fisheries and agriculture. In Dakar, the Niayes area includes lakes or temporal ponds which are sometimes saline. The major activity in the Niayes area is urban small-scale agriculture, but other economic activities such as fishery can also be found (Senegal National Report 2002). The Senegal estuary site, near the city of St. Louis, is surrounded by all types of urban activities. In contrast, the Guiers Lake, part of the upper delta of the Senegal River, forms the largest freshwater reservoir in Senegal and supplies drinking water for the capital, Dakar (Berger et al. 2006). The Saloum Delta is a large inverse estuary which is impacted by pressures from fishing, agriculture and tourism. In the upper part of this estuary is an intensive salt production, particularly at Kaolack (Senegal National Report 2002).

At each sampling site, water salinity was measured with a refractometer; surface sediment was collected, stored in aluminium containers and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further chemical analysis. *S. melanotheron* individuals were collected at each site and season using size-stratified sampling and were measured, weighed, sexed and dissected. Sexual maturity was determined macroscopically using a standard scale of maturity stage (Legendre and Ecoutin 1989). Liver and brain tissues were dissected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis. Otoliths (ear stones) were extracted, washed in distilled water and stored dried in referenced microtube vials.

**Chemical analyses**

POPs and PAHs were extracted using a combined protocol. After matrix freeze drying, sieving at 2 mm and grinding, samples were extracted for 10 min at 30 W using microwave-assisted extraction with dichloromethane as the solvent (Budzinski et al. 2000). The respective PAH and POP internal standards were gravimetrically added prior to the extraction, and one extraction blank was performed with each series of extractions.

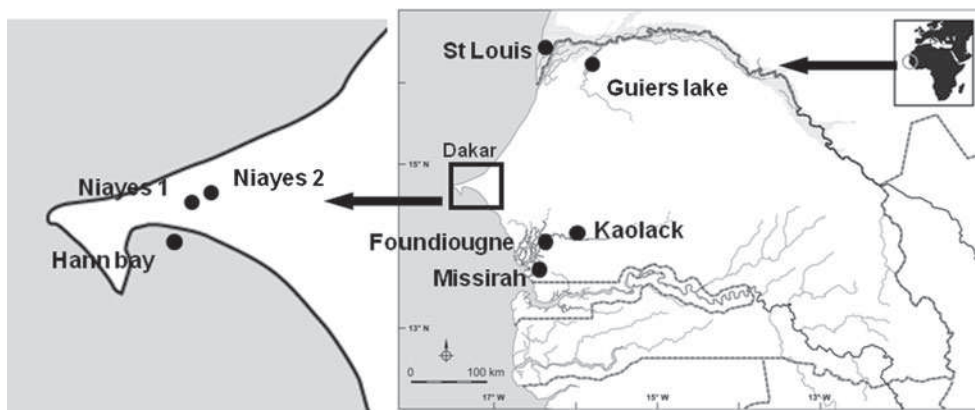
Purification was adapted from Tapie et al. (2008, 2011). The sample was filtered and further separated into two subsamples. One of them was used for PAH determination and the other one for POP determination.

For POP analysis, the extracts were then purified on an acidic silica gel column (silica was cleaned with dichloromethane before acid silica gel preparation). The acidic silica gel was prepared by mixing 600 g of silica gel and 400 g of sulphuric acid overnight at  $200^{\circ}\text{C}$ . PCBs, OCPs and PBDEs were eluted with  $3 \times 5$  ml of a mixture of pentane/dichloromethane (90:10, v/v). The extracts were concentrated, transferred to isoctane and the syringe standard (octachloronaphthalene) added before analysis by gas chromatography coupled to electron capture detector (GC-ECD).

For PAH analysis, the extracts were first purified by elution on an alumina column (15 ml of dichloromethane) and then, after reconcentration and transfer to isoctane, by elution on a silica column (5 ml of pentane was discarded and the final purified extracts collected by elution with 15 ml dichloromethane/pentane, 35:65, v/v). The extracts were concentrated, transferred to isoctane and the syringe standards (perdeuterated pyrene and benzo(b)fluoranthene) added before analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

PAHs were analysed by GC-MS according to the protocol described by Baumard et al. (1999). Perdeuterated phenanthrene, fluoranthene, chrysene benzo[e]pyrene, benzo[a]

**Fig. 1** Sampling locations of *S. melanotheron* in Senegal





pyrene and benzo[ghi]perylene were used as internal standards. Organochlorines including PCB, OCP and PBDE congeners were analysed by GC-ECD according to the protocol described by Thompson and Budzinski (2000). PCB congeners 30, 103, 155 and 198 were used as internal standards for PCB and PBDE determination; DDT-d8 was used for pesticide analysis.

To test the accuracy and the validity of the quantification method, standard solutions (on one hand for PAHs and on the other hand for POPs) of the compounds to be quantified mixed with the related internal standards are regularly run on the GC-MS and GC-ECD systems. These solutions are used, on the one hand, to calculate the response factors; on the other hand, other independent solutions are used to test the precision of the quantification, which has been evaluated to comprise between 95 and 102 % depending on the compounds, with reproducibilities comprising between 1 and 4 %. Moreover the entire analytical procedure was applied several times to the certified marine sediment, SRM 1944 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). The recoveries for five replicates on this SRM were between 80 and 100 %, with reproducibilities ranging from 5 to 15 % depending on the compounds.

All chemical concentrations are based on dry weight. A total of 22 PAHs measured in the sediment was represented by  $\Sigma(\text{PAHs}-\text{napht})$ , corresponding to 16 priority PAHs excluding Napht;  $\Sigma\text{Mnapht}$  is the sum of methyl-naphtalene and  $\Sigma\text{Mphe}$  represents the sum of methyl-phenanthrene.  $\Sigma(\text{PAHs}-\text{napht})$ ,  $\Sigma\text{Mnapht}$  and  $\Sigma\text{Mphe}$  were represented respectively by PAHs, Mnapht and Mphe. Seven PCB congeners (50, 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) and four PBDE congeners (47, 99, 119 and 153) were also measured.  $\Sigma\text{PCB}$  is the sum of seven PCB congeners and was represented by PCB.  $\Sigma\text{PBDE}$  represents the sum of four PBDE congeners and was represented by PBDE.  $\Sigma\text{OCP}$  corresponds to the sum of HCS, heptachlor, heptoxide, dieldrin, DDT and metabolites; *cis*-chlordane, *trans*-nonachlor, CB (154, 77, 170) were also measured in the sediment. Mirex and  $\Sigma\text{OCP}$  were represented by OCP.

#### Age estimation and fitness parameters

Otolith images were taken with the TNPC software (Visilog, Noesis, France) under a binocular microscope with reflected light against a dark background. For each otolith, the translucent and opaque zones were counted. Individual age was estimated using the number of opaque zones according to the validated method proposed by Panfili et al. (2004). The measure of the otolith radius of opaque zones along the antero-posterior axis was used to calculate the GR. The individual growth rate during the first year was estimated using the otolith radius at the first opaque zone ( $R_1$ , in millimetres). The CF was determined individually using

the individual length (*Fork Length*, in centimetres) and weight (*Total Weight*, in grams) according to the formula,

$$\text{CF} = \frac{W}{\text{FL}^3} \times 100$$

#### Biochemical measurements

All biochemical assays were adapted in microplates. The protein concentration used in each assay was optimized for *S. melanothron* to fit the linearity of each assay.

Liver and brain were separated and homogenized in ice-cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.8) supplemented with 20 % glycerol and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride as a serine protease inhibitor. The post-mitochondrial fraction was obtained after centrifugation of the homogenate at 10,000×g, 4°C, for 15 min. The total protein concentration was determined according to the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemicals, France) as a standard. The reaction was monitored at 570 nm.

The EROD, GST and thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) assays were performed on the hepatic post-mitochondrial fraction. EROD activity, expressed as picomoles per minute per milligram of protein, was determined by the method of Flammarion et al. (1998) using resorufin as a standard. The reaction mixture contained 10 µg of protein from the sample and an 8-µM 7-ethoxyresorufin solution. The reaction was initiated by adding 0.5 mM NADPH. The activity of EROD was assayed with a 530-nm excitation wavelength and a 590-nm emission wavelength.

The GST activity, expressed as units per gram of protein, was determined at 340 nm by the method of Habig et al. (1974) using CDNB as a substrate. The assay mixture containing phosphate buffer (pH 6.5), 42 mM CDNB and 42 mM GSH and was added to 0.5 µg of proteins from the sample.

The lipid peroxidation assay was based on a fluorimetric assay of the degradation product MDA-TBA according to Ohkawa et al. (1979) using MDA as a standard. The reaction mixture containing 50 % trichloroacetic acid, 1.3 % thiobarbituric acid, 1 mM BHT and 10 mM EDTA in phosphate buffer was added to 15 µg of proteins from the sample. Lipid peroxidation was estimated by spectrophotometry at 515-nm excitation and 553-nm emission wavelengths. The results are expressed as nanomoles of TBARS per gram of protein.

The AChE activity was determined in the brain post-mitochondrial fraction using the method of Ellman et al. (1961) with acetylcholinesterase as a standard. Of the proteins from the sample, 0.2 µg was mixed with phosphate buffer containing 210 mM acetylthiocholine iodide and 21 mM dithiobis-2-dinitrobenzoic acid. The activity was

measured at 405 nm and the results expressed as units per gram of protein.

Statistical analysis

The results are expressed as the means±standard deviation. Kolmogorov–Smirnov and Levene tests were used to check for normal distribution and the homoscedasticity of the data. If these initial conditions were not verified, the data were log-transformed. Two-way ANOVA, with gender and location as factors, was used to test for differences between means. One-way ANOVA, using location as a factor, followed by post hoc Tuckey’s test was used to compare all means. A principal component analysis (PCA) was performed with all parameters. Statistica® and R software were used for the statistical analysis.

Results

Characterization of the environmental contamination

Salinities ranged from 0 to 102 psu (Table 1). The highest salinities were found during the dry season, with the exception of Niayes 2. Two sites, Guiers Lake and Niayes 2, were freshwaters (0–2 and 2.7–5.0 psu for the two seasons, respectively), whilst the salinity found in Hann Bay (34.0–34.7 psu) was the same as that of the sea. The other sites sampled in the Senegal estuary (St. Louis), Niayes 1 and the Saloum estuary (Missirah, Foundiougne and Kaolack) were characterized by salinities ranging from 27 to 102 psu

during the dry season and from 3 to 40 psu during the wet season.

In the sediments, PAHs ranged from 12.5 to 14,378 ng/g dry weight (d.w.) during the dry season and from 5.8 to 276 ng/g d.w. during the wet season. The concentration of PAHs was lower during the wet season than during the dry season (Table 2), and among sites, the higher PAH concentrations were measured in sediments collected in Hann Bay and Foundiougne (5,855 and 14,378 ng/g d.w., respectively). The highest Mnapht concentrations were found at Hann Bay in both seasons (32 and 4.2 ng/g d.w., respectively). The highest value of Mphe was found in the Foundiougne sediments during the dry season (398 ng/g d.w.). The highest PAHs were found at Hann Bay during the wet season.

PCBs and PBDEs were also present among the chemicals measured. During the dry and wet seasons, the PCB concentrations were 0.6–19 and 0.3–25 ng/g d.w., respectively (Table 3). The highest PCB concentrations were found at Hann Bay during the dry and wet seasons (19 and 25 ng/g d.w., respectively). Lower values of PCBs were found at other sites, with concentrations of 0.6–6.7 ng/g d.w. in the dry season and 0.5–6.8 ng/g in the wet season. The PCB concentrations were higher than those of PBDE. Relatively low PBDE concentrations were found in all sites. The PBDE concentrations in the sediments during the dry and wet seasons ranged from 0 to 0.5 and from 0 to 0.7 ng/g d.w., respectively.

The OCP ranged from 0.6 to 32 ng/g d.w. during the dry season and from 0.4 to 6.1 ng/g d.w. during the wet season (Table 4). The highest OCP concentrations were measured at Niayes 2 and Kaolack. DDT was present at high

**Table 1** Biological parameters of *S. melanotheron* sampled in different locations in Senegal and salinity during each sample

Parameter	Guiers Lake	Niayes 2	St. Louis	Hann Bay	Missirah	Foundiougne	Niayes 1	Kaolack
Dry season								
Salinity (psu)	2.0	2.7	27.0	34.7	39.3	51.4	58.6	102
<i>n</i> (M/F)	30 (16/14)	30 (21/9)	20 (15/5)	30 (14/16)	30 (12/18)	30 (12/18)	20 (4/16)	30 (12/18)
FL (mm)	175±12	133±14	170±25	134±6	129±19	136±17	147±29	130±12
<i>W</i> (g)	125±26	48±20	98±46	50±8	49±23	47±19	75±52	42±12
Age (months)	22±8	14±6	22±7	22±2	19±12	26±5	8±4	48±14
<i>S</i> (mm)	3.0±0.2	2.1±0.2	2.7±0.3	2.2±0.1	2.3±0.4	2.5±0.2	2.2±0.4	2.5±0.2
Wet season								
Salinity (psu)	0.0	5.0	3.0	34.0	25.0	33.0	40.0	32.0
<i>n</i> (M/F)	30 (15/15)	30 (8/22)	30 (15/14)	30 (18/12)	30 (18/11)	30 (12/18)	30 (11/19)	30 (11/19)
FL (mm)	152±18	142±27	146±31	113±11	145±19	129±20	128±19	119±19
<i>W</i> (g)	80±24	63±31	75±46	25±9	65±25	49±28	46±23	35±15
Age (months)	12±6	17±12	14±6	9±6	20±12	10±9	10±12	19±14
<i>S</i> (mm)	2.7±0.2	2.2±0.5	2.5±0.4	2.0±0.5	2.6±0.4	2.4±0.3	2.2±0.3	2.2±0.3

Results are presented as the mean±SD

FL fork length, *W* weight, *S* otolith posterior length, *M* male, *F* female, *n* number of fish

**Table 2** PAH concentrations (in nanograms per gram dry weight) in sediment collected during the dry and wet seasons

Compound	Guiers Lake	Niayes 2	St. Louis	Hann Bay	Missirah	Foundiougne	Niayes 1	Kaolack
Dry season								
CB 50+28	nd	nd	nd	nd	nd	0.20	nd	nd
CB 52	0.40	0.54	0.09	0.61	0.61	0.36	0.45	0.34
CB 101	0.30	nd	0.10	1.77	0.91	0.87	nd	nd
CB 118	0.33	nd	0.21	1.43	1.63	1.00	nd	nd
CB 153	0.12	nd	0.18	5.91	1.57	0.58	nd	0.48
CB 138	0.17	nd	0.21	4.78	1.68	0.70	nd	0.33
CB 180	0.04	0.10	0.11	4.42	0.33	0.11	0.14	0.59
BDE 47	nd	0.09	nd	0.40	nd	0.13	nd	0.05
BDE 119	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BDE 99	nd	0.08	nd	0.12	0.06	nd	nd	0.04
BDE 153	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Wet season								
CB 50+28	nd	nd	nd	0.12	nd	ns	0.06	0.24
CB 52	nd	0.15	nd	0.62	nd	ns	0.70	1.98
CB 101	nd	0.17	nd	2.03	0.08	ns	0.35	1.05
CB 118	0.05	0.34	0.18	1.34	0.21	ns	0.38	0.57
CB 153	0.08	0.44	0.18	7.95	0.09	ns	0.21	1.07
CB 138	0.10	0.51	0.20	6.81	0.10	ns	0.22	1.00
CB 180	0.13	0.46	0.12	6.44	nd	ns	0.11	0.93
BDE 47	nd	0.11	nd	0.56	nd	ns	nd	0.07
BDE 119	nd	nd	nd	0.05	nd	ns	nd	nd
BDE 99	nd	0.10	nd	0.07	nd	ns	nd	nd
BDE 153	nd	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd

nd level not detected, ns site not sampled

concentrations in Niayes 2, with 21 ng/g d.w. during the dry season. The highest concentration of DDE+dieldrin during the dry season was found at Kaolack. Lower values of OCP were found at other sites, with values ranging from 0.6 to 5.2 ng/g d.w. during the dry season and from 0.5 to 6.8 ng/g d.w. during the wet season.

#### Effects of contamination on wild fish

For both sampling seasons, adult male and female tilapias were collected in all the investigated sites (Table 1). However, according to the sampling site, several differences were noticed regarding the length, weight and age of the collected fish (Table 1). Indeed, the fish from Guiers Lake were bigger than other fish for both seasons. The age of the fish was also different from one sampling site to the other, but only during the dry season. Indeed, the calculated age was 8±4 months in Niayes 1 and 48±14 months in Kaolack. This variation was not observed during the wet season.

EROD activity was characterized by a significant difference between seasons. The measured values were higher during the dry season than during the wet season. In the dry season (Fig. 2A), the EROD activity showed significant

differences depending on the sampling sites, the lowest value of  $2\pm 164$  pmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> being measured in Niayes 1. The highest values of EROD activity were measured in Hann Bay and in Niayes 2 ( $23\pm 9$  and  $12\pm 5$  pmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectively). During the wet season, EROD activity ranged from  $2.0\pm 2.1$  pmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> for Foundiougne to  $13\pm 15$  pmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> for Hann Bay. EROD activity showed the highest activity during the dry season. These results reflected fish exposure to dioxin-like chemicals, particularly in Niayes 2.

In contrast to EROD activity, no seasonal difference was observed for GST activity. Inter-site differences (Fig. 2B) were noticed, but only during the dry season. A high level of GST activity was measured in fish from Missirah and Niayes 1 ( $12,214\pm 7,014$  and  $11,488\pm 4,665$  U/g, respectively). No significant difference was observed between fish collected during the wet season, with a GST activity ranging from  $7,362\pm 1,651$  to  $9,452\pm 3,855$  U/g.

No significant seasonal difference in the TBARS levels was observed ( $p=0.074$ ). During the dry season (Fig. 3A), there was no site-related difference in the TBARS levels, but this result could be explained by the high variability of this parameter. An induction trend was recorded in fish from St.

**Table 3** PCB concentrations (in nanograms per gram dry weight) in sediment collected during the dry and wet seasons

Compound	Guiers Lake	Niayes 2	St. Louis	Hann Bay	Missirah	Foundiougne	Niayes 1	Kaolack
Dry season								
Naphthalene	2.29	1.04	1.05	2.37	nd	4.40	nd	nd
Acenaphthylene	2.40	0.21	0.34	2.30	nd	27.15	nd	nd
Acenaphthene	0.27	0.20	0.12	158.70	nd	40.22	nd	0.37
Fluorene	0.26	0.58	0.12	69.90	0.11	46.39	0.03	0.55
Phenanthrene	2.20	3.03	8.33	292.58	0.39	822.95	1.14	5.42
Anthracene	1.03	0.47	0.23	58.54	0.16	260.10	0.18	0.64
Fluoranthene	4.18	3.76	16.46	643.37	1.20	213.51	2.86	8.15
Pyrene	8.22	3.52	11.86	509.28	1.14	1,829.82	2.71	6.95
Benz[ <i>a</i> ]anthracene	3.12	1.50	3.68	490.53	0.56	1,212.73	1.98	3.70
Triphenylene+chrysene	5.17	2.70	10.85	530.16	1.15	1,171.46	2.43	6.65
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthenes (Ebf+Ekf+BJF)	8.06	2.79	21.88	346.33	1.54	2,055.02	3.74	8.50
Benzo[ <i>e</i> ]pyrene	5.53	1.22	7.87	380.16	0.74	852.57	1.67	3.83
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	5.51	5.68	7.03	521.80	2.43	1,156.58	2.33	4.84
Perylene	5.48	1.53	2.26	170.87	1.11	377.00	1.01	2.04
Indenopyrene	6.10	1.43	3.76	500.29	0.33	1,017.82	1.44	3.99
Dibenzanthracenes (DaA+DaC)	1.07	0.20	1.20	38.60	0.13	199.10	0.27	0.91
Benzo perylene	7.27	1.47	7.27	372.27	0.81	928.59	1.51	4.43
2-Methylnaphthalene	0.97	0.27	0.56	11.24	nd	1.91	nd	0.43
1-Methylnaphthalene	0.52	0.43	0.21	20.78	0.17	3.72	nd	0.31
2-Methylanthracene	0.62	0.31	0.08	10.08	0.20	70.52	0.08	0.54
3-Methylphenanthrene	2.70	1.43	1.75	57.70	0.54	222.03	0.56	6.88
3-Methylphenanthrene+1-methylanthracene	3.10	0.40	0.34	37.12	nd	176.87	nd	5.53
Wet season								
Naphthalene	0.09	0.85	0.15	3.26	0.19	ns	1.19	1.50
Acenaphthylene	0.02	nd	0.10	0.38	nd	ns	0.17	0.19
Acenaphthene	0.19	0.09	nd	1.83	nd	ns	nd	0.11
Fluorene	1.13	nd	nd	2.42	nd	ns	nd	0.60
Phenanthrene	5.56	1.23	0.44	16.71	0.06	ns	0.61	3.43
Anthracene	0.41	0.12	0.16	2.18	0.10	ns	0.09	0.64
Fluoranthene	9.14	2.18	3.02	31.99	0.53	ns	0.66	5.41
Pyrene	6.93	1.97	2.48	30.52	0.50	ns	0.65	5.71
Benz[ <i>a</i> ]anthracene	4.48	0.71	1.74	16.82	0.09	ns	0.26	1.35
Triphenylene+chrysene	8.31	1.95	2.53	30.12	0.32	ns	0.71	5.23
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranthenes (EbF+EkF+BJF)	15.82	2.32	4.32	46.17	1.30	ns	0.89	5.30
Benzo[ <i>e</i> ]pyrene	5.64	1.01	1.34	20.76	0.51	ns	0.28	3.09
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene	7.08	0.74	2.12	19.44	0.55	ns	0.12	1.13
Perylene	1.28	0.90	2.25	5.60	0.50	ns	nd	0.91
Indenopyrene	12.38	0.78	2.96	22.94	0.37	ns	nd	1.34
Dibenzanthracenes (DaA+DaC)	1.25	nd	0.37	4.78	nd	ns	nd	nd
Benzo perylene	10.29	1.10	2.15	20.26	0.56	ns	0.22	3.67
2-Methylnaphthalene	1.02	0.63	0.19	2.95	0.18	ns	0.17	1.82
1-Methylnaphthalene	0.31	0.23	0.06	1.21	0.07	ns	0.18	0.76
2-Methylanthracene	0.24	0.33	0.06	2.24	nd	ns	0.12	2.43
3-Methylphenanthrene	6.49	2.10	0.75	25.15	0.36	ns	0.72	16.71
3-Methylphenanthrene+1-methylanthracene	5.78	1.13	0.52	25.85	0.17	ns	0.60	17.30

*nd* level not detected, *ns* site not sampled

**Table 4** OCP concentrations (in nanograms per gram dry weight) in sediment collected during the dry and wet seasons

Compound	Guiers Lake	Niayes 2	St. Louis	Hann Bay	Missirah	Foundiougne	Niayes 1	Kaolack
Dry season								
HCB	0.27	nd	0.20	nd	nd	nd	nd	0.10
Heptachlor	0.50	nd	0.42	nd	nd	nd	nd	nd
Hepoxide	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2,4'-DDE	0.08	nd	0.06	0.12	0.05	0.11	nd	0.23
<i>cis</i> -Chlordane	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>trans</i> -Nonachlor	0.02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDE+dieldrin	0.23	3.21	0.96	2.91	2.00	0.32	1.02	8.35
2,4'-DDD+(CB154+77)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDD	nd	8.22	0.55	1.90	0.34	0.12	0.42	1.26
2,4'-DDT	nd	nd	nd	0.13	nd	nd	nd	nd
4,4'-DDT	nd	21.03	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Mirex+CB170	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Wet season								
HCB	0.11	0.09	0.12	0.09	0.08	ns	0.06	0.20
Heptachlor	0.26	0.18	0.31	0.13	0.21	ns	0.14	0.39
Hepoxide	nd	nd	nd	0.05	nd	ns	nd	nd
2,4'-DDE	nd	nd	nd	0.17	nd	ns	nd	0.16
<i>cis</i> -Chlordane	nd	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd
<i>trans</i> -Nonachlor	nd	nd	nd	0.05	nd	ns	nd	nd
4,4'-DDE+dieldrin	0.06	2.01	0.29	3.32	0.15	ns	0.40	0.60
2,4'-DDD+(CB154+77)	nd	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd
4,4'-DDD	nd	0.83	0.22	2.32	0.09	ns	0.26	0.32
2,4'-DDT	nd	0.13	nd	nd	nd	ns	0.06	0.15
4,4'-DDT	nd	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd
Mirex+CB170	nd	nd	nd	nd	nd	ns	nd	nd

nd level not detected, ns site not sampled

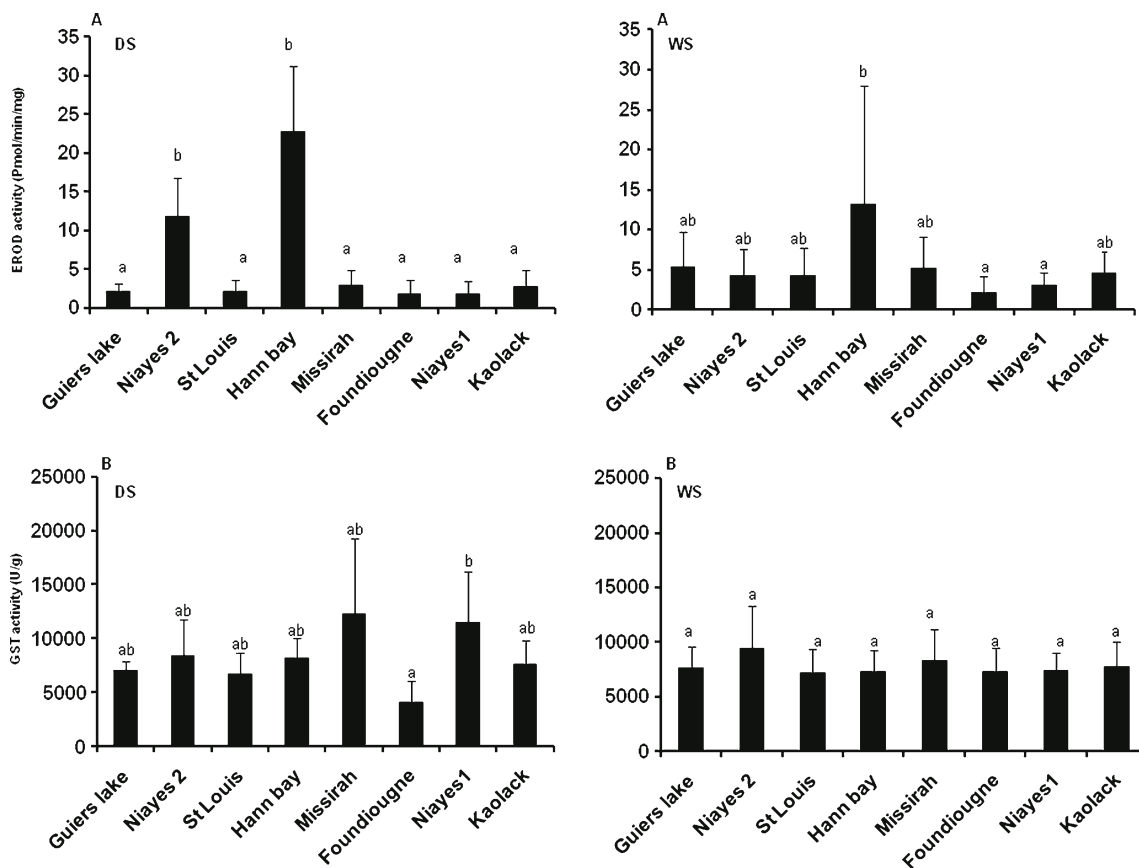
Louis ( $100 \pm 70$  ng/g). In the wet season, the TBARS levels were significantly different in the investigated sites. High TBARS values were measured in Guiers Lake, Missirah and Foundiougne ( $86 \pm 30 \pm 69$  and  $76 \pm 36$  ng/g, respectively). This result revealed that fish sampled during the wet season were affected by oxidative stress.

The AChE activity showed significant differences between seasons. Moreover, no inter-site difference (Fig. 3B) was recorded for both sampling seasons. The AChE activity ranged from  $594 \pm 64$  to  $757 \pm 193$  U/g during the dry season and from  $601 \pm 165$  to  $797 \pm 234$  U/g during the wet season.

The measured fitness parameters, i.e. condition factor and growth rate, were characterized by significant differences between sites during the dry and wet seasons. The CF values ranged from  $1.9 \pm 0.2$  to  $2.3 \pm 0.1$  g/cm<sup>3</sup> in the dry season and from  $1.7 \pm 0.2$  to  $2.2 \pm 0.2$  g/cm<sup>3</sup> during the wet season (Fig. 4A). The GR values ranged from  $1.9 \pm 0.2$  to  $1.4 \pm 0.2$  mm/year during the wet season and from  $1.1 \pm 0.3$  to  $1.9 \pm 0.4$  mm/year in the wet season (Fig. 4B).

#### Principal component analysis

The PCA testing and synthesizing all biomarker responses in tilapia between sites and chemical levels indicated discrimination between locations. During the dry season (Fig. 5), the first two axes represented 48.0 % of the total variance: PC1 accounted for 29.4 % and PC2 accounted for 18.6 % of the variability. GR, TBARS, GST and CF were positively correlated. These parameters and EROD were negatively correlated. A relationship was found between all measured chemicals: they were positively correlated with EROD and negatively correlated with GR, CF, TBARS and GST. This PCA showed different groups of locations: Foundiougne and Hann Bay being clearly isolated and characterized by the presence of high levels of chemicals such as PAHs, MPhe, PCBs, PBDEs and Napht and Niayes 2 being defined by low salinity and OCPs. All other sites were not discriminated. During the wet season, 55.1 % of the total variance was accounted for by the two first axes (Fig. 6). PC1 accounted for 45.1 % and PC2 for 10 % of the



**Fig. 2** EROD (A) and GST (B) activities of *S. melanotheron* from the different Senegalese locations during the dry and wet seasons. Results are presented as the mean+SD. Different letters represent significant

differences between locations (ANOVA, Tukey’s test,  $p < 0.05$ ). DS dry season, WS wet season

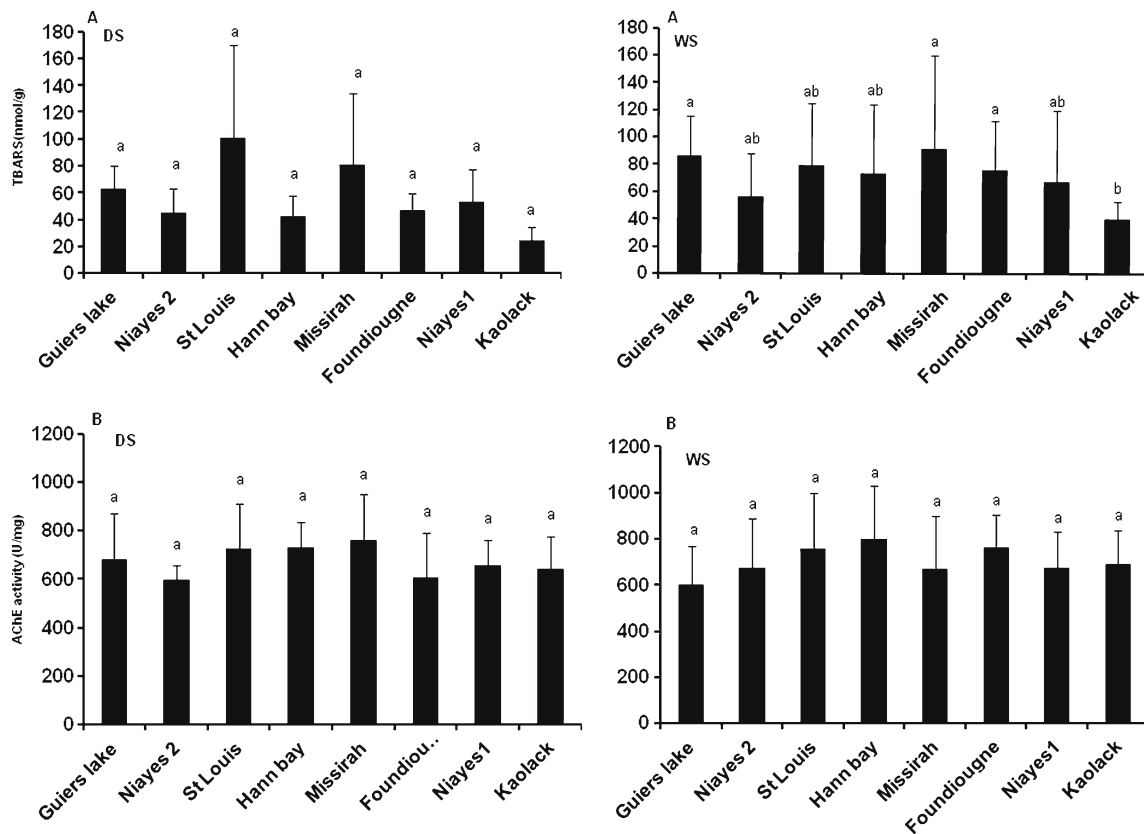
variability. No correlation was found between CF, TBARS, GST and GR and the presence of chemicals. Regarding the different sites, Hann Bay and Kaolack were outside a group of locations and characterized respectively by the presence of diverse pollutants and salinity.

**Discussion**

In West Africa, the rapid urbanization, growing industrialization and hazardous use of chemical products (e.g. pesticides) constitute the major environmental pressures. Only few studies have reported the “health” status of African rivers and estuaries, whilst they witness a strong demographic development and receive and increasing volume of waste, particularly sewage without significant treatment (Troussellier et al. 2004). This study assessed the physicochemical status of Senegalese water bodies, and the health status of wild black-chinned tilapia living in this environment was monitored using a set of biochemical and physiological biomarkers.

Environmental stressors in the Senegalese aquatic ecosystems

In the study area in Senegal, the chemical analysis of sediments indicated significant differences between sampling sites. The different levels found were probably the result of different anthropogenic sources. Similar values of PAHs were found in sediments from West African countries or in other parts of the world (Table 5). The PAH levels in Hann Bay and Foundiougne were higher than those from other Senegalese locations. Compounds such as PAHs can be introduced into the aquatic environment by an increase of urban and industrial effluents (Budzinski et al. 1997). In Hann Bay, the proximity of petroleum industries and the increasing urbanization and human activities are the major sources of PAHs. Moreover, the higher concentration of PAHs found in the sediment from Foundiougne was attributed to the presence of a ferry station and boat transportation in this city. Sanchez et al. (2010) reported high levels of PAHs in the sediment (up to 17,000 ng/g) from the Escrière River (France) characterized by urban pressure. The results of the present study thus showed a moderate level of PAH contamination in all sites, except Foundiougne and Hann



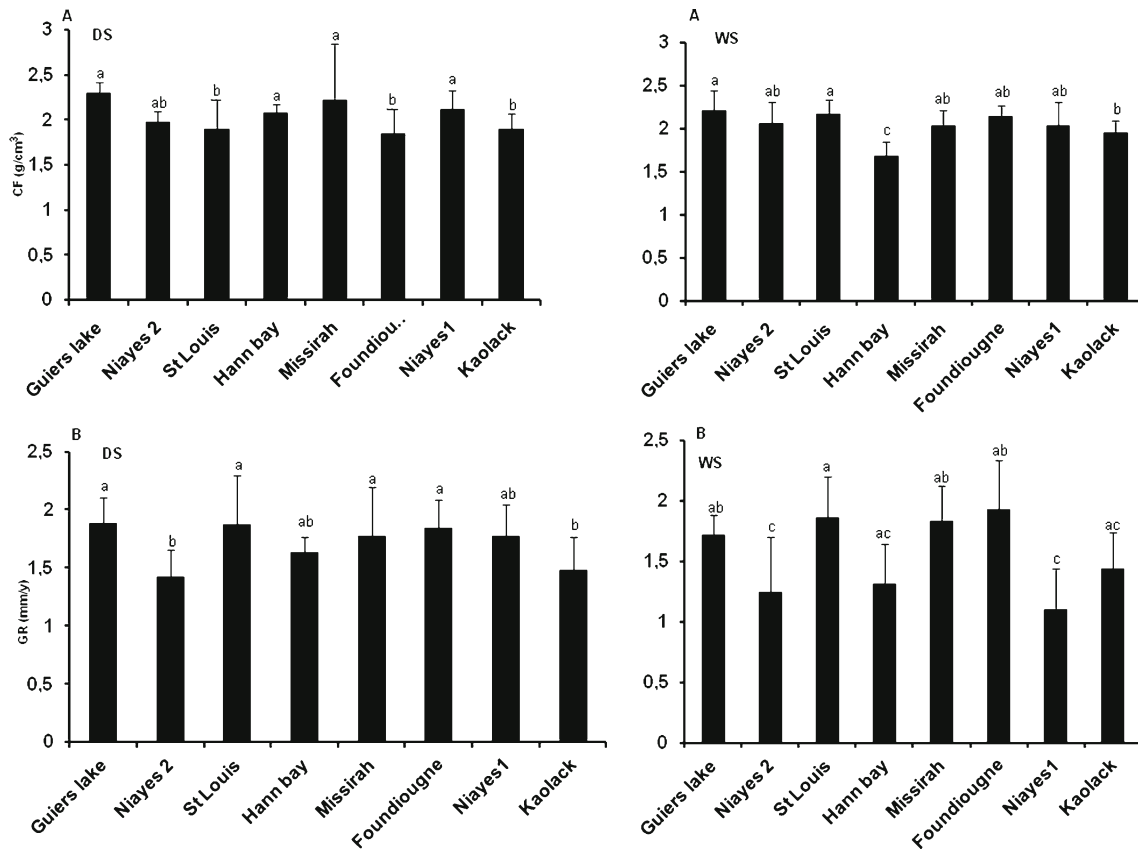
**Fig. 3** Lipid peroxidation in liver (A) and brain AChE activity (B) of *S. melanothron* from the different Senegalese locations during the dry and wet seasons. Results are presented as the mean+SD. Different

letters represent significant differences between locations (ANOVA, Tukey's test,  $p < 0.05$ ). DS dry season, WS wet season

Bay, compared to those reported in other countries (Table 5). PCBs and PBDEs were also present in sediments collected in this study, with higher levels in Hann Bay. The levels obtained in this study agreed with the levels found in a recent study of the sediment from Saloum in Senegal (Bodin et al. 2011). Moreover, sediments from our sites seemed to be less polluted by PCBs than the sediments from other sites (Table 5). Concerning OCP, high values were found in Niayes 2, which agreed with the presence of agricultural activities using pesticides. High levels of 4,4'-DDT also indicated the recent use of these pesticides in Niayes 2. The concentrations of OCPs in Niayes 2 were lower than those of Senegalese soil (Manirakiza et al. 2003). The concentrations of OCPs in other locations of this study were similar to those reported in other sampling sites in Senegal (Table 5). In conclusion, the most contaminated location among the chosen sites is Hann Bay in Dakar and, to a lesser extent, Foundiougne and Niayes 2.

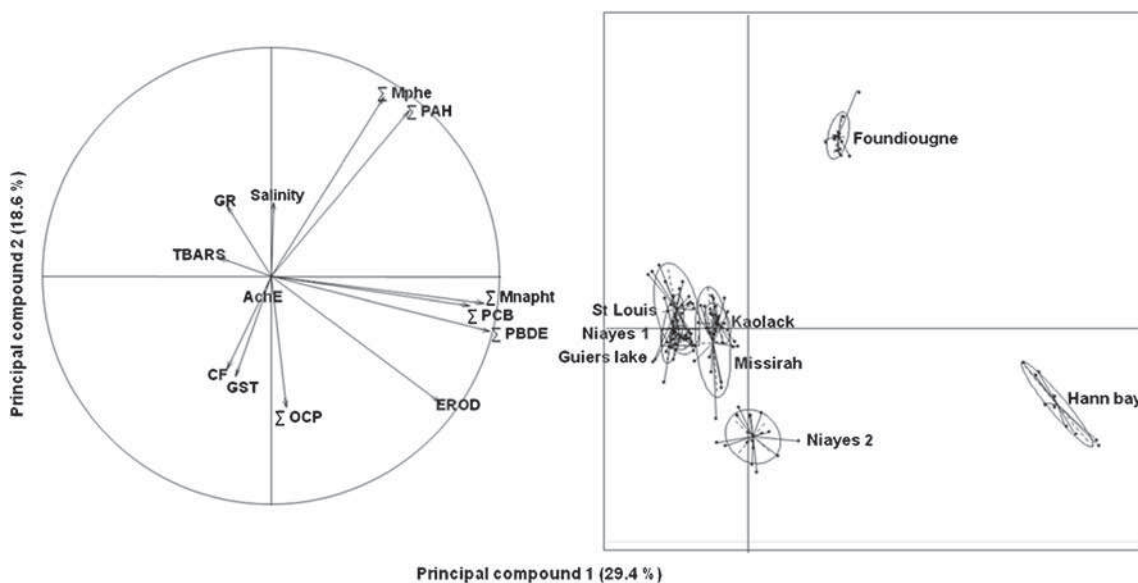
The climate in the study area is characterized by two seasons. PAHs, PCBs and OCPs were detected in both the dry and wet seasons, but the contaminant levels during the dry season were higher than those measured in the wet

season for the majority of sites. These differences were attributable to the high increase of the dilution by rainfall during the wet season, which caused the resuspension of pollutants stored in the sediment. The seasonal variations of the different contaminants observed in this study do not coincide with the results reported by Bodin et al. (2011) for the same area. Seasonal changes can also influence the fluctuation of temperature or salinity. The water temperature showed little variation at a spatial scale in the area and ranged from 29 to 31°C (Simier et al. 2004; Tine et al. 2007). This is the reason why it was not measured in the present study. In contrast, the salinity levels were highly different from one site and season to the other. An increase in water salinity was observed during the dry season, which was due to the intense evaporation and lack of precipitation. Changes in salinity may affect aquatic organisms as an independent stressor and may cause a variety of physiological responses (Lushchak 2011; Schlenk and Lavado 2011), but also by altering the bioavailability and increasing the chemical toxicity (Noyes et al. 2009). In conclusion, the salinity variability combined to different contaminants was the major abiotic stressor in our study area.



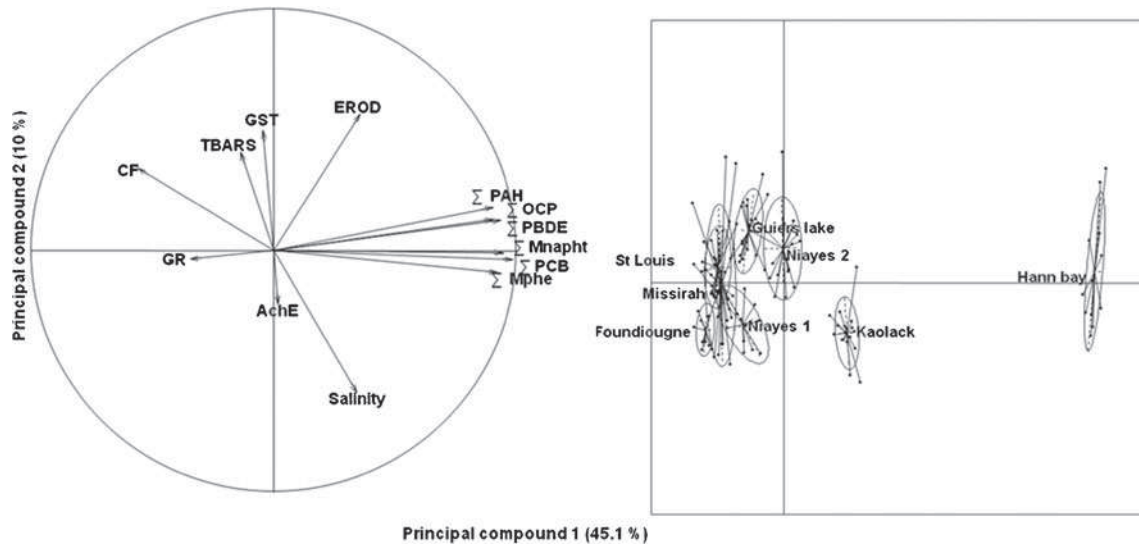
**Fig. 4** Life history traits of *S. melanotheron* from the different Senegalese locations during the dry and wet seasons (A, CF, condition factor and B, GR, growth rate). Results are presented as the mean+SD.

Different letters represent significant differences between locations (ANOVA, Tukey’s test,  $p < 0.05$ ). DS dry season, WS wet season



**Fig. 5** Multivariate analysis carried out for all data including all sampling locations, biological, biochemical and chemical parameters in *S. melanotheron* collected in the dry season





**Fig. 6** Multivariate analysis carried out all data including all sampling locations, biological, biochemical and chemical parameters in *S. melanotheron* collected in the wet season

#### Biochemical and physiological disturbances in the wild tilapia

As previously described, aquatic organisms—especially fish living in Senegalese environments—are exposed to a mixture of environmental stressors. This exposure is known to induce adverse effects in wild fish (Hinck et al. 2008; Boeuf and Payan 2001). Also, several authors argue for the assessment of fish health based on the measure of biomarkers in environmental monitoring programmes (Sanchez and Porcher 2009). For this purpose, we used the black-chinned tilapia as a sentinel fish species. Tilapias were described as promising model fish species in monitoring programmes and laboratory studies for evaluating their biochemical responses to pollutants (Gadagbui et al. 1996; Matos et al. 2007; Pathiratne and George 1998; Peixoto et al. 2006). The chosen sentinel

species, the black-chinned tilapia, is endemic to West Africa and distributed in all types of aquatic ecosystems (Paugy et al. 2003; Trewavas 1982), including highly polluted waters and hypersaline areas, as confirmed by our sampling results. Also, due to this favourable geographical distribution, the black-chinned tilapia seems to be a relevant sentinel fish species to assess fish health in Senegalese water bodies.

The need of a multi-biomarker approach for aquatic environment biomonitoring has been largely reported in several areas around the world (Hinck et al. 2008; Sanchez et al. 2008). In this context, EROD activity is one of the most used biomarkers that can provide data on fish exposure to organic pollutants (Whyte et al. 2000). This parameter was described as an inducible biomarker in wild tilapia (Gadagbui et al. 1996; Parente et al. 2004; Yang et al. 2008). The present study confirms these results, as reflected

**Table 5** PAH, PCB and OCP concentrations (nanograms per gram dry weight) in sediment from different parts in the world

Locations	Compounds	Levels		References
Arcachon Harbour (France)	$\Sigma 16(\text{PAH})$	4,500–5,000 ng/g d.w.	Sediment	Devier et al. (2005)
Gao-ping River (taiwan)	$\Sigma 16(\text{PAH})$	8–356 ng/g d.w.	Sediment	Doong and Lin (2004)
Coastal sediment (Togo)	$\Sigma 21(\text{PAH})$	<4–257 ng/g d.w.	Sediment	Gnandi et al. (2011)
Tropical estuarine systems of Mundaú-Manguaba (Brazil)	$\Sigma 16(\text{PAH})$	2.90–231.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d.w.	Sediment	Maioli et al. (2010)
Cotonou coastal zone (Benin)	$\Sigma 16(\text{PAH})$	25–1450 ng/g d.w.	Sediment	Soclo et al. (2000)
Saloum delta (Senegal)	$\Sigma 7(\text{PCB})$	8.2–14.9 ng/g d.w.	Sediment	Bodin et al. (2011)
Coastal area (Turkey)	$\Sigma 6(\text{PCB})$	17.9–539,746 ng/g d.w.	Sediment	Okay et al. (2009)
Bahia Blanca estuary (Argentina)	$\Sigma 18(\text{OCP})$	3.54–63.79 ng/g d.w.	Sediment	Arias et al. (2010)
Saloum delta (Senegal)	$\Sigma 14(\text{OCP})$	1.3–3.9 ng/g d.w.	Sediment	Bodin et al. (2011)
Daliao he River (China)	$\Sigma 14(\text{OCP})$	3.06–23.24 ng/g d.w.	Sediment	Wang et al. (2007)

d.w. dry weight

by the positive correlation observed between EROD activity and the chemicals measured in the PCA.

High EROD activities were measured in fish from Hann Bay and Niayes 2, two sites respectively contaminated by PAHs and OCPs. However, EROD activity showed high seasonal variability. This phenomenon could be explained by a decrease in PAH levels during the wet season combined with a short induction time of EROD (Wu et al. 2005). Moreover, tilapia from Missirah, Foundiougne and Kaolack showed low levels of EROD activity during the dry season compared to those collected in the wet season. During the dry season, the fish collected in these sites were mostly mature. This result agrees with the reproductive period of *S. melanotheron* in the Saloum reported by Panfili et al. (2004). A change in the tilapia reproductive status between sampling seasons could also support this EROD seasonal variability, in line with the ability of endogenous oestrogens to inhibit EROD activity (Kirby et al. 2007). A low EROD activity was also detected in tilapia from Foundiougne, but this site was contaminated by PAHs. This result could be explained by the presence of EROD inhibitors such as heavy metals, organophosphorous or oestrogens, masking EROD induction (Flammarion et al. 1996; Kirby et al. 2007). Significant differences were observed between the GST activity of fish from Foundiougne and Niayes 1. Regarding the chemical results, Foundiougne seems to be more impacted than Niayes 1. Several studies used GST activity as a biomarker for fish exposed to environmental contaminants including PAHs, PCBs, OCPs and PCDDs (van der Oost et al. 2003). However, no clear relationship was found between the presence of chemicals and the levels of GST activity in these two sites. These results showed that GST activities were less variable than EROD activities between sampling sites.

Conversely to the biotransformation enzymes, the response profiles of neurotoxicity and oxidative stress biomarkers, AChE and TBARS, respectively, are not informative due to a lack of inter-site difference, except in the fish from Kaolack during the wet season. However, these effect-based monitoring tools are recognized as promising indicators to address fish exposure to environmental pollutants (Sanchez and Porcher 2009), and several data report the responses of these parameters after laboratory exposures (Almeida et al. 2002; Rao 2006) or caging (Franco et al. 2010). Also, this lack of response could reflect a lack of neurotoxic and pro-oxidative conditions in the investigated sites. This hypothesis is supported by the decrease of AChE measured in the wild tilapia from Kaolack, a site characterized by high levels of organic pollutants.

Physiological parameters such as CF and GR can change when fish are exposed to environmental pressure. St. Louis, Foundiougne and Kaolack exhibited lower CF values compared to other sites, which could be interpreted as possibly caused by a pollutant impact, but no relationship was found

between the CF level and the chemicals measured. The CF variation may be caused by many factors including nutritional status, season, disease and pollution (van der Oost et al. 2003). Concerning the growth rates, fish from Niayes 2 and Kaolack exhibited low GR values. Decreases in growth have been previously reported in tilapia from extreme environmental conditions induced by hypersalinity (Panfili et al. 2004), which describes the status of these two locations. The lowest value of GR found in Kaolack agrees with previous studies in this site (Tine et al. 2007).

Chemical contaminants are major inductors of biomarker responses, but it is difficult to highlight in situ a clear relationship between contaminants and biomarker responses due to the complex mixture combinations of chemicals in the environment and the presence of biotic and abiotic factors. Salinity was not correlated to biomarker responses in tilapia in our study. Salinity variations in estuarine sites demand the activation of osmoregulatory mechanisms in fish. Several hormones, clearly involved in growth control, are also active in osmoregulatory processes and may play a determining role in both osmoregulation and growth (Boeuf and Payan 2001). It is known that the osmoregulation process is energy-consuming (Saoud et al. 2007) and that salinity strongly influences fish growth (Boeuf and Payan 2001). The presence of multiple stressors with complex mixtures of contaminants and salinity can affect physiological responses in fish in the short term. Long-term exposure could perturb the adaptive processes of species living in this environment. The complex interactions between climate change and pollutants may be particularly problematic for species living at the edge of their physiological tolerance range, where their acclimation capacity may be limited (Noyes et al. 2009).

## Conclusion

Regarding all the parameters measured in this study, the dry season appeared to be the most interesting for discriminating sites. The PCA mainly showed the relationship between EROD activity and the presence of PCBs and PAHs. The biomarker responses of the black-chinned tilapia seemed to be affected by changes in the environmental quality. These results highlighted the potential of this species for further monitoring in Senegal and are the foundation for further studies. Measurements of other chemical contaminants such as heavy metals could also be used. Nevertheless, the chosen sites in this study were moderately contaminated compared to other parts of the world. Further studies should be made to evaluate the biomarker responses in uncontaminated sites to characterize the base levels of the biomarker responses together with experiments in controlled environments. This set of biomarkers may be completed to address

a large set of effects, including, for example, the oestrogenicity of pollutants or osmoregulation disturbances.

**Acknowledgments** This research was supported by the IRD DPF (Direction des Programmes de Recherche et de la Formation au Sud) and the ECLIPSE Project (Ec2Co INSU, France). WS and OP were also funded by the French Ministry for Environment and Sustainable Development (PRG 190 Ecotoxicology). We wish to thank Khady Diop (IRD Dakar), Waly Ndiaye (PhD student, UCAD), and the fishermen for their technical help and assistance during sampling. L. Peluhet (EPOC/LPTC) is thanked for technical assistance.

## References

- Almeida JA, Diniz YS, Marques SFG, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli ELB (2002) The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ Int* 27:673–679
- Arias A, Pereyra M, Marcovecchio J (2010) Multi-year monitoring of estuarine sediments as ultimate sink for DDT, HCH, and other organochlorinated pesticides in Argentina. *Environ Monit Assess* 172:17–32
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Dizer H, Hansen PD (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Mar Environ Res* 47:17–47
- Berger C, Ba N, Gugger M, Bouvy M, Rusconi F, Coute A, Troussellier M, Bernard C (2006) Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in lake guiers (Senegal, West Africa). *FEMS Microbiol Ecol* 57:355–366
- Bodin N, N'Gom Ka R, Le Loc'h F, Raffray J, Budzinski H, Peluhet L, Tito de Morais L (2011) Are exploited mangrove molluscs exposed to persistent organic pollutant contamination in Senegal, West Africa? *Chemosphere* 84:318–327
- Boeuf G, Payan P (2001) How should salinity influence fish growth? *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 130:411–423
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Piérard C, Garrigues P (1997) Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58:85–97
- Budzinski H, Letellier M, Thompson S, LeMenach K, Garrigues P (2000) Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J Anal Chem* 367:165–171
- Carere M, Miniero R, Cicero MR (2011) Potential effects of climate change on the chemical quality of aquatic biota. *TrAC Trends Anal Chem* 30:1214–1221
- Debenay JP, Pages J, Guillou JJ (1994) Transformation of a subtropical river into a hyperhaline estuary: the Casamance River (Senegal)—paleogeographical implications. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 107:103–119
- Devier M-H, Augagneur S, Budzinski H, Le Menach K, Mora P, Narbonne J-F, Garrigues P (2005) One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *J Environ Monit* 7:224–240
- Doong R-a, Lin Y-t (2004) Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. *Water Res* 38:1733–1744
- Ecoutin JM, Simier M, Albaret JJ, Laë R, Tito de Morais L (1989) Changes over a decade in fish assemblages exposed to both environmental and fishing constraints in the Sine Saloum estuary (Senegal). *Estuar Coast Shelf Sci* 87:284–292
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V jr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
- Faunce CH (2000) Reproduction of blackchin tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, within an impounded mangrove ecosystem in east-central Florida. *Environ Biol Fishes* 57:353–361
- Flammarion P, Migeon B, Garric J (1996) Joint effects of copper sulphate and methidathion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EROD and AChE activities. *Bull Environ Contam Toxicol* 56:440–445
- Flammarion P, Migeon B, Garric J (1998) Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-*O*-deethylase data in a large French watershed. *Ecotoxicol Environ Saf* 40:144–153
- Franco JL, Trevisan R, Posser T, Trivella DBB, Hoppe R, Martins Rosa J, Fernandes Dinslaken D, Decker H, Inês Tasca C, Bainy Leal R, Freire Marques MR, Dias Bainy AC, Luiz Dafre A (2010) Biochemical alterations in caged Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:864–872
- Gadagbui BK-M, Addy M, Goksøyr A (1996) Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudfish (*Clarias anguillaris*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 114:201–211
- Gnandi K, Musa Bandowe BA, Deheyn DD, Porrachia M, Kersten M, Wilcke W (2011) Polycyclic aromatic hydrocarbons and trace metal contamination of coastal sediment and biota from Togo. *J Environ Monit* 13:2033–2041
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Harrison TD, Whitfield AK (2006) Temperature and salinity as primary determinants influencing the biogeography of fishes in South African estuaries. *Estuar Coast Shelf Sci* 66:335–345
- Hinck JE, Schmitt CJ, Ethersieck MR, Tillitt DE (2008) Relations between and among contaminant concentrations and biomarkers in black bass (*Micropterus* spp.) and common carp (*Cyprinus carpio*) from large US rivers, 1995–2004. *J Environ Monit* 10:1499–1518
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW (2007) Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc Natl Acad Sci* 104:8897–8901
- Kirby MF, Smith AJ, Rooke J, Neall P, Scott AP, Katsiadaki I (2007) Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): system interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquat Toxicol* 81:233–244
- Kone T, Teugels GG (1999) Reproduction of an estuarine tilapia (*Sarotherodon melanotheron* Ruppell, 1852) landlocked in a West-African man-made lake. *Aquat Living Resour* 12:289–293
- Legendre M, Ecoutin J-M (1989) Suitability of brackish water tilapia species from the Ivory Coast for lagoon aquaculture. I—Reproduction. *Aquat Living Resour* 2:71–79
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101:13–30
- Maioli OvLG, Rodrigues KC, Knoppers BA, Azevedo DbA (2010) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from two Brazilian estuarine systems. *J Brazil Chem Soc* 21:1543–1551
- Manirakiza P, Akinbamijo O, Covaci A, Pitonzo R, Schepens P (2003) Assessment of organochlorine pesticide residues in West African

- city farms: Banjul and Dakar case study. *Arch Environ Contam Toxicol* 44:171–179
- Martinho F, Viegas I, Dolbeth M, Leitao R, Cabral HN, Pardal MA (2008) Assessing estuarine environmental quality using fish-based indices: performance evaluation under climatic instability. *Mar Pollut Bull* 56:1834–1843
- Matos P, Fontal'nhas-Fernandes A, Peixoto F, Carrola J, Rocha E (2007) Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pest Biochem Physiol* 89:73–80
- Ng CA, Gray KA (2011) Forecasting the effects of global change scenarios on bioaccumulation patterns in great lakes species. *Glob Chang Biol* 17:720–733
- Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Van Tiem LA, Walcott KC, Erwin KN, Levin ED (2009) The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environ Int* 35:971–986
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Okay OS, Karackl B, Basak S, Henkelmann B, Bernhöft S, Schramm KW (2009) PCB and PCDD/F in sediments and mussels of the Istanbul strait (Turkey). *Chemosphere* 76:159–166
- Pagès J, Citeau J (1990) Rainfall and salinity of a Sahelian estuary between 1927 and 1987. *J Hydrol* 113:325–341
- Panfili J, Mbow A, Durand JD, Diop K, Diouf K, Thior D, Ndiaye P, Lae R (2004) Influence of salinity on the life-history traits of the West African black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*): comparison between the Gambia and Saloum estuaries. *Aquat Living Resour* 17:65–74
- Panfili J, Thior D, Ecoutin JM, Ndiaye P, Albaret JJ (2006) Influence of salinity on the size at maturity for fish species reproducing in contrasting West African estuaries. *J Fish Biol* 69:95–113
- Parente TEM, De-Oliveira A, Silva IB, Araujo FG, Paumgarten FJR (2004) Induced alkoxyresorufin-*O*-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere* 54:1613–1618
- Pathiratne A, George SG (1998) Toxicity of malathion to Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. *Aquat Toxicol* 43:261–271
- Paugy O, Lévêque C, Teugels GG (2003) Poissons des eaux douces et saumâtres de l'Afrique de l'Ouest. Editions de l'IRD, Paris, France, 68. Faune et Flore tropicales, Paris
- Peixoto F, Alves-Fernandes D, Santos D, Fontainhas-Fernandes A (2006) Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pest Biochem Physiol* 85:91–96
- Rao JV (2006) Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 143:492–498
- Senegal National Report (2002) Report SN 2002: Senegal National Report Phase I: Integrated problem analysis, 1532-0456
- Sanchez W, Porcher J-M (2009) Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC Trends Anal Chem* 28:150–158
- Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, Ditché JM, Porcher JM (2008) Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environ Int* 34:490–498
- Sanchez W, Piccini B, Maillot-Marechal E, Porcher JM (2010) Comparison of two reference systems for biomarker data analysis in a freshwater biomonitoring context. *Environ Int* 36:377–382
- Saoud IP, Kreydiyyeh S, Chalfoun A, Fakh M (2007) Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPase activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 348:183–190
- Sardella BA, Cooper J, Gonzalez RJ, Brauner CJ (2004) The effect of temperature on juvenile Mozambique tilapia hybrids (*Oreochromis mossambicus* × *O. urolepis hornorum*) exposed to full-strength and hypersaline seawater. *Com Biochem Physiol Part A: Mol Integr Physiol* 137:621–629
- Schlenk D, Lavado R (2011) Impacts of climate change on hypersaline conditions of estuaries and xenobiotic toxicity. *Aquat Toxicol* 105:78–82
- Simier M, Blanc L, Aliaume C, Diouf PS, Albaret JJ (2004) Spatial and temporal structure of fish assemblages in an “inverse estuary”, the Sine Saloum system (Senegal). *Estuar Coast Shelf Sci* 59:69–86
- Soclo HH, Garrigues P, Ewald M (2000) Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Mar Pollut Bull* 40:387–396
- Tapie N, Budzinski H, Le Ménach K (2008) Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Anal Bioanal Chem* 391:2169–2177
- Tapie N, Menach KL, Pasquaud S, Elie P, Devier MH, Budzinski H (2011) PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83:175–185
- Thompson S, Budzinski H (2000) Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *Int J Environ Anal Chem* 76:49–60
- Tine M, de Lorgeril J, Panfili J, Diop K, Bonhomme F, Durand JD (2007) Growth hormone arid prolactin-1 gene transcription in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* acclimatised to different salinities. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147:541–549
- Tine M, Bonhomme F, McKenzie D, Durand J-D (2010) Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimatised to a range of environmental salinities. *BMC Ecol* 10:11
- Trewavas E (1982) Genetic groupings of Tilapiini used in aquaculture. *Aquaculture* 27:79–81
- Troussellier M, Got P, Bouvy M, Mboup M, Arfi R, Lebihan F, Monfort P, Corbin D, Bernard C (2004) Water quality and health status of the Senegal River estuary. *Mar Pollut Bull* 48:852–862
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149
- Wang H, He M, Lin C, Quan X, Guo W, Yang Z (2007) Monitoring and assessment of persistent organochlorine residues in sediments from the Daliaohe River watershed, Northeast of China. *Environ Monit Assess* 133:231–242
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE (2000) Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30:347–570
- Wu RSS, Siu WHL, Shin PKS (2005) Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Mar Pollut Bull* 51:623–634
- Yang FX, Wilcox B, Jin SW, Aguirre AA, Rougee L, Xu Y, Lu YA (2008) Detection and quantitative analysis of polychlorinated biphenyls in tilapia from Hawaiian waters. *Chemosphere* 73:133–137

**Chapitre 4 : Evaluation des effets des composés perturbateurs endocriniens œstrogéniques sur le tilapia *Sarotherodon melanotheron***



## **Chapitre 4 : Evaluation des effets des composés perturbateurs endocriniens œstrogéniques sur le tilapia *Sarotherodon melanotheron***

### **Synthèse du manuscrit 2**

Cette partie du travail avait pour objectif d'évaluer le statut des écosystèmes aquatiques au Sénégal face à la présence de composés perturbateurs endocriniens œstrogéniques et de mesurer leurs effets chez *S. melanotheron*.

Les milieux aquatiques sont le réceptacle d'une grande partie de composés chimiques, et les organismes qui y vivent sont continuellement exposés à ces contaminants (Lavado et al., 2004). Les œstrogènes stéroïdiens peuvent avoir des effets néfastes sur les fonctions reproductrices, bien que de nombreux PE aient une faible capacité à entraîner une perturbation de ces fonctions (Nash et al., 2004). La VTG est une phospholipoprotéine produite dans le foie des poissons et précurseur des vitellines. Dans les conditions normales, cette protéine est absente ou très peu présente chez les individus mâles. Cependant chez les mâles la VTG peut être induite par l'exposition à des PE en laboratoire (Thompson et al., 2000) et *in situ* (Okoumassoun et al., 2002). L'induction de la VTG est donc utilisée comme biomarqueur d'exposition à des PE (Hinfray et al., 2010).

Dans la présente étude, l'analyse histologique des gonades a été réalisée pour déterminer le stade de développement et les altérations potentielles. Pour évaluer l'impact des PE chez le tilapia la VTG plasmatique a été mesurée chez des individus collectés *in situ*.

L'injection de l'E2 a induit une production de VTG chez le tilapia et a montré que cette espèce est capable de répondre à une exposition à des PE en laboratoire. La quantité d'E2 injectée a été similaire à celle utilisée par Davis et al. (2009). Cependant l'induction de la VTG à elle seule ne suffit pas pour évaluer les impacts des perturbateurs endocriniens dans les études *in situ*. D'autres études qui prennent en compte plusieurs fonctions biologiques sont nécessaires pour mieux prendre en compte la diversité des PE.

Les résultats obtenus montrent une induction de la VTG avec des valeurs inférieures à 3 µg/L chez les mâles. L'absence d'intersexe au niveau des gonades est associée à ces valeurs faibles de VTG chez les mâles.





**Manuscrit 2. Circulating vitellogenin and intersex of wild black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) from Senegalese aquatic ecosystems, en préparation**

# **Circulating vitellogenin and intersex of wild black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) from Senegalese aquatic ecosystems**

(Article en préparation)

Awa Ndiaye<sup>1</sup>, Olivier Palluel<sup>2</sup>, Jean-Dominique Durand<sup>1</sup>, François Brion<sup>2</sup>, Jean-Marc Porcher<sup>2</sup>,  
Jacques Panfili<sup>3</sup>, Wilfried Sanchez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> IRD, UMR 5119 ECOSYM, Université Montpellier 2, cc093, place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier  
Cedex5, France

<sup>2</sup> Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité d'Ecotoxicologie in vitro et in  
vivo, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>3</sup> IRD, UMR 5119 ECOSYM, LABEP-AO, B.P. 1386, 18524 Dakar, Senegal

\* Corresponding author. Tel : +33 (0)3 44 61 81 21 ; Fax: +33 (0)3 44 55 67 67  
E-mail address : Wilfried.Sanchez@ineris.fr (W. Sanchez)

## **Abstract**

Contamination of aquatic ecosystems by endocrine disrupting chemicals is a world-wide problem for wildlife. Also, the present work aimed to assess estrogenic effect of environmental contamination in several Senegalese water bodies characterized by various environmental pressures. For this purpose, a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was developed and validated to measure vitellogenin (VTG) in plasma of the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*), a cosmopolitan fish in all West African coastal aquatic ecosystems. This assay was used to quantify t-VTG in wild fish. Measured concentrations in male tilapia were below to 1 $\mu$ g/mL. Associated to the lack of intersex phenomenon in collected fish, the result of this study indicated that investigated are weakly affected by estrogenic contamination and further studies are needed to extend this conclusion in other Senegalese water bodies.

**Keywords:** vitellogenin, black-chinned tilapia, Enzyme-linked immunosorbent assay, intersex

## 1. Introduction

Contamination of aquatic ecosystems by endocrine disrupting chemicals (EDCs) occurred in many countries around the world. It results of urban, agricultural and industrial activities due to the wide use of chemical compounds. There is no doubt that EDCs present in aquatic ecosystems are involved in health disturbance of wildlife (Colborn et al., 1993). Many investigations reported feminization of male aquatic organisms such as fish (Gimeno et al., 1996) but other effect including decrease of fertility (Wit et al., 2007) or masculinisation of female (Parks et al., 2001) were also observed in wild fish. These individual effects can induced disturbances of wild fish populations as described by Kidd et al. (2007) that reported a collapse of fathead minnow population in experimental lake contaminated by ethynylestradiol or by Sanchez et al. (2011) that observed a decrease of fish density downstream from a pharmaceutical manufacture discharge.

The contamination of West African aquatic ecosystems by EDCs and associated effects for wild fish species has been only marginally investigated (Okoumassoun et al., 2002). However, in many developing countries, agriculture is a major economic activity (Rajendran & Subramanian, 1999) and pesticides used to pest control represent an important source of EDCs in environment. The present study aims to increase knowledge on effects of EDCs driven effects in a wild fish species from Senegalese aquatic ecosystems. For this purpose, two recognized biomarkers were measured in the black-chinned tilapia, *Sarotherodon melanotheron*: circulating vitellogenin concentration (VTG) and gonad histopathology.

VTG is a glycolipophosphoprotein normally present only in females, as it acts as a precursor for egg yolk. Following stimulation by estrogens and their mimics, VTG is readily induced. Also, VTG induction in male and immature fish appears as a sensitive biomarker of estrogen exposure (Sumpter & Jobling, 1995). VTG measurements were completed by histological analysis of gonads. Indeed, histology offers a powerful tool for sex verification, identifying stage of development, documenting presence of intersex and other abnormalities. Moreover, histological analysis of reproductive tissues can provide predictive information related to the fitness of organisms and their reproduction potential. Combination between

biochemical and histological measurements can provide insights into the effects of water body contamination by EDCs on fish health and especially reproductive health (Blazer, 2002).

The black-chinned tilapia is used as sentinel fish species. This euryhaline fish species is widely encountered in freshwater, marine and hypersaline water bodies (Panfili et al., 2006) and it is highly tolerant to temperature, dissolved oxygen concentration variations (Ecoutin et al., 1989; Legendre & Ecoutin, 1989; Kone & Teugels, 1999; Faunce, 2000) but also to contamination (Ndiaye et al., 2012). Moreover, a recent study performed in Senegalese aquatic ecosystems highlighted the potential of the black-chinned tilapia to address adverse effects of environmental stressors using a set of complementary biomarkers (Ndiaye et al., 2012).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Laboratory exposure to estradiol (E2)**

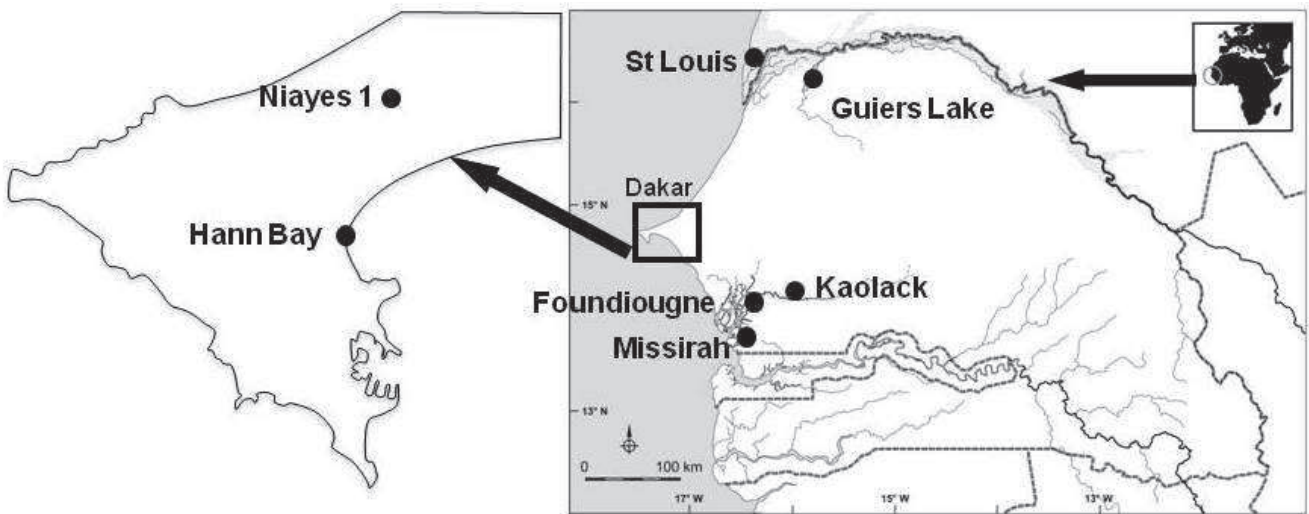
Prior to VTG purification, X wild black-chinned tilapia were collected using xxx in the Hann bay (Dakar, Senegal). Thirty-two fish were transferred to laboratory (ISRA-IRD/Dakar) and maintained 7 days prior exposure in uncontaminated water (salinity: 20<sup>0</sup>/00, temperature: between 28 to 30°C, light/dark cycle: 14h/10h). After 1 week fish were divided in two groups with each group in 225-L tanks. Fish were fed daily with commercial solid residues of groundnuts. Eighteen black-chinned tilapia received a single intraperitoneal injection of 5 mg E2/kg body weight initially dissolved in ethanol and diluted in peanut oil. Twelve other tilapia represent control group and were treated by peanut oil received a single intraperitoneal injection of peanut oil. After 14 days of exposure in the same experimental conditions, blood of all fish was collected by heparinized seringue from the dorsal vein, centrifugated at 3000 g for 15 min and plasma was separated and immediately stored at -80°C. All fish were finally sacrificed and gender was determined by macroscopic observation of gonads.

### **2.2. Wild fish collection and tissue sampling**

*Sarotherodon melanotheron* were sampled in 7 sites located in the northwest coastal of Africa (Fig. 1) during wet and dry season (May and October 2009 respectively) as previously

described (Ndiaye et al., 2012). Briefly, Lake Guiers is a low contaminated site used as freshwater reservoir to supply drinking water (Berger et al., 2006). The Hann Bay and the Saloum estuary are heavily contaminated sites due to urban activities, chemicals industries, fisheries and agriculture. The Niayes area and Senegal river are submitted to an agricultural pressure.

Immediately after sampling, each fish was measured (fork length, FL in mm), weighed (weight, W in g), sexed and dissected (Table 1). Sexual maturity was determined macroscopically using a modified standard scale of maturity stage (Legendre & Ecoutin, 1989). Blood was collected by heparinized seringue and plasma obtained after centrifugation was stored in liquid nitrogen prior VTG measurement. Gonads were removed, fixed in Bouin's solution for 48 hours and stored in ethanol.



*Fig. 1: Sampling sites*

**Table 1: Fish number, fish length, fish weight and condition factor for black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) collected in different sites during dry and wet season. Values are reported as mean  $\pm$  standard deviation. Different letters indicate statistically significant difference between sites ( $p < 0.05$ ).**

	Season	Guiers Lake	St Louis	Hann Bay	Missirah	Foundiougne	Niayes 1	Kaolack
<b>Fish number (M/F)</b>	<b>dry</b>	15 (11/4)	17 (14/3)	6 (3/3)	9 (7/2)	10 (8/2)	10 (8/2)	5 (3/2)
	<b>wet</b>	20 (10/10)	18 (13/5)	19 (12/7)	20 (14/6)	14 (9/5)	19 (11/8)	16 (7/9)
<b>Fish length (mm)</b>	<b>dry</b>	178.1 $\pm$ 10.5 <sup>a</sup>	170.9 $\pm$ 25.2 <sup>ab</sup>	138.3 $\pm$ 11.7 <sup>bc</sup>	151.0 $\pm$ 19.1 <sup>abc</sup>	140.4 $\pm$ 18.2 <sup>bc</sup>	136.8 $\pm$ 14.7 <sup>bc</sup>	131 $\pm$ 9.00 <sup>c</sup>
	<b>wet</b>	158.0 $\pm$ 18.4 <sup>a</sup>	158.7 $\pm$ 29.9 <sup>a</sup>	112.9 $\pm$ 13.7 <sup>b</sup>	141.5 $\pm$ 16.8 <sup>ab</sup>	135.8 $\pm$ 21.5 <sup>ab</sup>	130.0 $\pm$ 16.6 <sup>ab</sup>	132.0 $\pm$ 13.2 <sup>ab</sup>
<b>Fish weight (g)</b>	<b>dry</b>	130.3 $\pm$ 24.0 <sup>a</sup>	97.4 $\pm$ 41.6 <sup>ab</sup>	55.0 $\pm$ 14.6 <sup>bc</sup>	73.8 $\pm$ 25.4 <sup>bc</sup>	44.8 $\pm$ 6.38 <sup>c</sup>	57.1 $\pm$ 25.2 <sup>bc</sup>	42.9 $\pm$ 8.6 <sup>c</sup>
	<b>wet</b>	85.1 $\pm$ 20.3 <sup>a</sup>	91.7 $\pm$ 50.6 <sup>a</sup>	25.0 $\pm$ 10.7 <sup>b</sup>	57.8 $\pm$ 17.4 <sup>a</sup>	55.1 $\pm$ 26.4 <sup>b</sup>	44.5 $\pm$ 17.3 <sup>a</sup>	44.8 $\pm$ 13.6 <sup>b</sup>
<b>Condition factor</b>	<b>dry</b>	2.28 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.87 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	2.04 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	2.07 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.69 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	2.15 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	1.88 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
	<b>wet</b>	2.13 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	2.11 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	166 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	2.05 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	2.10 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.91 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	1.86 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>



### 2.3. *S. melanotheron*-VTG assay

A homologous competitive ELISA assay was specifically developed to quantify VTG in plasma of black-chinned tilapia (t-VTG). VTG was purified from E2-induced fish using anion exchanges following gel filtration chromatography according to Brion et al. (2000). Determination of molecular weight of purified t-VTG was performed by gel filtration. Standard marker proteins kit with catalase (232kDa), ferretin (440 kDa) and thyroglobulin (669 kDa) was used. Molecular weight standard and VTG were run and their elution volumes were determined. Eluted volume was used to calculate estimated distribution coefficient ( $K_{av}$ ) of each protein according to Brion et al. (2000). The logarithm of the marker protein weights and their  $K_{av}$  were plotted. Molecular weight of t-VTG was estimated with equation of linear regression obtained.

Polyclonal anti-t-VTG antibodies were raised in two female New Zealand white rabbits after 53 days of immunization (Covalab, France). Reactivity of rabbit serum with tVTG was evaluated by direct ELISA with serial dilution of t-VTG in coating buffer and rabbit serum diluted in PBS/1%BSA and an homologous t-VTG competitive ELISA assay was developed and validated according to Brion et al. (2002).

Briefly, Nunc Maxisorp microtiter plates (Nunc Roskilde, Denmark) were coated with 150  $\mu$ L of t-Vtg at 35  $\mu$ g/ml in 0.05 M carbonate-bicarbonate (pH 9.6). Standard of Vtg was serially third-diluted between 0 and 3000 ng/mL. Standards and plasma samples were preincubated with the primary antibody (final dilution of 1:30,000 in PBS, 1% BSA). Pre-coated ELISA microplates were incubated with preincubated primary antibody solution with standards or samples (100  $\mu$ l) and then with secondary antibody (horseradish peroxidase goat anti-rabbit IgG diluted 1:2000 in PBS, 1% BSA). The peroxidase activity was revealed by adding 100  $\mu$ l of tetramethylbenzidine enzyme substrate (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) and was stopped by addition of 50  $\mu$ l of 1 M phosphoric acid ( $H_3PO_4$ ). The absorbance was read at 450 nm. Calculation was performed as described by Brion et al. (2002).

#### **2.4. Gonad histology**

After fixation of gonads in Bouin's solution, three pieces of the gonad were dehydrated through a series of graded ethanol, cleared with toluene and embedded in paraffin. Sections were 7  $\mu\text{m}$  thick, stained with haematoxylin-eosin, and observed under optical microscope to determine fish gender and occurrence of intersex.

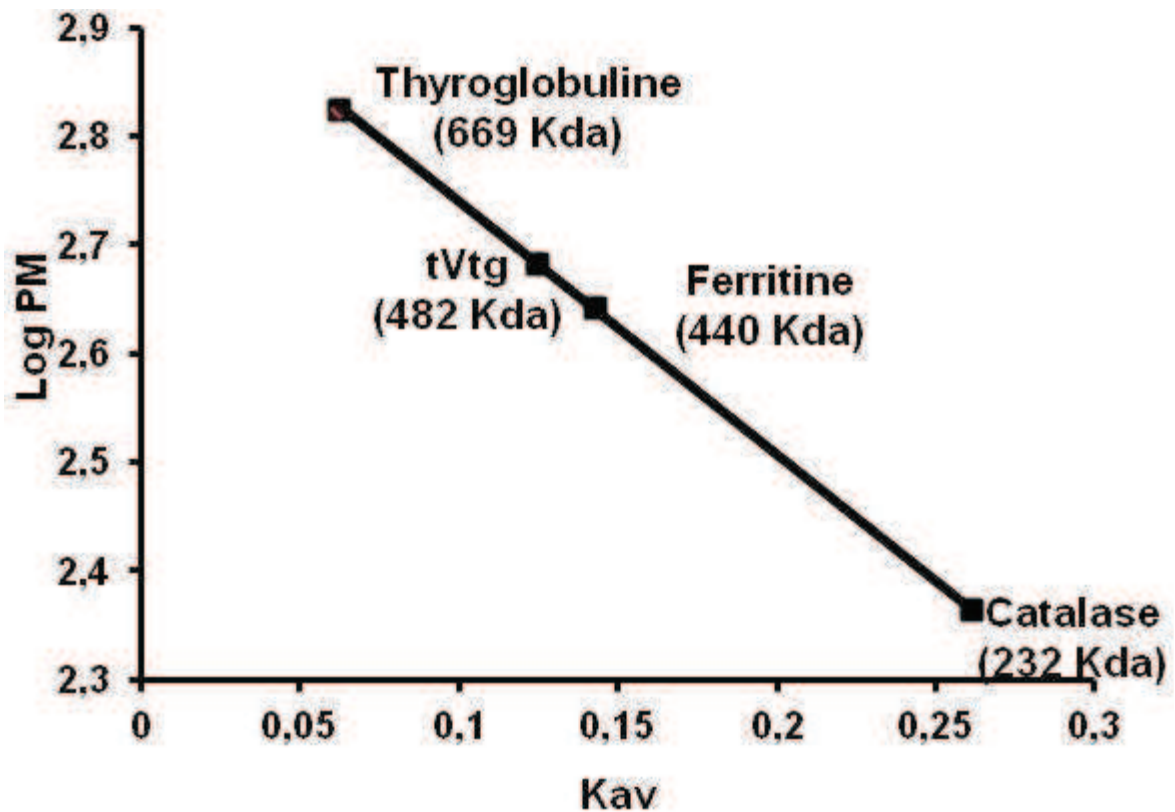
#### **2.5. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using xxx software. VTG concentration was presented as individual data. Differences between investigated sites were performed using Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ).

### **3. Results**

#### **3.1. Validation of t-VTG ELISA**

In the present work, t-VTG with a molecular weight of 482 kDa (Fig. 2) was purified and a specific ELISA was developed to quantify VTG concentration in the plasma of black-chinned tilapia. Validation of this assay was based on calculation of intra and inter-assay coefficients of variability and on the determination of detection limit. Results are presented in Table 1. The working range of the assay was ranged from 4.1 to 70.7ng/mL. Inter-assay coefficients of variation obtained at 80, 50 and 20% of binding were 44.6, 22.5 and 6.1% respectively. Similarly, intra-assay coefficients of variation of the standard were respectively 29.1, 13.8 and 8.6 %. (Table 2). The detection limit that represents 90% of antibody binding was 1.8ng/mL.



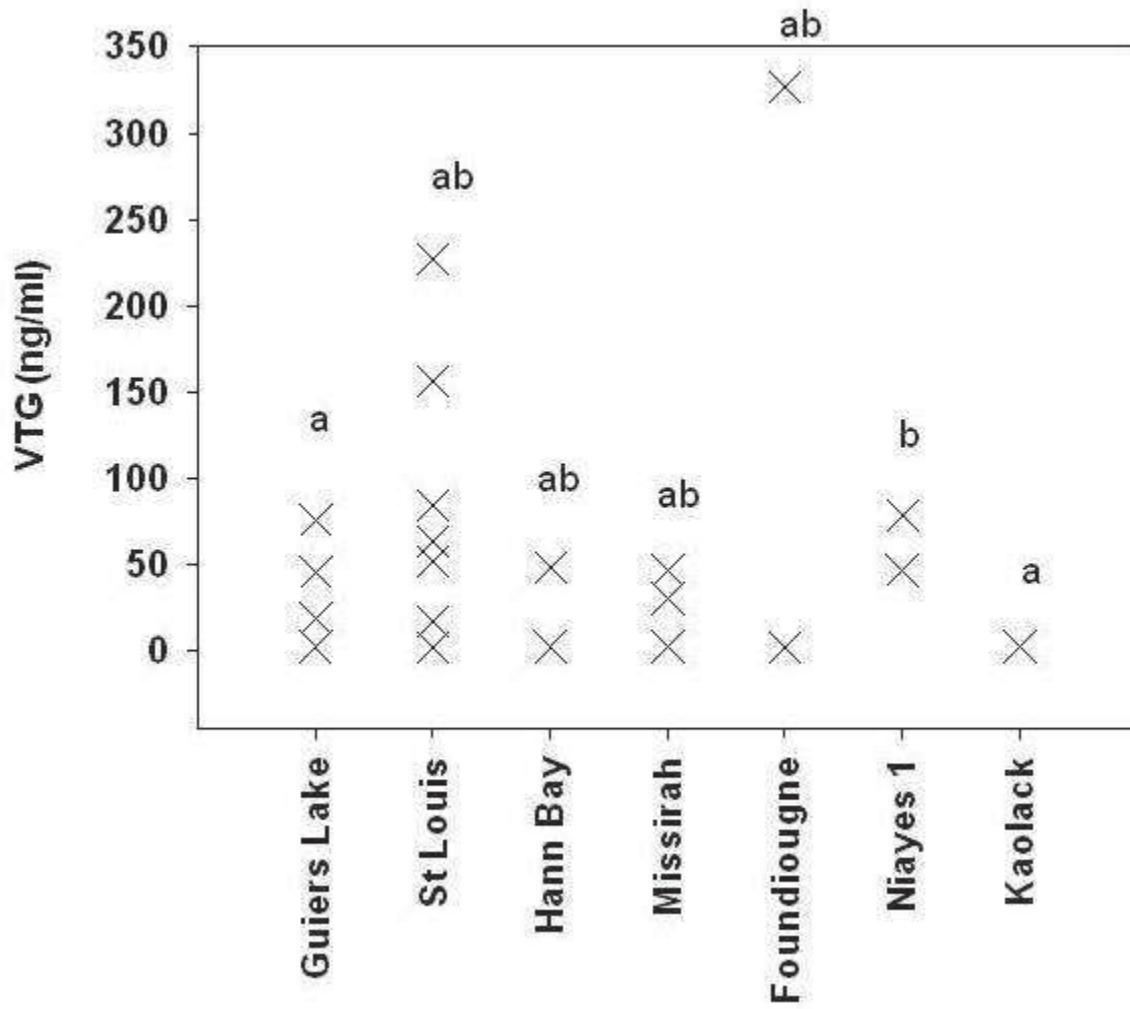
*Fig. 2: Molecular weight markers Thyroglobuline (669 Kda), ferritine (440 Kda), catalase (232 Kda) used for calibration with gel filtration column Superdex 200. Elution buffer: (carbonate-bicarbonate), pH 9.5 at a flow rate of 0.7 ml/min. Void volume determined by blue dextran, was used for calculate Kav of each protein.*

**Table 2: Characteristics of the tilapia vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay**

	Binding			
	90%	80%	50%	20%
t-Vtg (ng/ml)	1.81	4.14	16.85	70.7
CV intra-assay (%)	37.39	29.07	13.80	8.55
CV inter-assay (%)	54.01	44.63	22.49	6.10

### **3.2. Circulating VTG in wild black-chinned tilapia**

Circulating VTG concentration was measured in male and female black-chinned tilapia collected during both dry and wet seasons. During dry season, t-VTG concentrations in male ranged from non-detected level to 330 ng/mL (Fig. 3). There were significant differences among locations. VTG concentration in male from Niayes 1 was significantly different from those found in Kaolack. For female fish; measured concentrations were between 6.5 and 232460 ng/mL. Significant differences were found in plasma VTG concentration between females from Foundiougne and from Niayes1 (Fig. 4). During wet season, t-VTG concentrations in male ranged from non-detected level to 2163 ng/mL (Fig. 5). In all locations during wet season, VTG levels were not statistically different in both males and females. Despite, significant differences found in Niayes 1 between dry and wet seasons, there were no significant differences in plasma VTG levels for males collected in other sites during wet season (Fig. 5).



*Fig. 3: Vitellogenin levels in male black-chinned tilapia sampled during dry season. Different letters indicate statistically significant difference between sites ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney).*

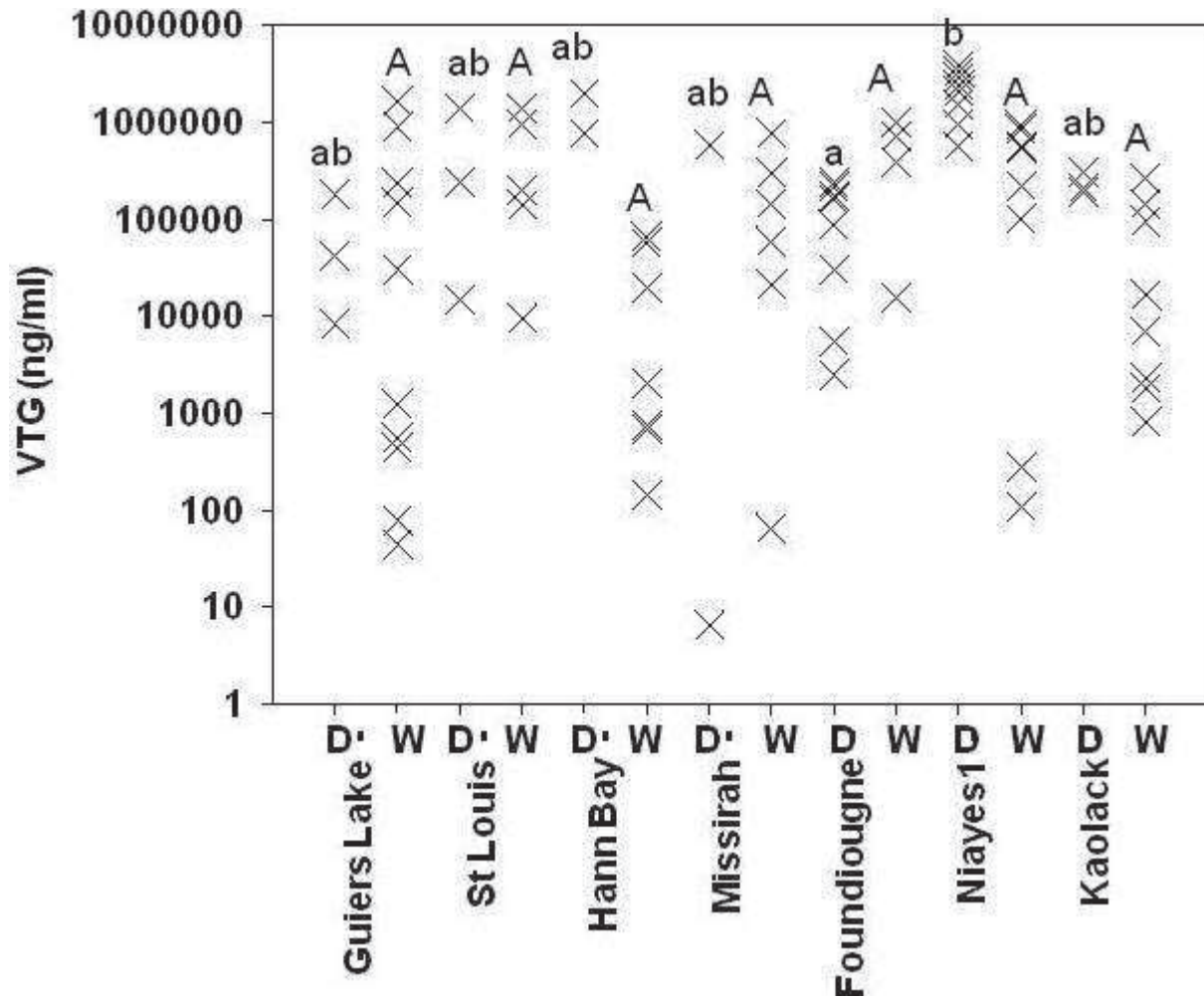
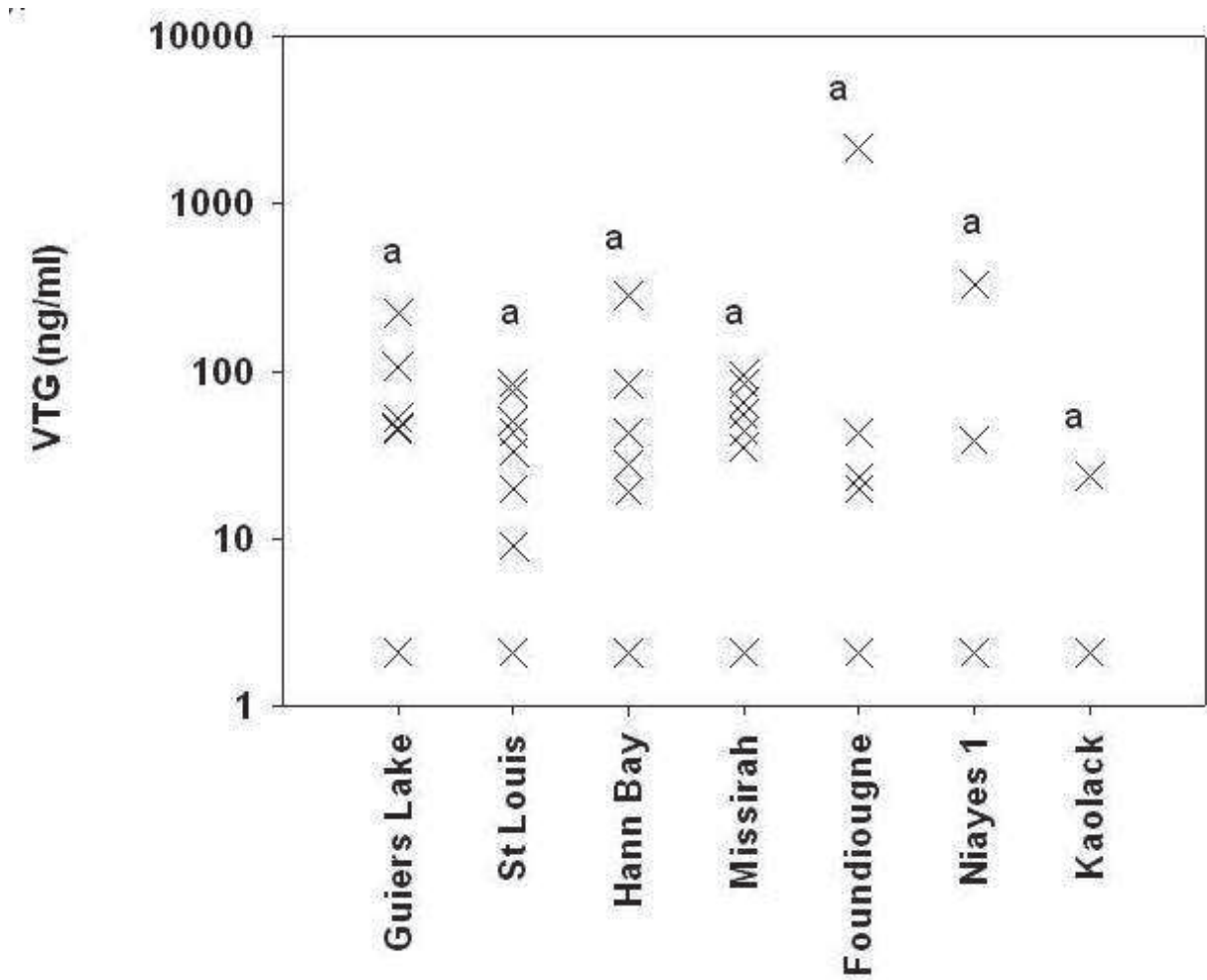


Fig 4: Vitellogenin levels in female black-chinned tilapia sampled during both dry and wet season. Different letters indicate statistically significant difference between sites for each season ( $p < 0.05$ ; Kruskal-wallis test followed by Mann-Whitney ).



*Fig. 5: Vitellogenin levels in male black-chinned tilapia sampled during wet season. Different letters indicate statistically significant difference between sites ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney).*

### **3.3. Gonad histopathology**

In the present work, gonads of wild black-chinned tilapia were analyzed to determine the occurrence of intersex phenomenon in Senegalese aquatic ecosystems. No intersex was observed in gonads of male and female fish.

## **4. Discussion**

The present study was designed to assess effects of EDCs and particularly estrogenic EDCs on wild black-chinned tilapia living in Senegalese water bodies characterized by various environmental pressures. The black-chinned tilapia was selected as sentinel fish species due to previous work reporting the interest of this model to assess the effects of environmental stressors using a set of biochemical and physiological biomarkers (Ndiaye et al., 2012). Moreover, the black-chinned tilapia is also described as a promising fish species to assess estrogenic effects in fish. Indeed, investigations performed in Ouémé river in Republic of Benin described VTG inductions in fish from four sites contaminated by organochlorine pesticides (Okoumassoun et al., 2002). Moreover, reproductive physiology of this mouthbrooding cichlid fish is extensively investigated (Trewavas, 1983; Kishida & Specker, 2000). Also, structure of t-VTG and natural induction profiles in female and in male fish are accurately described. In this work, t-VTG was purified and molecular weight was measured by gel filtration. We reported a molecular weight of 480 kDa. This value is closed to estimated molecular weight of *Oreochromis mossambicus* (370 and 220 kDa for VTG200 and VTG130 respectively) (Takemura & Kim, 2001). It is also very similar to molecular weight reported for other teleosts (Specker & Sullivan, 1993).

Using this purified t-VTG, polyclonal antibodies were synthesized and a specific assay was developed using a protocol previously described (Brion et al., 2002). The performance of the ELISA was validated through a single-laboratory validation based on international guidelines for validation of analytical methods (Eurachem, 1998; Thompson et al., 2002). Several parameters including linear range of the standard curve (i.e. calibration), intra- and inter-assay variation (i.e. precision and repeatability respectively), detection and quantification limits for standard and samples were assessed for the developed t-VTG ELISA. The performances for each end-point of validation procedure were well described (Goksøyr et



al., 2003). With intra- and inter-assay coefficients of variation below 30 % (except for 80% inter-assay CV) and a 17-fold working range between 4.14 and 70.7 ng/mL, the developed ELISA in the present study appears as a valuable method to detect t-VTG at 1.81 ng/mL.

The t-VTG ELISA developed in this study was used to assess estrogenic effects in wild black-chinned tilapia from Senegalese aquatic ecosystems. In male fish, measured concentrations were below to 3µg/mL. These values seems to be very low compared to VTG concentrations reported in black-chinned tilapia from upstream sites of the Ouémé river contaminated by organochlorine pesticides (Okoumassoun et al., 2002). However, it is consistent with an estrogenic environment. VTG concentrations between 100 and 1000 ng/mL were reported in wild roach sampled in UK polluted sites (Jobling et al., 1998). Also, VTG concentrations measured in wild male black-chinned tilapia can be supported by low environmental concentrations of pollutants such as organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs) measured in this area (Ndiaye et al., 2012). This result is also confirmed by low estrogenic activity measured in sediment extract (unpublished data). In female tilapia, measured concentrations were up to 10 µg/mL and lack of strong difference between sites was observed. This result is in accordance with numerous results obtained in female fish that reported high VTG concentrations due to normal cycle of VTG synthesis in females (Panter et al., 1998; Flammarion et al., 2000).

This weak estrogenic response observed with VTG induction was also consistent with the lack of intersex in collected fish even if it could suggest that the induction of VTG and the development of ovotestis are based on different underlying mechanisms that require different triggers and/or time scales (Faller et al., 2003). However, to our knowledge, no data reporting intersex in the black-chinned tilapia is available. Also, further laboratory studies are needed to address potential sex reversion in this fish species.

To summarize, the present work allowed developing a specific t-VTG ELISA to characterise estrogenic effects in wild black-chinned tilapia living in Senegalese aquatic ecosystems. VTG measurement indicated a low estrogenic contamination in investigated sites associated to a lack of intersex phenomenon. This work could be completed by investigation in other sites to address the occurrence of estrogenic effects in Senegalese aquatic ecosystems.

## **Acknowledgements**

This research was supported by IRD DPF (Direction des Programmes de Recherche et de la Formation au Sud) and ECLIPSE (Effets du changement Climatique et de la Pollution au Sénégal chez un poisson Estuarien, le tilapia *Sarotherodon melanotheron*) project. INERIS staff was also funded by the French Ministry for Environment and Sustainable Development (PRG 190 Ecotoxicology). We wish to thank Omar Baldé (IRD Dakar) for her technical help and assistance during laboratory exposure. We gratefully acknowledge the technical assistance of Khady Diop (IRD Dakar), Waly Ndiaye (PhD student, UCAD) and the fishermen.

## References

- Berger, C., Ba, N., Gugger, M., Bouvy, M., Rusconi, F., Coute, A., Troussellier, M., Bernard, C., 2006. Seasonal dynamics and toxicity of cylindrospermopsis raciborskii in lake guiers (Senegal, West Africa). *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 355-366.
- Blazer, V.S., 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 85-101.
- Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M., 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1699-1708.
- Brion, F., Rogerieux, F., Noury, P., Migeon, B., Flammarion, P., Thybaud, E., Porcher, J.-M., 2000. Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 737, 3-12.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. US Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC, Etats-Unis.
- Ecoutin, J.M., Simier, M., Albaret, J.J., Laë, R., Tito de Morais, L., 1989. Changes over a decade in fish assemblages exposed to both environmental and fishing constraints in the Sine Saloum estuary (Senegal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 87, 284-292.
- Eurachem, 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. <http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>.
- Faller, P., Kobler, B., Peter, A., Sumpter, J.P., Burkhardt-Holm, P., 2003. Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in Switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2063-2072.
- Faunce, C.H., 2000. Reproduction of blackchin tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, within an impounded mangrove ecosystem in east-central Florida. *Environ. Biol. Fishes* 57, 353-361.
- Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P., Thybaud, E., Palazzi, X., Tyler, C.R., 2000. Induction of Fish Vitellogenin and Alterations in Testicular Structure: Preliminary Results of Estrogenic Effects in Chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology* 9, 127-135.
- Jimeno, S., Gerritsen, A., Bowmer, T., Komen, J., 1996. Feminization of male carp. *Nature* 384, 221-222.
- Goksoyr, A., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Nilsen, B.M., 2003. On the Need for a Standardized Set-up for Validation Studies of Fish Vitellogenin Assays as an Endpoint in Endocrine Disruptor Testing and Screening - a Proposal. <http://www.biosense.com/Docs/GoksoyrEtal2003.pdf>.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science & Technology* 32, 2498-2506.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8897-8901.
- Kishida, M., Specker, J.L., 2000. Paternal Mouthbrooding in the Black-Chinned Tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Pisces: Cichlidae): Changes in Gonadal Steroids and Potential for Vitellogenin Transfer to Larvae. *Hormones and Behavior* 37, 40-48.
- Kone, T., Teugels, G.G., 1999. Reproduction of an estuarine tilapia (*Sarotherodon melanotheron* Ruppell, 1852) landlocked in a West-African man-made Lake. *Aquat. Living Resour.* 12, 289-293.
- Legendre, M., Ecoutin, J.-M., 1989. Suitability of brackish water tilapia species from the Ivory Coast for lagoon aquaculture. I-Reproduction. *Aquat. Living Resour.* 2, 71-79.
- Ndiaye, A., Sanchez, W., Durand, J.-D., Budzinski, H., Palluel, O., Diouf, K., Ndiaye, P., Panfili, J., 2012. Multiparametric approach for assessing environmental quality variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 4133-4147.

- Okoumassoun, L.-E., Brochu, C., Deblois, C., Akponan, S., Marion, M., Averill-Bates, D., Denizeau, F., 2002. Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Ouémé River in Republic of Benin. *The Science of The Total Environment* 299, 163-172.
- Panfili, J., Thior, D., Ecoutin, J.M., Ndiaye, P., Albaret, J.J., 2006. Influence of salinity on the size at maturity for fish species reproducing in contrasting West African estuaries. *J. Fish Biol.* 69, 95-113.
- Panter, G.H., Thompson, R.S., Sumpter, J.P., 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology* 42, 243-253.
- Parks, L.G., Lambright, C.S., Orlando, E.F., Guillette, L.J., Ankley, G.T., Gray, L.E., 2001. Masculinization of Female Mosquitofish in Kraft Mill Effluent-Contaminated Fenholloway River Water Is Associated with Androgen Receptor Agonist Activity. *Toxicological Sciences* 62, 257-267.
- Rajendran, R.B., Subramanian, A.N., 1999. Chlorinated pesticide residues in surface sediments from the river Kaveri, South India. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 34, 269-288.
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfrey, N., Porcher, J.-M., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International* 37, 1342-1348.
- Specker, J.L., Sullivan, C.V. (Eds.), 1993. Vitellogenesis in fishes status and perspectives. National Research council of Canada, Ottawa, Canada.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect.* 103.
- Takemura, A., Kim, B.H., 2001. Effects of estradiol-17 $\beta$  treatment on in vitro and in vivo synthesis of two distinct vitellogenins in tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 129, 641-651.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. IUPAC Technical Report. *Pure Applied Chem* 74, 835-855.
- Trewavas, E. (Ed.), 1983. Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum (Natural History), London.
- Wit, J., Verspecht, A., Hens, L., Nicolopoulou-Stamati, P., Howard, C.V., 2007. Assessment Of Fertility And Other Health Impacts For Selected Pollutants In Flanders: *Opportunities And Limitations* *Reproductive Health and the Environment* 22, 249-281.

## **Chapitre 5 : L'osmorégulation chez le tilapia face à un challenge de variation de la salinité et de la contamination chimique**



## **Chapitre 5 : L'osmorégulation chez le tilapia face à un challenge de variation de la salinité et de la contamination chimique**

### **Synthèse du manuscrit 3**

Cette partie du travail avait pour objectif de caractériser l'adaptation de *S. melanotheron* en condition contrôlée. Les poissons sont sensibles à l'exposition à des contaminants présents dans l'eau qui affectent les branchies en augmentant la perméabilité à l'eau et aux ions de leur épithélium et en inhibant l'activité au niveau des cellules à chlorures (Wendelaar Bonga & Lock, 1991). La NKA est ubiquiste et constamment située dans la partie basolatérale des membranes cellulaires et elle est considérée comme une enzyme capable de créer un gradient électrochimique permettant l'assimilation et l'excrétion active trans-épithéliale d'ions (Lorin-Nebel et al., 2012). Les CFTR sont localisées dans la membrane apicale et jouent un rôle important dans la sécrétion des ions avec une présence accrue avec l'augmentation de la salinité (Ouattara et al., 2009). La réorganisation de l'épithélium des branchies et la variation du nombre et de la taille de ces transporteurs ont été observées durant l'adaptation à la salinité (Marshall & Singer, 2002). La NKA est l'un des composants principaux du transport actif au niveau des branchies des poissons (Cf Chap. 2). La mesure de l'activité ATPase chez les poissons est un bon indicateur pour évaluer l'adaptation à la salinité mais également l'exposition à des polluants (Sancho et al., 2003).

Dans la présente étude, les expositions ont été réalisées avec une salinité allant de l'eau douce à l'eau hypersalée. Les poissons ont été séparés durant toute la durée de l'exposition en 3 groupes (eau douce, eau de mer et eau hypersalée). Les concentrations de DDT utilisées dans cette étude correspondaient à celles utilisées par Kwong et al. (2008). Deux transporteurs ioniques majeurs (NKA et CFTR) présents dans les ionocytes des branchies ont été étudiés. Leur localisation, leur nombre et leur taille ont été estimés par la localisation des ionocytes en immunofluorescence. L'activité  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase a aussi été mesurée. Parallèlement les concentrations de DDT dans plusieurs tissus (branchies, muscle et foie) ont été analysées.

Ces travaux ont montré une diminution de l'épaisseur de l'épithélium branchial au niveau des 3 groupes de poissons après exposition au DDT, avec une altération plus marquée en eau douce. Ces résultats ont donc suggéré que le DDT a un effet sur la structure de l'épithélium des branchies. Le canal CFTR a seulement été détecté dans la partie apicale des MRC des poissons en eau hypersalée et il était moins exprimé chez les poissons exposés au DDT. L'expression de la NKA était significativement plus élevée chez les tilapias en eau douce qu'en eau hyper salée.

L'induction de l'activité NKA a été observée chez le tilapia en comparant des individus provenant d'eau douce, d'eau de mer et d'eau hyper salée non exposés au DDT. L'exposition au DDT a entraîné une inhibition de l'activité NKA chez les individus en eau douce et en eau de mer. Cependant la baisse de l'activité NKA et l'abondance du CFTR chez le *S. melanotheron* en eau de mer et eau hypersalée exposé aux DDT peuvent perturber les capacités d'osmorégulation à long terme. Ces changements ont suggéré qu'une perturbation des capacités d'osmorégulation des tilapias exposés à différents stress peut à long terme avoir des répercussions au niveau des populations.



**Manuscrit 3. Impact of environmental DDT concentration on gill adaptation to increased salinity in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*, paru à 'Comparative Biochemistry and Physiology Part C'**





## Impact of environmental DDT concentrations on gill adaptation to increased salinity in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*

Virginie Riou<sup>a,\*</sup>, Awa Ndiaye<sup>b</sup>, Hélène Budzinski<sup>c</sup>, Rémi Dugué<sup>d</sup>, Karyn Le Ménach<sup>c</sup>, Yan Combes<sup>d</sup>, Maryline Bossus<sup>a</sup>, Jean-Dominique Durand<sup>e</sup>, Guy Charmantier<sup>a</sup>, Catherine Lorin-Nebel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université Montpellier 2, UMR5119-UM2-CNRS-IFREMER-IRD ECOSYM, Equipe Adaptation Ecophysiologique et Ontog nese, cc092, 34095 Montpellier Cedex 05, France

<sup>b</sup> Université Montpellier 2, UMR5119 ECOSYM, Equipe Diversité et Ecologie des Poissons, cc092, 34095 Montpellier Cedex 05, France

<sup>c</sup> Université Bordeaux 1, UMR5805-CNRS-UB1 EPOC, Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement, Building A12, 351 crs de la Libération, 33405 Talence, France

<sup>d</sup> IRD, UMR5554 Gamet, 361 rue JF Breton, BP 5095, 34196 Montpellier, France

<sup>e</sup> IRD, UMR 5119 ECOSYM, campus IRD/ISRA de Bel Air, BP 1386, CP18524 Dakar, Senegal

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 November 2011

Received in revised form 27 February 2012

Accepted 1 March 2012

Available online 9 March 2012

#### Keywords:

DDTs

Fish

Gill

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Osmoregulation

Teleost

### ABSTRACT

Estuaries of tropical developing countries suffering from severe droughts induced by climate change are habitats to fish, which face drastic salinity variations and the contact with pollutants. The Western Africa tilapia *Sarotherodon melanotheron* is highly resistant to hypersalinity, but the effect of human-released xenobiotics on its adaptation is barely known. Controlled experiments were conducted to observe *S. melanotheron* gill adaptation to abrupt salinity variations in the presence of waterborne DDT, at concentrations detected in their natural habitat. The gills appeared as an important site of DDT conversion to DDD and/or depuration. A 12-days DDT exposure resulted in decreased gill epithelium thickness at all salinities (from fresh- to hypersaline-water), and the structure of gills from freshwater fish was particularly altered, relative to controls. No unbalance in tilapia blood osmolality was observed following DDT exposure, which however caused a decrease in branchial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) activity. Gill cellular NKA expression was reduced in salt-water, together with the expression of the CFTR chloride channel in hypersaline water. Although *S. melanotheron* seems very resistant (especially in seawater) to short-term waterborne DDT contamination, the resulting alterations of the gill tissue, cells and enzymes might affect longer term respiration, toxicant depuration and/or osmoregulation in highly fluctuating salinities.

  2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Some Western Africa estuarine habitats have been seriously degraded for the last 30 years by climate changes causing severe droughts with reduction of freshwater flow, combined with the increase in domestic and industrial effluents (Bouvy et al., 2008). Reduction of stream flows has led to the inversion of salinity gradients in estuaries such as those of the Casamance and the Saloum rivers (Niang-Diop et al., 2002), where seawater penetrates and evaporates, reaching extremely high salinities upstream. Water salinity is the abiotic physicochemical factor that varies the most in the Saloum (e.g. Tine et al., 2007), increasing from the mouth (36‰) to the upper reaches (>130‰) and experiencing large seasonal variations, from 130‰ after periods of drought down to 40‰ during short periods of rainfall (Albaret, 1987).

The black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* has been found in West-African habitats at salinities ranging from freshwater up to 130‰, and was observed to reproduce and grow at salinities of up to 85‰ (Albaret, 1987; Panfili et al., 2006). However, a decreased condition index and over-expression of the HSP70 stress protein transcripts were related to salinity increase from 40 to 60‰ as well as from 60 to 100‰ in wild specimens (Tine et al., 2010). An important allocation of energy towards osmoregulation might result in the decrease of both reproduction and growth with salinity in the Saloum estuary (Panfili et al., 2006).

The high demographic growth observed in Senegal associated with a high urbanization rate has generated significant water pollution (Niang-Diop et al., 2002; Manirakiza et al., 2003). In addition, agricultural runoff of rain and irrigation water introduces pesticides into the aquatic environment, where it poses significant toxicological risks to resident organisms (Scott et al., 1990). Pesticides such as the organochlorine hydrocarbon DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane] are widely used in West African countries, for controlling cotton pests and mosquitoes, but also illegally by fishermen as an easy means to capture fish (Avit et al., 1999). Photochemical and/or microbial DDT degradation in water leads to the dechlorination of DDT into DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene) and DDD (1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane),

*Abbreviations:* p,p'-DDT, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane; NKA, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, FW, freshwater; SW, seawater; HSW, hypersaline water; MRCs, mitochondria rich cells.

\* Corresponding author at: IRD, Mediterranean Institute of Oceanography (MIO) UMR 7294, Station Marine d'Endoume, rue de la batterie des Lions, 13007 Marseille, France. Tel.: +33 4 9104 1605; fax: +33 4 9104 1635.

E-mail address: [virginie\\_riou@hotmail.com](mailto:virginie_riou@hotmail.com) (V. Riou).

with DDD as the major metabolite (Murty, 1986). The lipophilic nature of DDT and derivatives allows their retention for long periods, often resulting in highly toxic amounts accumulated in high trophic levels.

The sum of DDT isomers and metabolites (DDTs) has been detected as the main organochlorine pesticide contaminant in waters collected near Sene-Gambian farms in Senegal. Concentrations varied between 8.5 and 190.1 ng L<sup>-1</sup> and reached up to 231.9 ng L<sup>-1</sup> in Dakar (Manirakiza et al., 2003), exceeding the WHO limit for drinking water quality of 100 ng L<sup>-1</sup> (UNEP/FAO/WHO, 1989). High amounts of organochlorine pesticides (lindane, dieldrin, heptachlor, aldrin and *p,p'*-TDE) have also been detected in tissues of *S. melanotheron* caught at multiple sites of the Ouémé River, Republic of Benin (Okoumassoun et al., 2002). These specimens revealed abnormal levels of vitellogenin in male specimens, which were suggested to be related with the xeno-estrogenic or anti-androgen properties of the isomers of DDT, DDD and DDE (Soto et al., 1995).

The accumulation of DDT and metabolites in different fish tissues probably affects other functions such as osmoregulation. In *Sarotherodon aureus* for instance, the DDT metabolite *o,p'*-DDD inhibits the metabolism of cortisol (Ilan and Yaron, 1983), one of the major hormones involved in successful SW acclimation (Forrest et al., 1973). An increase in cortisol linked to DDT exposure might thus affect the ability of tilapia to face a hypertonic shock. DDT has also been shown to induce gill morphological changes (necrosis, hypertrophy and hyperplasia, Walsh and Ribelin, 1975) and to inhibit the activity of the branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump in teleosts (e.g. Janicki and Kinter, 1971; Kinter et al., 1972). The multifunctional gill, main site for osmoregulatory transport mechanisms, is indeed a primary target for many toxicants and represents the main uptake pathway for hydrophobic compounds (like DDT) from the water column (Ondarza et al., 2011). *S. melanotheron* is known to resist particularly well to rapid salinity increases (Lemarié et al., 2004), however the effect of DDT on the ability of tilapia to face hyperosmotic stress is unknown and is the focus of the present work. The aim of this study is to determine whether the hydro-mineral balance of the extremely euryhaline *S. melanotheron* is altered and to determine the effects on gills at the tissue and molecular levels.

## 2. Material and methods

### 2.1. Fish and chemicals

Young adult *S. melanotheron* (41.9 ± 7.9 g; 12.5 ± 0.9 cm; Mean ± SD), hatched and grown in constantly aerated freshwater (FW: around 0.3‰) at 29 °C, were obtained from the Cemagref-IRD “Gamet” culture facility in Montpellier. During their growth and the whole period of the experiment, fish were held under a photoperiod of 12 h of light and 12 h of darkness. Six days prior to initiating salinity changes, they were transferred to 3 closed re-circulating systems (200 L) filled with aerated 29 °C FW (0.2–0.5‰) at densities around 1 fish per 3 L water. The adaptation of fish from one of the 200 L tanks to hypersaline water (HSW: 67.3–70.2‰) was done by successive 24 h increases to 35, 50, 60 and 70‰. Fish from the second 200 L FW tank were directly transferred to seawater (SW: 34.0–38.9‰) 3 days later, so that SW- and HSW-acclimated fish reached their final salinity on the same day. The salinity of natural seawater was adjusted with synthetic marine salts (Instant Ocean®, Antinea, France) to 35‰ (SW) and 70‰ (HSW). Salinity was monitored alternatively by refractometry or the use of an electronic salinometer (30 M–100, YSI Incorporated Yellow Springs). During the experiments, the temperature was kept between 26 and 30 °C, with variations of less than 2 °C from one day to the other.

A stock solution of 0.1 g L<sup>-1</sup> *p,p'*-DDT (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Germany) in dimethyl sulfoxide (DMSO) was stored at 4 °C for daily additions to designated glass aquaria. For the measurements of DDT concentrations, dichloromethane (Accros Organics, Fisher Scientific, France), pentane (JT. Baker, Atlantic labo, France), sulphuric acid Sharlau (95–98% extra pure, Atlantic labo, France) and iso-octane Sharlau

(Atlantic labo, France) were used. The silica gel (0.063–0.2 mm, Merck, France) was cleaned with dichloromethane before acid silica gel was prepared, mixing 600 g of silica gel and 400 g of sulphuric acid over night at 200 °C (Müller et al., 2001). The standard reference material SRM 2261 (chlorinated pesticides in Hexane) was provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). DDT-d8 was delivered as crystals by Cambridge Isotope Laboratories (Purity 99%). Octachloronaphthalene (OCN) was used as syringe standard and purchased from Cluzeau Info Labo (Purity 98.8%).

### 2.2. Experimental design

For the experiments lasting respectively 1 and 12 days, fish from the acclimation tanks (FW, SW, HSW) were transferred to 12 covered glass aquaria filled with 40 L of water at the corresponding salinity (12 fish per tank) 12 h after the final salinity step. Each condition (FW, SW and HSW; FW + DDT, SW + DDT and HSW + DDT) was duplicated (tanks a and b). Fish were fed daily with commercial pellets (Biofoccus, 47% proteins, Biomar, France) at 0.6% body weight. Excess food and feces were removed 2 h after food addition to the tanks, while replacing at the same time 37% of tank water. To avoid DDT accumulation in the food, the adjustment of DDT water concentration in the exposed tanks was done after feeding and water renewal, by adding 240 µL of the 0.1 g L<sup>-1</sup> *p,p'*-DDT stock solution. Although no filtering system was used (with the objective to maintain DDT concentration), water quality (measured daily before feeding) was kept within the ranges of pH 7.4–8.2, 3–7 mg L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>, 0–2 mg L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 0–1 mg L<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

To monitor waterborne DDT levels during the experiment, triplicate 10 mL water samples were collected after 1, 8 and 12 days, transferred to glass flasks equipped with Teflon screw caps and stored at –20 °C. At the end of the experiments, the fish were anesthetized with MS-222 buffered in Trizma-Base to pH 7.7 (100 mg L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, France) under dark and quiet conditions. A condition index (CI, Tine et al., 2010) based on the fish length (FL, mm) and body wet mass (W, g): CI = 10<sup>5</sup> W FL<sup>-3</sup> was calculated for each individual. The fish blood osmolality was immediately measured (§2.8), gills were sampled for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) activity (§2.7), histology, immunocytochemistry (§2.5–6), and scanning electron microscopy (§2.4). From every tank, 6 fish were sampled for gill, liver, and muscle tissues. Aluminum containers were used to pool each tissue separately (corresponding to half the tissue amount of each 6 replicate fish) according to the different experimental tanks. Tissues were stored at –20 °C until freeze-drying. The samples were kept at –40 °C for 24 h before freeze-drying for 48 h under 0.05–0.5 mbar vacuum in a CHRIST ALPHA 1–4 device (Bioblock Scientific, France) for further processing (§2.3). All animal procedures were in compliance with the guidelines of the European Union (directive 86/609) and the French law (decree 87/848) regulating animal experimentation.

### 2.3. Total DDT concentration in water and tissue samples

#### 2.3.1. Water analyses

SPME (Solid Phase Micro-Extraction) analyses of triplicate 10 mL water samples were performed with commercially available PDMS (polydimethylsiloxane) 100 µm coating fibers from Supelco (Bellefonte, USA). After the immersion of the fiber in the sample (30 min. at 40 °C at 250 rpm), it was immediately desorbed into the Gas Chromatograph (GC) injection port (temperature = 250 °C; time = 3 min). Analyses were performed in automated mode thanks to a multipurpose sampler MPS2 (Gerstel, RIC France, Lille). DDT-d8 was used as internal standard (IS). Calibrations were performed with ultrapure and salted waters spiked at 3 different levels with compounds of interest and the IS.

#### 2.3.2. Tissue analyses

In order to determine DDT, DDD and DDE concentrations in muscle, liver and gill tissues, an extraction-purification performed by Microwave

Assisted Extraction (Start E system) coupled with purification on acid silica gel column was applied (Thompson and Budzinski, 1999). Freeze-dried gill, liver or muscle tissues pooled from 6 fishes per tank (0.2 to 0.5 g of dry tissues) were extracted by microwave-assisted extraction with dichloromethane (pressurized system controlled by Temperature programmed from around 40 °C to 80 °C during 5 min at 800 W, then held at 80 °C for 5 min at 400 W). The internal standard, DDT-d8, was gravimetrically added prior to the extraction and one extraction blank was performed with each series of extraction. For DTs analysis, the extract was then purified on an acid silica gel column (adapted from Tapie et al., 2008). Compounds were eluted with 3×5 ml of a mixture pentane / dichloromethane (90/10; v/v). The extract was concentrated, transferred to isoctane and the syringe standard (Octachloronaphthalene) was added before analysis by Gas Chromatography coupled to Electron Capture Detector (GC/ECD).

### 2.3.3. Analytical determination of DDT, DDD and DDE concentrations

The GC was an Agilent 6890 model (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a Micro Electron Capture Detector. The column used was an HP-5MS ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxane; 30 m×0.25 mm i.d.; 0.25 µm film; Agilent Technologies, Chromoptic, Courtaboeuf, France). Both SPME and direct liquid injections (after extraction of dry tissues) were performed with the pulsed splitless mode; the pulse pressure was 25 psi for 1.5 min (for liquid injection) or 3 min (for SPME injection), then the purge flow to split vent was 60 mL min<sup>-1</sup> and the gas saver was set at 20 mL min<sup>-1</sup> after 15 min; the inlet temperature was 250 °C. The carrier gas was helium (purity 5.6, Linde Gas, Toulouse, France) with a constant flow rate of 1.3 mL min<sup>-1</sup> and linear velocity of 42 cm s<sup>-1</sup>. The column temperature was held initially at 60 °C for 2 min, increased to 280 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>, and finally held on for 5 min. DTs were quantified in relation to internal standards (IS). Octachloronaphthalene was used as syringe standard. The response factors of the different compounds were measured by injecting mixtures of DTs (SRM 22261), IS and syringe standard.

For quality insurance, procedural blanks were regularly performed during the extraction process (representing less than 2% of the sample content) and all the results presented are corrected for blank levels. The DTs analysis method was validated by the extraction and analysis of a certified matrix SRM 2977 (mussel tissues, *Perna perna*, from Guanabara Bay, Brazil) provided by the NIST (Gaithersburg, MD, USA). Recovery percentages of analyzed DTs are >90% and for all compounds, the variability is less than 10% (n=3). Blank injections of isoctane were performed between each sample injection to ensure the cleanliness of the GC/ECD injector.

### 2.4. Scanning electron microscopy

The 2nd (half) left gill arches of 2 fish from each condition were fixed by 24 h immersion in 2% glutaraldehyde solution adjusted to 380 mOsm kg<sup>-1</sup>, buffered at pH 7.4 with 0.1 mol L<sup>-1</sup> cacodylate buffer. Samples were rinsed 3 times 30 min in cacodylate buffer and immediately post-fixed for 4 h at room temperature in buffered 1% OsO<sub>4</sub>. After extensive washes in buffer, the samples were rinsed with water and dehydrated through an ethanol series, and a 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane bath, followed by air drying and attachment to specimen stubs with adhesive carbon tabs, platinum-coating in a sputter coater (SCD050 Bal-Tec, Germany) and examination with a Quanta FEG 200 (FEI, The Netherlands) equipped with a X-MAX EDS detector (Oxford Instruments, UK).

### 2.5. Gill preparation for histology/immunolocalization

The first left gill arches of 3 fish from each condition were immersed in Bouin's liquid for 48 h at room temperature, rinsed with 70% ethanol, dehydrated using increasing grades of ethanol (95 and 100%) and

butanol before treatment with Histochoice clearing agent (MICROM-SARL, Francheville, Lyon, France), for embedding in Paraplast. Transverse 4 µm-thick sections were cut on a Leitz Wetzlar microtome (Leica, Rueil-Malmaison, France) and mounted on poly L-lysine coated slides for histology or immunolocalization. For histology, the slides were dewaxed, rehydrated and stained with Masson's trichrome, mounted with Diamount (Diapath, Italy) and examined with a light microscope (Leica, Diaplan) coupled to a Leica DC 300 F digital camera and FW4000 Software. Blue-labeled gill filament mucous cells were enumerated on 330 µm long filament sections (expressed as mucous cell numbers per mm gill filament length). The interlamellar epithelium thickness measurements were performed on the same sections using the ImageJ software.

### 2.6. Immunolocalization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) and/or of the Cl<sup>-</sup> channel (CFTR)

The slides were processed as in Ouattara et al. (2009) with the following modifications. For NKA immunolocalization, the primary antibody (12 µg mL<sup>-1</sup> final concentration) was a H-300 rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 551–850 of human NKA α1 (sc-28800, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), already successfully used on fish (Sucré et al., 2010). This antibody detects the α1, 2 and 3 isoforms of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. When NKA was immunolocalized alone, a secondary Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG was used at 10 µg mL<sup>-1</sup> (A-11008, Invitrogen, France). Slides were mounted with an aqueous support (ImmunohistoMount, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) and rapidly examined with a Leica Diaplan fluorescence-fitted microscope (450–490 nm filter) coupled to a Leica DC 300 F digital camera and FW4000 Software. Mitochondria Rich Cells (MRC) NKA immunofluorescence intensities were measured on the ImageJ software and normalized using the corresponding lamellae background fluorescence.

For co-immunolocalization of NKA and of the CFTR Cl<sup>-</sup> channel, a monoclonal mouse antibody directed against the carboxyl terminus of human CFTR (MAB25031, R&D Systems, Minneapolis, USA) and cross-reacting with *S. melanotheron* CFTR (Ouattara et al., 2009) was added at 15 µg mL<sup>-1</sup> final concentration to the rabbit NKA primary antibody described above. Primary antibodies were revealed by an Alexa Fluor® 488 conjugated donkey anti-mouse IgG (10 µg mL<sup>-1</sup>, A-21202, Invitrogen, USA) and a Rhodamine-conjugated donkey anti-rabbit IgG (4 µg mL<sup>-1</sup>, sc-2095, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), as secondary antibodies, respectively. Control sections were subjected to the same conditions, but without primary antibodies. The slides were mounted with ImmunohistoMount and examined with a Zeiss AxioimagerZ1 epifluorescence microscope fitted with the ApoTome (FITC and CY3 Axioimager Z1 filters) using AxioVision Rel. 4.8 Software.

### 2.7. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity measurements

The 2nd (half), 3rd and 4th left gill arches of each fish were preserved at -80 °C in SEI buffer (300 mmol L<sup>-1</sup> Sucrose, 20 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 100 mmol L<sup>-1</sup> Imidazole; pH 7.3). After thawing on ice, the gill epithelium was scraped out of the cartilage and homogenized in ice-cold membrane isolation buffer (MIB: 250 mmol L<sup>-1</sup> sucrose, 5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol L<sup>-1</sup> Tris/Hepes; pH 7.3), centrifuged at 4000 g (5 min at 4 °C), and proteins in the supernatant were quantified by the Bradford method (Biorad, France). NKA activity, expressed in µmol Pi mg<sup>-1</sup> protein h<sup>-1</sup>, was measured according to Flik et al. (1983) downscaled to 110 µL reaction volume into a 96-well microtiter plate with 5 µg protein in MIB containing 0.1 µg saponin. NKA specific activity was calculated from the difference in ATP hydrolysis at 37 °C following the addition of 100 µL assay buffer (3 mmol L<sup>-1</sup> Na-ATP, 100 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 30 mmol L<sup>-1</sup> Imidazole/Hepes, 0.1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 5 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; pH 7.4) amended with either 13.4 mmol L<sup>-1</sup> KCl, or 1.4 mmol L<sup>-1</sup> ouabain. The enzyme reaction was stopped by adding ice-cold trichloroacetic acid 10% (100 µL), simultaneously with 100 µL color reagent (660 mmol L<sup>-1</sup>

$\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $9.2 \text{ mmol L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $330 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) followed by a 10 min reaction to quantify liberated Pi (630 nm absorbance, Infinite M200 plate reader, TECAN trading AG, Switzerland).

### 2.8. Osmolality measurements

Blood osmolality was measured in 6 fish from each tank. Blood was sampled from the caudal vessel using a 1 mL syringe coated with heparin (Li-heparin, Sigma-Aldrich, France). The osmolality of 20  $\mu\text{L}$  of blood was measured on an Advanced 3300 micro-osmometer using an internal standard of 300 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ .

### 2.9. Statistical analysis

Differences in water DDT concentrations ( $n = 5$  sampling events or  $N = 4$  tanks per salinity), fish blood osmolality ( $N = 12$  fish per condition), gill NKA activity ( $N = 12$  fish per condition), gill MRC NKA immunofluorescence intensity relative to gill tissue background ( $n = 10$  MRCs per  $N = 3$  fish per condition), gill filament mucous cell numbers ( $n = 10$  sections per  $N = 3$  fish per condition) and inter-lamellar epithelium thickness ( $n = 10$  measurements per  $n = 10$  sections per  $N = 3$  fish per condition), were analyzed by the non-parametric pairwise Mann-Whitney test on raw data, due to the low number of replicates, using the Statistica 6 software. Unless otherwise stated, data are reported as medians and 25–75% interquartile ranges and statistical difference was accepted at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

No mortality was observed after the one-day DDT exposure experiment. Concerning the 12 days DDT exposure experiment, agonistic behavior was noticed in all the tanks after Day 1 of DDT-exposure, resulting in increased mortality until Day 5 in FW and SW tanks (controls: 1 death/tank for FW, 4–5 deaths/tank in SW; DDT: 2–4 deaths/tank in FW, 1–2 deaths/tank in SW). Dead fish indeed harbored bite marks on their fins, as well as large scaleless wounds on the flanks. Between Days 5 and 12, there was 1 death per tank in both control and DDT-exposed FW and SW tanks. In HSW, fish mortality was only observed after Day 5 in both control and DDT-exposed tanks and was consistent between replicate tanks (controls: 3 deaths/tank; DDT: 6 deaths/tank). After 12 days, the condition indices (CI) of control fish ( $0.200 \pm 0.014$ ,  $0.196 \pm 0.008$  and  $0.203 \pm 0.012$  for FW, SW and HSW, respectively; mean  $\pm$  SD) were not different from one salinity to the other or from the CI of DDT-exposed fish ( $0.206 \pm 0.017$ ,  $0.210 \pm 0.015$  and  $0.210 \pm 0.015$ , resp.; mean  $\pm$  SD; all pairwise comparisons Mann-Whitney  $p > 0.05$ ).

### 3.1. Waterborne DDT monitoring

A preliminary experiment was performed in the same conditions as the real experiment in seawater, for 5 days with/without fish, to determine the nominal DDT concentration to add to the tanks. The daily addition of a nominal concentration of  $600 \text{ ng L}^{-1}$   $p,p'$ -DDT was chosen, resulting in waterborne total DDTs (tDDTs, i.e. sum DDT, DDE and DDD) concentrations of 232 (167–272)  $\text{ng L}^{-1}$  ( $n = 5$ , median (25–75%)) over 5 days without fish, reproducing the highest environmental tDDTs concentrations measured in Senegal (231.9  $\text{ng L}^{-1}$ , Manirakiza et al., 2003).

The 1 and 12 days experiments were performed with 12 fish per FW-, SW- and HSW-aquarium (fish weights of  $42.8 \pm 7.0 \text{ g}$ ,  $43.2 \pm 7.9 \text{ g}$  and  $44.5 \pm 8.4 \text{ g}$ , resp., mean  $\pm$  SD). On the first day of DDT-addition to the fish tanks, waterborne tDDTs concentrations were 84 (35–129)  $\text{ng L}^{-1}$ , 128 (90–177)  $\text{ng L}^{-1}$  and 93 (68–110)  $\text{ng L}^{-1}$  ( $N = 4$ , median (25–75%)), respectively. No difference was observed between salinities after 1 day of DDT exposure ( $p > 0.05$ ), and the DDT metabolites were consistently dominated by DDT, with DDD and DDE accounting for

2.3–4.7% and 0.5–0.7% of tDDTs, respectively (Fig. 1, Day 1). After 8 days (data not shown) and at the end of the 12 days experiment (Fig. 1, Day 12), waterborne tDDTs concentrations tended to be consistently higher in HSW tanks (where the number of fish was the lowest) compared to FW and SW tanks. The fraction of DDE increased (relative to Day 1) at all salinities after 12 days to 4.0–6.2% of tDDTs (Fig. 1, Day 12).

### 3.2. Tissues DDT concentrations

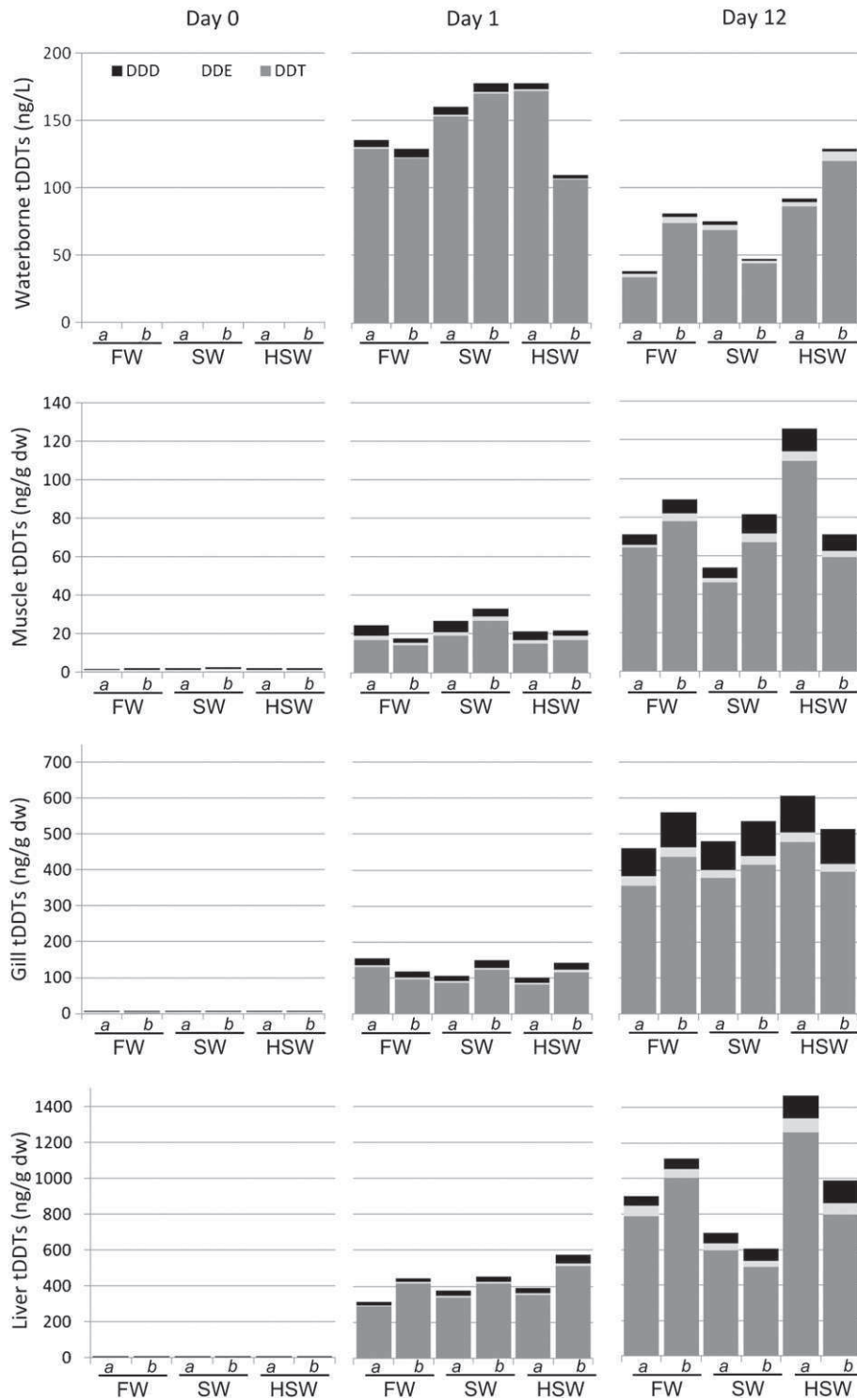
Overall, fish tissues presented tDDTs concentrations increasing by a factor of 3 to 9 from muscle (Day 1: 15–30  $\text{ng/g}$  dry weight; Day 12: 50–125  $\text{ng/g}$  dw), to gill tissues (Day 1: 100–150  $\text{ng/g}$  dw; Day 12: 450–600  $\text{ng/g}$  dw), and by a factor of 1.3 to 4 from gill to liver tissues (Day 1: 300–600  $\text{ng/g}$  dw; Day 12: 600–1500  $\text{ng/g}$  dw, Fig. 1). Absolute amounts of DDT, DDD and DDE were globally higher after 12 days than after 1 day of exposure. All examined tissues presented DDD/tDDTs ratios higher than those in the waters (Day 1 and Day 12, Fig. 1), with gills displaying DDD/tDDTs ratios 1.4 to 2.8 times higher than livers and muscles. At Day 1, the DDE/totalDDTs ratios in fish tissues (3.8–5.1%, 2.3–2.9% and 6.3–9.0% in muscle, gill and liver, resp.) were higher than the ratios present in waters (Fig. 1). While the gills DDD/tDDTs and DDE/tDDTs ratios were almost identical at days 1 and 12, in muscle tissues they tended to be lower on Day 12 than on Day 1 by a factor of approximately 2. Liver DDE/tDDTs ratios on Day 12 were twice those observed on Day 1 (DDD/tDDTs ratios were comparable after both periods of DDT-exposure).

While the tilapia gills contained similar tDDTs concentrations, DDD/tDDTs and DDE/tDDTs ratios in FW, SW and HSW after 12 days of DDT exposure, liver (and muscles in one replicate) tDDTs concentrations tended to be higher in HSW-acclimated tilapia than in FW and SW. The lowest muscles and livers tDDTs concentrations were measured in SW-acclimated fish (Fig. 1). Although FW tanks waterborne DDD/tDDTs and DDE/tDDTs ratios tended to be higher after 12 days than in SW and HSW, FW-acclimated fish liver and muscle tissues DDD/tDDTs ratios were almost half of those observed in SW- and HSW-acclimated specimens.

### 3.3. Gill structure

In the afferent and efferent gill filament borders of FW-acclimated tilapia, scanning electron microscopy (SEM) revealed many mucus plugs or granules (Fig. 2). Mitochondria Rich Cell (MRC) apical openings with microvilli were also observed (Fig. 2A,B). Histological observations (made on 3 individuals per condition) on FW-acclimated fish gills revealed abundant mucous cells (42 (36–48) mucous cells/mm filament length; Median (IQ25–75)) in the apical part of a thick interlamellar epithelium (Fig. 3; Fig. 4A). In comparison, mucous cells were significantly less abundant in the gill epithelia of SW- and HSW-acclimated tilapia (with 3 (0–12), and 5 (3–6) mucous cells/mm filament length, resp.; Median (IQ25–75)), and their interlamellar epithelium was significantly thinner (Fig. 3, Fig. 4A). The gill epithelium was significantly thicker in HSW- (mainly due to larger MRCs) than SW-acclimated fish (Fig. 4A) and the surface of the secondary lamellae was almost totally exposed to the surrounding water in gills of fish exposed to both salinities (Fig. 3). SEM revealed many small crypts (1  $\mu\text{m}$ ) with microvilli on the afferent side of SW-acclimated *S. melanotheron* gill filaments, and crypts of varying sizes with no visible microvilli in HSW-acclimated fish (not shown).

The presence of DDT was associated at all salinities with thinner gill interlamellar epithelia relative to control specimens (reduced by 23%, 25% and 29% in FW + DDT, SW + DDT and HSW + DDT, resp.; Fig. 4A). Significantly less mucous cells were counted in FW- and HSW-acclimated tilapia (30 (20–46) and 0 (0–3) mucous cells/mm filament length, resp.; Median (IQ25–75)) than in control specimens (see above). In addition, FW-grown tilapia exposed to DDT displayed varying epithelium thickness (thinner in the filament centre, with more lamellar surface exposed to the surrounding FW) and abnormalities such as epithelial



**Fig. 1.** DDT (dark grey), DDE (light grey) and DDD (black) concentrations in water (ng/L) and muscle, gill and liver tissues from *Sarotherodon melanotheron* (ng/g dry weight) after 0, 1 or 12 days of exposure in freshwater (FW), seawater (SW) or hypersaline water (HSW) in duplicate aquaria (a and b).

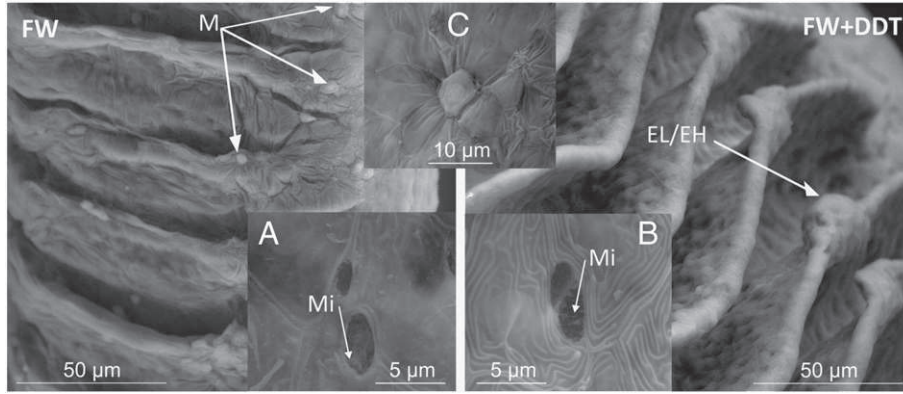
hyperplasia, lifting, and necrosis (Fig. 2 right, Fig. 3 top right) as well as lamellar fusions.

#### 3.4. Gill $Na^+/K^+-ATPase$ and CFTR immunolocalization

The abundance of NKA-labeled Mitochondria Rich Cells (MRC) in the FW-grown tilapia gill epithelium was very variable and they were mainly localized on the secondary lamellae, sometimes partly covered by mucous cells (Fig. 3 FW and FW + DDT). The gill filaments of SW-acclimated tilapia displayed one to two triangular shaped

NKA-labeled MRC regularly present within each interlamellar space at the basis of the epithelium (Fig. 3 SW). A similar regularity was noticed in control fish adapted to HSW, with larger NKA-labeled MRC in the interlamellar epithelium (Fig. 3 HSW and HSW + DDT). NKA labeling intensity was significantly lower in gills from HSW- than from FW-acclimated tilapia, and the CFTR chloride channel was only detected in gill MRC apical crypts from specimens adapted to HSW (Fig. 3E').

In FW MRC, DDT exposure did not affect intracellular NKA labeling intensity (Fig. 4B). In contrast, the gills of SW- and HSW-acclimated fish exposed to DDT displayed lower MRC NKA-labeling intensity

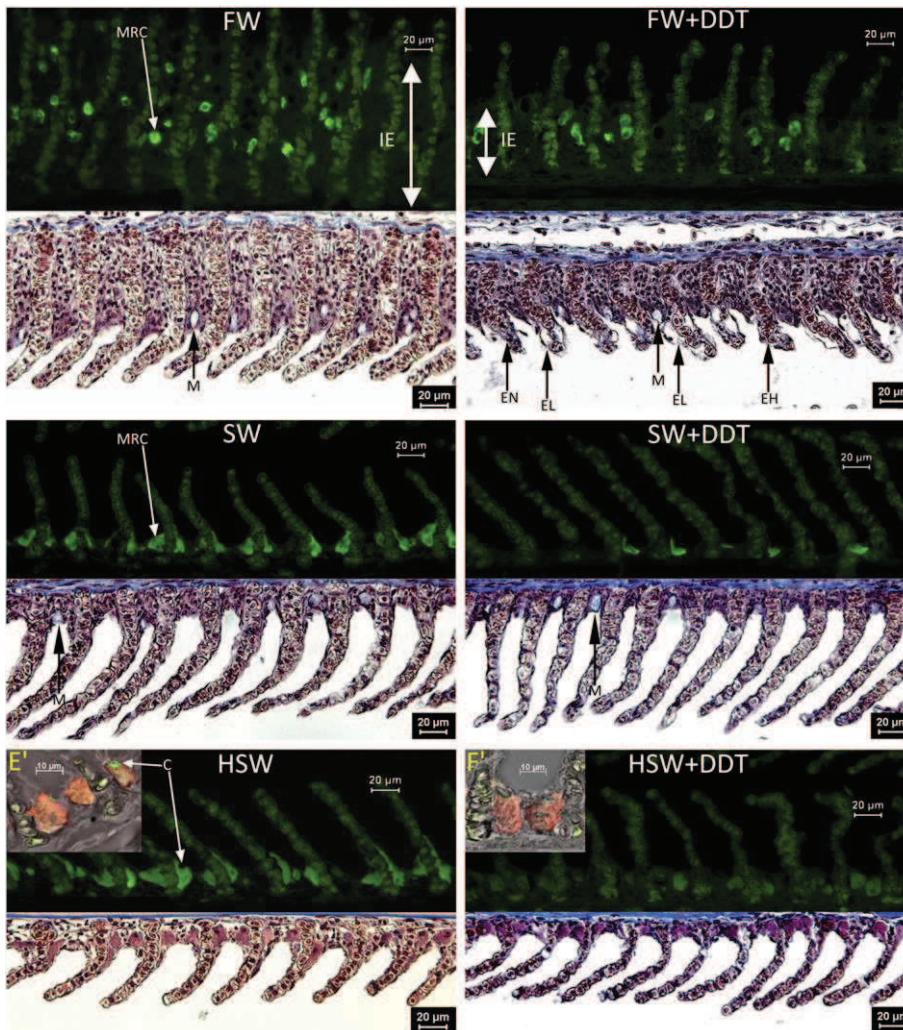


**Fig. 2.** Scanning electron microscopy of gill lamellae from *Sarotherodon melanotheron* maintained in FW without (left) or with DDT for 12 days (right). Inserts: magnifications of a mucus plug (C) and MRC apical openings with microvilli in control (A) and DDT-exposed (B) tilapia. Arrows point at examples of M: mucus plug, Mi: Microvilli, EH: epithelium hyperplasia, EL: epithelial lifting.

relative to control and to DDT-exposed FW-adapted tilapia (Fig. 3 middle and bottom panels, Fig. 4B). Finally, the CFTR chloride channel was less detected in HSW-acclimated tilapia exposed to DDT than in controls (Fig. 3F').

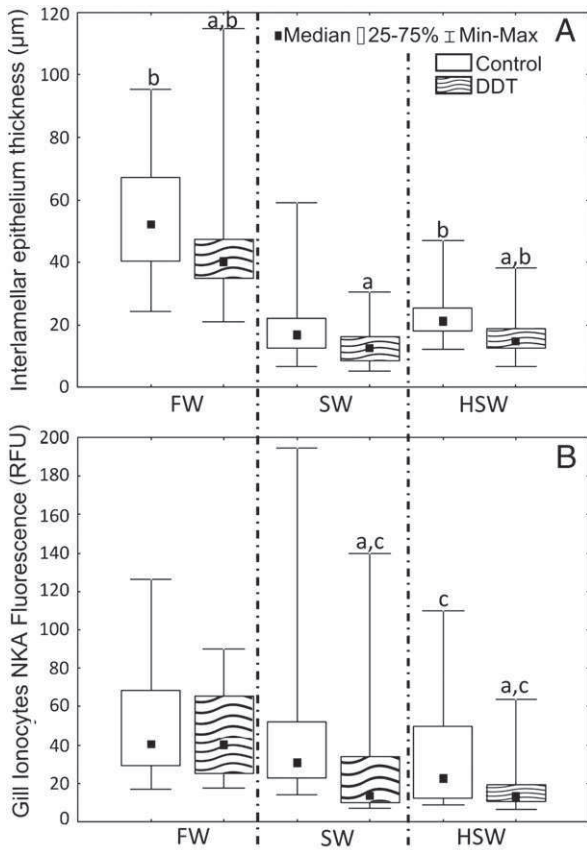
3.5. Gill  $Na^+/K^+$ -ATPase activity and blood osmolality

The analysis of gill  $Na^+/K^+$ -ATPase activity and blood osmolality in 6 fish from each duplicate aquarium allowed ruling out potential "tank



**Fig. 3.** *Sarotherodon melanotheron* gill tissue histology (bottom) and  $Na^+/K^+$ -ATPase immuno-localization (green, top) in fish maintained in freshwater (FW), or acclimated to seawater (SW) or hypersaline water (HSW) for 12 days without (left) or with DDT (right). E'-F': co-immunolocalizations of  $Na^+/K^+$ -ATPase (red) and CFTR (green). Arrows point at examples of M: mucocyte, MRC: mito-chondria rich cell, C: crypt, EH: epithelium hyperplasia, EL: epithelial lifting, EN: epithelial necrosis. Differences in Interlamellar Epithelium (IE) thickness are pointed at in FW specimens.





**Fig. 4.** Effect of DDT (12 days) in *Sarotherodon melanotheron* kept in freshwater (FW), seawater (SW) or hypersaline water (HSW) on A: Gill interlamellar epithelium thickness ( $N=3$  fish per condition;  $n=100$  interlamellar spaces on 250X magnified filaments from 1 or 2 tissue sections), and B: Gill Mitochondria Rich Cells (MRC)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase immunofluorescence intensity normalized by tissue background fluorescence ( $N=3$  fish per condition;  $n=10$  MRC). Significant differences (Mann–Whitney  $p<0.05$ ) are marked as a (DDT different from control), b (different from SW in the corresponding condition, i.e. control or DDT), c (different only from FW in the corresponding condition).

effect". Branchial NKA activity increased significantly from FW to SW and HSW in controls. After 12 days of DDT exposure, NKA activity was significantly inhibited in FW- and SW-acclimated fish gills compared to control specimens, while there was no inhibition in HSW (Fig. 5A). Control tilapias exposed to salinities ranging from 0.3 to 70.2‰ (corresponding to 10–2050  $\text{mOsm kg}^{-1}$ ) maintained their blood osmolalities between 340 and 410  $\text{mOsm kg}^{-1}$ . A significant increase in blood osmolality was observed from FW- to SW- and from SW- to HSW-acclimated tilapia (Mann–Whitney  $p<0.05$ , Fig. 5B). The same trend was observed in the presence of DDT, which had no effect (relative to the controls) on blood osmolality after 1 (data not shown) and 12 days (Fig. 5B).

#### 4. Discussion

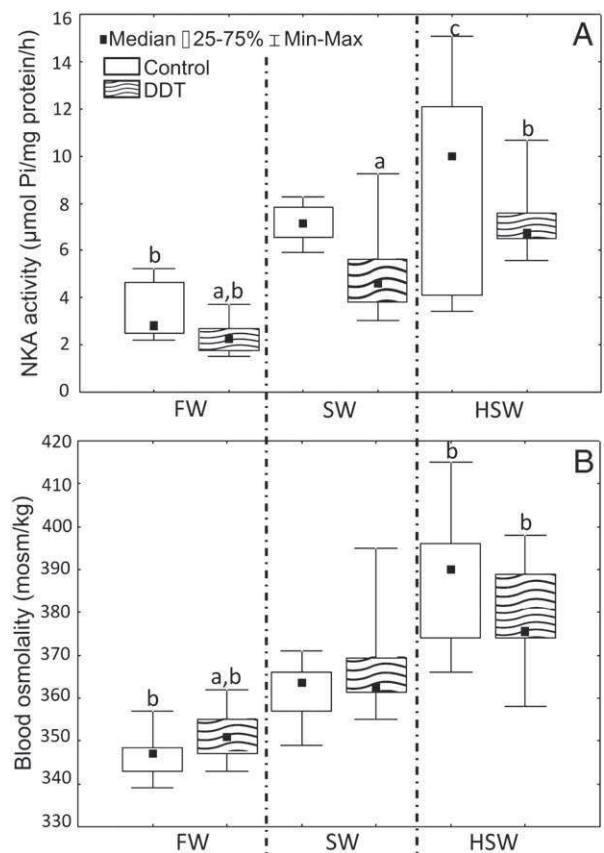
The present study was designed to challenge the euryhalinity of the West African black chinned tilapia *S. melanotheron* and to determine the impact of DDT pollution on the hydromineral regulation and gill structure and function. Testing the physiological limits of the animal by applying extreme conditions resulted in high mortalities. However, despite the fact that our experiments did not absolutely reflect natural scenarios, the conditions applied in this study remained within the frame of waterborne DDT concentrations and salinities which may be experienced by *S. melanotheron* in its natural habitat. Indeed, although waterborne total DDTs (tDDTs) concentrations dropped down by a factor of around two after fish were added to the aquaria, they remained within the range of waterborne concentrations detected near Senegal farms (8.5–190.1  $\text{ng L}^{-1}$ , Manirakiza et al., 2003). In the wild, tDDTs

concentrations of up to 1947  $\mu\text{g g}^{-1}$  were measured in whole tilapias captured in Mexico rivers (Albert, 1996), and around 30  $\mu\text{g g}^{-1}$  wet weight were detected in *S. melanotheron* captured in the Ouémé river, Republic of Benin (Okoumassoun et al., 2002), indicating prolonged exposure and/or exposure to higher concentrations of DDT than the ones used in our experiments.

The tDDTs concentrations detected during the present experiment are in the same range as the measurements made by Kwong et al. (2008) on tissues of black sea breams continuously exposed to 500  $\text{ng L}^{-1}$  DDT for up to 7 days. These authors underlined the importance of the gills in aqueous DDT uptake and fast depuration (Kwong et al., 2008), in addition to its important osmoregulatory role in teleosts (Evans and Claiborne, 2009). Our study presents the changes in gill epithelium structure,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity and blood osmolality after 12 days of DDT exposure associated to increasing salinities.

#### 4.1. Effect of salinity on fish tissue DDT concentration and conversion

While fish are not supposed to drink water in FW, they need to drink water at high salinities in order to cope with dehydration. An intestinal entry route for DDT might contribute to higher DDT concentrations in tissues from fish acclimating to saltwater. Although we could indeed observe the highest DDT concentrations in livers of HSW-acclimating fish, SW-acclimating fish liver and muscle tissues presented the lowest DDT concentrations of all salinities. The hypothesis that SW-adapted *S. melanotheron* may have more energy to allocate to DDT depuration mechanisms than at other salinities may explain this trend. Indeed, the costs of adaptation to salinity in wild *S. melanotheron* seem to be lowest in SW (Tine et al., 2011), and the highest growth rates are



**Fig. 5.** Effect of DDT (12 days) in *Sarotherodon melanotheron* kept in freshwater (FW), seawater (SW) or hypersaline water (HSW) on A: Gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity ( $N=12$  fish; 2–3 replicate analyses), and B: Blood osmolality ( $N=12$  fish). Significant differences (Mann–Whitney  $p<0.05$ ) are marked as a (DDT different from control), b (different from SW in the corresponding condition, i.e. control or DDT), c (different only from FW in the corresponding condition).

detected in SW-adapted wild tilapia (Tine et al., 2007). The higher mortality in HSW, resulting in lower fish numbers (half of those in SW tanks) at the end of the 12 days experiment, might also explain higher waterborne and tissues tDDTs concentrations (except in the gills) than at other salinities.

During our experiments, an increase in DDD/tDDTs ratio in all the tissues relative to waterborne ratios was observed. Since DDD is the least lipophilic compound among all DDT derivatives, preferential DDD accumulation over DDT and DDE would not be an explanation for this trend. It rather indicates that the fish were actively metabolizing DDT. DDT dechlorination to DDD and/or DDE in salmon and has been associated to the action of intestinal microflora (Wedemeyer, 1968) and liver microsomal DDT-dehydrochlorinase in rainbow trout. In addition, non-enzymatic reductive dechlorination of *p,p'*-DDT to *p,p'*-DDD is known to occur in the blood of goldfish (Kitamura et al., 1999). DDE (but not DDD) build-up over time in the liver of *S. melanotheron* confirms the importance of the liver in DDT conversion and the high persistence of DDE. In the gills of *S. melanotheron*, DDD/tDDTs ratios were higher than in muscle and liver tissues, which might indicate an important role of this organ in DDT metabolism. Owing to the lower lipophilic nature of DDD, it might also be easier to release it from the organism, and the conversion from DDT to DDD might ease their depuration (Kwong et al., 2008). A tendency for lower conversion of DDT to DDD was noticed in the liver in FW after 12 days than after 1 day, indicating that the liver might be less efficient in depurating DDT over prolonged exposure in FW. By contrast, DDT conversion to DDD operated in the gills of *S. melanotheron* appeared to be comparable at all salinities.

#### 4.2. Gill histopathology

The barriers to insecticide penetration (such as mucus hypersecretion) or circulation in the body (such as the liver) play a major role in DDT resistance (Yarborough and Chambers, 1979). In teleosts, the gill epithelium is flexible, adjusting its morphology and cellular composition according to the environment (mainly pH, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and dissolved ion concentrations) to optimize gas exchange, ionic regulation, acid–base balance and nitrogenous waste excretion. Gills are also a primary route for toxic compound uptake, which can result in injuries reducing O<sub>2</sub> consumption and disrupting osmoregulation (Saravana Bhavan and Geraldine, 2000). DDT exposure of *S. melanotheron* resulted in alterations of the structure of gill lamellae in FW, which were less obvious in SW or HSW. Consistent with our observations on the tilapia, DDT was observed to induce leukocyte infiltration of the interstitial areas of the gill in Coho salmon and lake trout, resulting in hyperplasia of the secondary lamellae respiratory epithelium (Walsh and Ribelin, 1975). Epithelial lifting, mucus hypersecretion and pavement cell proliferation (with partial or total lamellar fusion) help to prevent the penetration of toxicants into the organism by increasing the water to blood diffusion distance.

Changes in the thickness of the interlamellar epithelium take part in gill remodelling in response to temperature fluctuation (Sollid et al., 2005; Mitrovic and Perry, 2009), hypoxemia and hyperoxia (Tzaneva et al., 2011) or sustained exercises (Brauner et al., 2011). Over the course of our experiment, low if any temperature fluctuations were recorded, and were identical for control and DDT-exposed fish: this factor may thus not explain the difference between control and DDT-exposed fish. One of the hypotheses to explain the thinning of the interlamellar epithelium observed at all salinities in the presence of DDT would be a compensation for areas of hyperplasia where respiration is impaired, as it has been previously observed in scaleless carps suffering from hypoxia (Matey et al., 2008). The decrease in branchial mucous cells in DDT-exposed *S. melanotheron* might thus be a reaction to reduce the epithelium thickness in a way to compensate limited O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> exchanges in areas of hyperplasia. Indeed, mitochondria rich cells (MRCs) and mucous cells increase the water–blood barrier for respiratory gases diffusion in the lamellar epithelium (Fernandes and Perna-Martins, 2002). On the contrary, mucus covering lamellae contributes

to ionbinding (Kirschner, 1978) and epithelial ion impermeability, simultaneously protecting against abrasive injuries by pollutants (e.g. Singh and Munshi, 1996; Ledy et al., 2003). The exposure of juvenile turbot to heavy fuel oil in seawater resulted in a 30% decrease in mucocyte numbers (Goanvec et al., 2011) and in Coho salmon and starry flounder exposed to saltwater soluble crude oil, excessive mucus exudation and sloughing of the first layers of the surface respiratory epithelial cells were observed (Hawkes, 1977). A comparable reaction in the presence of DDT might explain part of the epithelium thickness and mucous cell reduction observed in *S. melanotheron*.

#### 4.3. Effect of DDT on gills and osmoregulation

In order to maintain ion homeostasis in FW, the teleost fish gill absorbs salts, mainly through MRCs enriched in basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) and other necessary basal and apical transporters and channels (Evans and Claiborne, 2009). In *S. melanotheron*, a decreased NKA activity is observed in the presence of DDT, which does not seem to originate from a lower NKA protein abundance within the MRCs, and might rather result from enzymatic activity inhibition due to DDT exposure or from a decreased MRC number. DDT indeed inhibits NKA activity in gill homogenates of several teleost fish species (e.g. Davis and Wedemeyer, 1971; Janicki and Kinter, 1971). However, when rainbow trout adapted to FW are exposed to DDT, the inhibition of gill NKA and Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities does not result in osmoregulatory impairment (Leadem et al., 1974). According to our experiments, in the FW-adapted black chinned tilapia, the hydro-mineral balance is also maintained in spite of DDT inhibition of the gill NKA activity.

*S. melanotheron* gill tissue deterioration by waterborne DDT in FW might be compensated at first by other osmoregulatory organs (such as the kidneys and the intestine). In addition, DDT includes itself in the phospholipids normally constituting barriers to pollutant penetration. The insecticide could increase the membrane fluidity (Wolff and Bull, 1982) of the gill apical epithelium and consequently its permeability to water and non-ionic substances (Lande et al., 1995). Mucus secretion in FW might protect the gills from this effect, avoiding water invasion during the first days of DDT exposure.

The fact that *S. melanotheron* is considered one of the most euryhaline tilapia species was confirmed by our experiments, even in the presence of the toxic DDT pesticide. Following rapid salinity increase from FW to SW and HSW, tilapias reorganize their gill epithelium, with a rapid turn-over of MRCs (Kammerer and Külz, 2009; Ouattara et al., 2009). In hypertonic waters, teleost fish need to excrete ions (mainly through the gills) previously absorbed by drinking the surrounding water to compensate for dehydration. Basal NKA creates the primary ionic driving force in MRC for NaCl extrusion in saline waters (Evans, 2008) also requiring the apical CFTR chloride channel (Evans and Claiborne, 2009). Upon salinity increase from FW to SW and HSW, *S. melanotheron* branchial NKA activity doubled and tripled, respectively, with the production of CFTR in HSW, while a surprising decrease in MRC catalytic NKA  $\alpha$ -subunit immunostaining was observed. This last observation may imply that the antibody binding was disturbed by a conformational change in the protein, and/or that an activated form of the protein was less abundant in the MRC: for instance, in salmonids, isoform specific conformational changes were observed, giving rise to NKA enzymatic activation related to salinity increase (Lingwood et al., 2005). The occurrence of such a conformational change still needs to be investigated in *S. melanotheron*, as well as its effect on antibody binding.

In the presence of DDT, the inhibition of NKA activity in SW-acclimated fish might correspond to lower intracellular protein immunostaining. The NKA and CFTR channel proteins were barely detected in gills of DDT-exposed HSW-adapted tilapia, compared to controls. In HSW, control specimens NKA activity varied widely, and although DDT inhibition was not significant, median activity decreased by approximately 3  $\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{protein h}^{-1}$  (equivalent to total NKA activity in FW-adapted *S. melanotheron*). Although *S. melanotheron* managed to

maintain its hydromineral balance over the duration of our experiment, the decreases in NKA activity and CFTR abundance indicate that osmoregulatory failure might be expected in *S. melanotheron* adapting to SW and HSW in the presence of DDT over longer exposure periods.

## 5. Conclusion

Physiology has to be considered when dealing with DDT contamination in fish. The gills are a major osmoregulatory organ and they constitute one of the main targets for waterborne DDT contamination. Our results suggest that in freshwater, DDT seems to have an effect on the structure of the gill epithelium, which might affect gill associated functions. During the switch from hyper- to hypo-osmoregulation, involving the differentiation of ion excreting MRCs, a significant NKA activity inhibition by DDT appears to affect the tilapia hypo-osmoregulatory mechanisms only to a low extent. In natural habitats, tilapias are exposed to highly fluctuating salinities, which requires constant switching between hypo- and hyper-osmoregulation. Overall, *S. melanotheron* seems very resistant to waterborne DDT contamination in conserving its ability to efficiently switch to hypo-osmoregulation; however, the decreased NKA activity and the alteration of gills show that osmoregulation is not as efficient. Although the exposure time might not be sufficient to observe severe ion imbalance linked to DDT, we bring clear evidence that the pesticide affects the gill multi-functionality at all salinities examined. Respiration, osmoregulation, acid–base regulation and toxicant depuration might consequently be impaired over time.

## Acknowledgements

We acknowledge the AEO team for technical help as well as the Montpellier RIO Imaging platform for technical support and access to instrumentation. This work was supported by a french INSU-EC2CO grant (ECLIPSE).

## References

- Albaret, J.J., 1987. Les peuplements de poissons de la Casamance (Sénégal) en période de sécheresse. *Rev. Hydrobiol. Trop.* 20, 291–310.
- Albert, L.A., 1996. Persistent pesticides in Mexico. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 147, 1–38.
- Avit, J.B.L.F., Pédia, P.L., Sankaré, Y., 1999. Diversité Biologique de la Côte d'Ivoire – Rapport de synthèse – Ministère de l'Environnement et de la Forêt, Côte d'Ivoire.
- Bouvy, M., Briand, E., M' Boup, M., Got, P., Leboulanger, C., Bettarel, Y., Arfi, R., 2008. Effects of sewage discharges on microbial components in tropical coastal waters (Senegal, West Africa). *Mar. Freshwater Res.* 59, 614–626.
- Brauner, C.J., Matey, V., Zhang, W., Richards, J.G., Dhillion, R., Cao, Z.-D., Wang, Y., Fu, S.-J., 2011. Gill remodeling in crucian carp during sustained exercise and the  $\delta$ -effect on subsequent swimming performance. *Physiol. Biochem. Zool.* 84 (6), 535–542.
- Davis, P.W., Wedemeyer, G.A., 1971.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -activated-ATPase inhibition in rainbow trout: a site for organochlorine pesticide toxicity? *Comp. Biochem. Physiol.* B 40, 823–827.
- Evans, D.H., 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R704–R713.
- Evans, D.H., Claiborne, J.B., 2009. Osmotic and ionic regulation in fishes. In: Evans, D.H. (Ed.), *Osmotic and ionic regulation. : Cells and Animals*. CRC Press, Boca Raton, pp. 295–366.
- Fernandes, M.N., Perna-Martins, S.A., 2002. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish, *Hypostomus tietyensis* (Loricariidae). *Acta Zool.* 83, 321–328.
- Flik, G., Wendelaar Bonga, S.E., Fenwick, J.C., 1983.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes. I. Identification of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated ATPase activities with non-specific phosphatase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* B 76, 745–754.
- Forrest Jr., J.N., Cohen, A.D., Schon, D.A., Epstein, F.H., 1973. Na transport and Na-K-ATPase in gills during adaptation to sea water: effects of cortisol. *Am. J. Physiol.* 224, 709–713.
- Goanvec, C., Poirier, E., Le-Floch, S., Theron, M., 2011. Branchial structure and hydromineral equilibrium in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to heavy fuel oil. *Fish Physiol Biochem* 37, 363–371.
- Hawkes, J.W., 1977. The effects of petroleum hydrocarbon exposure on the structure of fish tissues. In: Wolfe, D.A. (Ed.), *Fate and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Ecosystems and Organisms*. Pergamon Press, N.Y, pp. 115–128.
- Ilan, Z., Yaron, Z., 1983. Interference of  $\text{p}$ ,  $\text{p}$ -DDD with interrenal function and cortisol metabolism in *Sarotherodon aureus* (Steindachner). *J. Fish Biol.* 22, 657–669.
- Janicki, R.H., Kinter, W.B., 1971. DDT inhibits  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in the intestinal mucosae and gills of marine teleosts. *Nature* 233, 148.
- Kammerer, B.D., Kütz, D., 2009. Prolonged apoptosis in mitochondria-rich cells of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposed to elevated salinity. *J. Comp. Physiol. B* 179, 535–542.
- Kinter, W.B., Merckens, L.S., Janicki, R.H., Guarino, A.M., 1972. Studies on the mechanism of toxicity of DDT and polychlorinated biphenyls (PCBs): disruption of osmoregulation in marine fish. *Environ. Health Persp.* 1, 169–173.
- Kirschner, L.B., 1978. External charged layer and  $\text{Na}^+$  regulation. In: Barker Jorgensen, C., Skadhauge, E. (Eds.), *Osmotic and volume regulation*. Alfred Benzon Symposium XI. Academic Press, New York.
- Kitamura, S., Yoshida, M., Sugihara, K., Ohta, S., 1999. Reductive dechlorination of *p,p'*-DDT mediated by hemoproteins in the hepatopancreas and blood of goldfish, *Carassius auratus*. *J. Health Sci* 45, 217–221.
- Kwong, R.W.M., Yu, P.K.N., Lam, P.K.S., Wang, W.-X., 2008. Uptake, elimination, and biotransformation of aqueous and dietary DDT in marine fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (10), 2053–2063.
- Lande, M.B., Donovan, J.M., Zeidel, M.L., 1995. The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *J. Gen. Physiol.* 106 (1), 67–84.
- Leadem, T.P., Campbell, R.D., Johnson, D.W., 1974. Osmoregulatory responses to DDT and varying salinities in *Salmo gairdneri*. I. Gill Na-K-ATPase. *Comp. Biochem. Physiol.* A 49, 197–205.
- Ledy, K., Giamberini, L., Pihan, J.C., 2003. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium-containing stream water. *Dis. Aquat. Org.* 56 (3), 235–240.
- Lemarié, G., Baroiller, J.F., Clota, F., Lazard, J., Dosdat, A., 2004. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*. *Aquaculture* 240, 575–587.
- Lingwood, D., Harauz, G., Ballantyne, J.S., 2005. Regulation of fish gill  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase by selective sulfatide enriched raft partitioning during seawater adaptation. *J. Biol. Chem.* 280, 36545–36550.
- Manirakiza, P., Akinbamijo, O., Covaci, A., Pitozco, R., Schepens, P., 2003. Assessment of organochlorine pesticide residues in West African city farms: Banjul and Dakar case study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 171–179.
- Matey, V., Richards, J.G., Wang, Y., Wood, C.M., Rogers, J., Davies, R., Murray, B.W., Chen, X.-Q., Du, J., Brauner, C.J., 2008. The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*. *J. Exp. Biol.* 211, 1063–1074.
- Mitrovic, D., Perry, S.F., 2009. The effects of thermally induced gill remodeling on ionocyte distribution and branchial chloride fluxes in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Exp. Biol.* 212, 843–852.
- Müller, A., Björklund, E., Von Holst, C., 2001. On-line clean-up of pressurized liquid extracts for the determination of polychlorinated biphenyls in feedstuffs and food matrices using gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 925, 197–205.
- Murty, A.S., 1986. *Toxicity of Pesticides to Fish*, Vols 1 and 2. CRC, Boca Raton, FL, USA.
- Niang-Diop, I., Dansokho, M., Ibrahima, L.Y., Niang, S., 2002. Senegal national report phase 1 : integrated problem analysis. GEF MSP Sub-Saharan Africa Project (GF/6010-0016): "Development and Protection of the Coastal and Marine Environment in Sub-Saharan Africa".
- Okoumassoun, L.-E., Brochu, C., Deblois, C., Akponan, S., Marion, M., Averill-Bates, D., Denizeau, F., 2002. Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Ouémé River in Republic of Benin. *Sci. Total Environ.* 299, 163–172.
- Ondarza, P.M., Gonzalez, M., Fillmann, G., Miglioranza, K.S., 2011. Polybrominated diphenyl ethers and organochlorine compound levels in brown trout (*Salmo trutta*) from Andean Patagonia, Argentina. *Chemosphere* 83 (11), 1597–1602.
- Ouattara, N.G., Bodinier, C., Nègre-Sadargues, G., D'Cotta, H., Messad, S., Charmantier, G., Panfili, J., Baroiller, J.-F., 2009. Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. *Aquaculture* 290, 155–164.
- Panfili, J., Thior, D., Ecoutin, J.-M., Ndiaye, P., Albaret, J.J., 2006. Influence of salinity on the size at maturity for fish species reproducing in contrasting West African estuaries. *J. Fish Biol.* 69, 95–113.
- Saravana Bhavan, P., Geraldine, P., 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquat. Toxicol.* 50, 331–339.
- Scott, G.L., Fulton, M.H., Moore, D.W., 1990. Agricultural insecticide runoff effects on estuarine organisms: correlating laboratory and field toxicity testing with ecotoxicological biomonitoring. U.S. National Marine Fisheries Service, Southeast Fisheries Science Center, Charleston Laboratory, Charleston, SC, Report #CR813138-01-1.
- Singh, A., Munshi, J.S.D., 1996. Scanning electron microscopic evaluation of the effects of short and long term exposure of copper and mercury on the gills of *Channa punctata* (Bloch). *J. Freshw. Biol.* 8, 51–53.
- Sollid, J., Weber, R.E., Nilsson, G.E., 2005. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. *J. Exp. Biol.* 208, 1109–1116.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernande, M.F., Olea, N., Serrano, F.O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogen: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103, 113–122.
- Sucrè, E., Charmantier-Daures, M., Grousset, E., Charmantier, G., Cucchi-Mouillot, P., 2010. Embryonic occurrence of ionocytes in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Cell. Tissue Res.* 339, 543–550.
- Tapie, N., Budzinski, H., Le Ménach, K., 2008. Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2169–2177.

- Thompson, S., Budzinski, H., 1999. Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 76, 49–60.
- Tine, M., de Lorgetil, J., Panfili, J., Diop, K., Bonhomme, F., Durand, J.-D., 2007. Growth hormone and Prolactin-1 gene transcription in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* acclimatised to different salinities. *Comp. Biochem. Physiol. B* 147, 541–549.
- Tine, M., Bonhomme, F., McKenzie, D.J., Durand, J.-D., 2010. Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimatised to a range of environmental salinities. *BMC Ecol.* 10, 11.
- Tine, M., McKenzie, D.J., Bonhomme, F., Durand, J.-D., 2011. Salinity-related variation in gene expression in wild populations of the black-chinned tilapia from various West African coastal marine, estuarine and freshwater habitats. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 91 (1), 102–109.
- Tzaneva, V., Bailey, S., Perry, S.F., 2011. The interactive effects of hypoxemia, hyperoxia, and temperature on the gill morphology of goldfish (*Carassius auratus*). *Am. J. Physiol.* 300, 1344–1351.
- UNEP/FAO/WHO, 1989. Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues. World Health Organization, Geneva, p. 24.
- Walsh, A.H., Ribelin, W.E., 1975. The pathology of pesticide poisoning. In: Ribelin, W.E., Migaki, G. (Eds.), *Pathology of Fishes*. Univ. Wis. Press, Madison, pp. 515–557.
- Wedemeyer, G., 1968. Role of intestinal microflora in the degradation of DDT by rainbow trout: (*Salmo gairdneri*). *Life Sci.* 7, 219–223.
- Wolff, D., Bull, R., 1982. Modification of ion transport in lipid bilayer membranes by the insecticides DDT and DDE. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 688, 138–144.
- Yarbrough, J.D., Chambers, J.E., 1979. The Disposition and Biotransformation of Organochlorine Insecticides in Insecticide-Resistant and -Susceptible Mosquitofish. In: Khan, M.A.Q., Lech, J.J., Menn, J.J. (Eds.), *Pesticide and Xenobiotic Metabolism in Aquatic Organisms*. ACS Symposium Series Vol. 99, Washington DC, pp. 145–159.

## Variabilité saisonnière de l'activité $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase

La  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (NKA), l'une des plus importantes enzymes qui participe à la régulation d'échange d'ions au niveau des branchies, est considérée comme un biomarqueur très sensible de l'osmorégulation (Cf. Chapitre 1.3.1.2. Osmorégulation). Elle est en générale induite lors de l'acclimatation des poissons dans des milieux salés et plusieurs travaux ont montré une corrélation positive entre l'activité NKA et la salinité (D'Cotta et al., 2000 ; Lorin-Nebel et al., 2012). Dans le cadre de la thèse, l'objectif a été d'appréhender les effets de la variation saisonnière des variations de salinité en milieu naturel sur l'activité NKA au niveau des branchies de *S. melanotheron*. Trois populations de *S. melanotheron* vivants dans des milieux caractérisé par différents niveaux de salinité (Lac de Guiers, eau douce ; Baie de Hann, eau de mer et Kaolack, eau hypersalée dans l'estuaire du Saloum) ont été échantillonnées durant les deux saisons caractéristiques (saison sèche et saison des pluies).

Une différence significative ( $P < 0,05$ ) de l'activité NKA a été observée durant la saison sèche entre les différents sites (Figure 26). Le même profil de réponse a été observé durant la saison des pluies, mais les différences observées entre les sites n'étaient pas significatives. L'activité la plus faible est mesurée pour les tilapias pêchés au Lac de Guiers, aussi bien durant la saison des pluies ( $0^0/_{00}$ ) que pendant la saison sèche ( $0^0/_{00}$ ). Durant la saison des pluies, cette activité est 2 fois plus élevée chez les tilapias échantillonnés au niveau du Baie de Hann et 3 fois au niveau de Kaolack. Durant la saison sèche la salinité est la plus élevée au niveau du site de Kaolack et c'est à cet endroit que la NKA est la plus marquée. Les résultats obtenus durant la saison sèche sont en accord à ceux obtenus pour la même espèce sur ces différents sites par Lorin-Nebel et al. (2012). La variation saisonnière est significative au niveau de la Baie de Hann et de Kaolack où on note une fluctuation de la salinité entre les deux saisons.

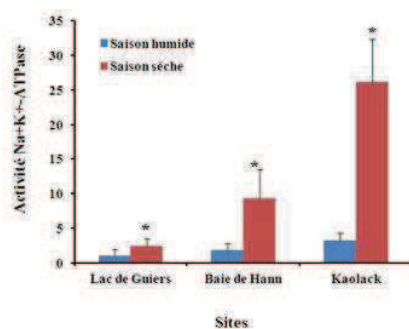


Figure 26 : Variation saisonnière de l'activité NKA chez des tilapias collectés dans différents sites.

La corrélation positive entre l'activité NKA et la salinité est très marquée, et la variation saisonnière de l'activité probablement due à la baisse de la salinité durant la saison des pluies. La salinité est 3 fois plus élevée durant la saison sèche que pendant la saison des pluies (95 vs. 32) au niveau de la station de Kaolack dans l'estuaire du Saloum. L'influence de l'augmentation de la salinité sur la réponse de la NKA est donc clairement démontrée. La NKA est donc un biomarqueur sensible aux variations de la salinité environnementale.

**Chapitre 6 : Différenciation des populations  
de *Sarotherodon melanotheron*  
à partir de la forme des otolithes  
et de la structure génétique**





## **Chapitre 6 : Différenciation des populations de *Sarotherodon melanotheron* à partir de la forme des otolithes et de la structure génétique**

### **Synthèse du manuscrit 4**

Ce chapitre avait pour objectif d'une part de connaître la structuration génétique des populations de *S. melanotherodon* dans la zone d'étude et d'autre part de voir si la diversité génétique peut justifier les différences morphométriques des otolithes. Les indices de formes et les descripteurs de Fourier elliptiques ont permis d'étudier la variabilité morphométrique des otolithes. Les résultats des analyses morphométriques montrent qu'une meilleure discrimination est observée en tenant compte de la distance géographique. Cette variabilité peut être induite par plusieurs facteurs environnementaux, mais aussi génétiques. Afin d'appréhender le lien entre les différences morphométriques des otolithes et la structure génétique des *S. melanotheron*, la discrimination des populations a été faite en tenant compte des mêmes conditions (salinité, géographie, etc).

L'analyse combinée de la variabilité génétique et de la forme des otolithes chez le tilapia, *S. melanotheron* dans différents environnements côtiers au Sénégal et en Gambie a permis la discrimination de différentes unités populationnelles. Les résultats montrent la présence de 5 pools génétiques. Les pools observés au Nord, dans le Saloum et la Gambie semblent traduire l'histoire de la colonisation post glaciaires des environnements littoraux du Sénégal. Alors que ceux observés au niveau des Niayes pourraient être la résultante d'évènements démographiques qui auraient affecté ces populations très isolées. Cependant, l'ensemble de ces résultats ont montré l'intérêt d'utiliser plusieurs outils pour une meilleure discrimination des populations.



Chapitre 6. Différentiation des populations de *Sarotherodon melanotheron* à partir de la forme des otolithes et de la structure génétique

**Manuscrit 4. Otolith shape and genetics diversity of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* in Senegalese ecosystems, en préparation**



**Otolith shape and genetics diversity of the black chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* in Senegalese ecosystems**

(Article en préparation)

**Ndiaye A\*., Panfili J<sup>†</sup>, Berrebi P<sup>‡</sup>, Laporte M<sup>‡</sup>., Sanchez W<sup>§</sup>., Durand J.-D\*.**

\*IRD, UMR 5119 ECOSYM, Université Montpellier 2, place Eugène Bataillon, CC 093, 34095 Montpellier Cedex 5, France, <sup>†</sup>IRD, UMR 5119 ECOSYM, LABEP-AO, B.P. 1386, 18524 Dakar, Sénégal, <sup>‡</sup>ISEM, UMR 5554 UM2-CNRS-IRD, Université Montpellier II, CC065. Place E. Bataillon, 34095 Montpellier, Cedex 5, France, <sup>§</sup>INERIS, DRC, Unité d'écotoxicologie BP 2, 60550 Verneuil en Halatte, France

**Abstract**

The euryhaline fish *Sarotherodon melanotheron* is a good model to study population structure in contrasted environment. This study investigated the population structure of the species using morphologic and genetic analysis. Shape indices coming from otoliths (ear stones) including form factor, circularity, ellipticity, rectangularity and roundness, and Fourier descriptors were compared between individuals living in different ecosystems. Canonical discriminant analysis showed a discrimination of *S. melanotheron* populations collected in different salinities and different geographical areas. Microsatellite data were used for characterizing genetic diversity. The combination of otolith shape and genetic structure gave information on population differentiation. Differences observed in otolith shape may be caused by geographical distance and environmental changes. Spatial assignment revealed five genetically distinct clusters. Results showed absence lack of correspondence between the geographical location inferred by otolith shapes and the pattern of genetic variations. The most significant divergence came from small water reservoirs (niayes) in the Cap Vert peninsula in Dakar where the population differentiation was most likely due to the small population size and geographical and physical isolation of the Niaye's populations.

Keywords: Otolith shape analysis, genetic structure, *Sarotherodon melanotheron*.

## 1. Introduction

The black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Ruppell, 1852) is one of the most abundant endemic tilapiine species in lagoons, estuaries and other water bodies in West Africa (Falk et al., 1999). *S. melanotheron* shows large geographical distribution in Africa (Faunce, 2000). This euryhaline species is able to survive in salinity up to 130 (Panfili et al., 2004) and is able to withstand saltier environments by limiting its growth, reducing the size-at-maturity, and changing its fecundity, the most profound changes being only visible in hypersaline conditions (Panfili et al., 2004). This species present a strong genetic structuration with inbreeding (it is a mouth brooder) appearing to explain the high observed significant heterozygote deficiencies between populations from different lagoons (Pouyaud et al., 1999). Allozyme studies on *S. melanotheron* populations of the western range in West Africa indicated a pronounced geographical cline in allelic frequencies of three enzyme coding loci (Falk et al., 1999). Agnès et al. (2009) observed high genetic differentiation among locations in Ivory coast and Gambia. Nevertheless different external stressors such as habitat degradation, fishing and effects of climate change could affect fish population in West African ecosystems. For example, fishing pressure has been shown to reduce genetic diversity.

Otoliths (fish ear stones) are easy to collect and most routinely used for age estimation, whereas their shapes are used for population discrimination (Campana and Casselman, 1993). Variation in otolith shape is also a tool used to distinguish different fish species (Lord et al., 2012). Most recent studies used otolith shapes to discriminate different fish populations and different ecotypes (Morat et al., 2012; Radhakrishnan et al., 2012). Both genetic and environmental influences play a substantial role in determining the shape of the otolith (Vignon and Morat, 2010). However Campana et Casselman (1993) show that the observed otolith shape differences were more a function of the environment than the genetics. Environmental factors (such as temperature) can also produce otolith shape variation in the absence of genetic differences (Simoneau et al., 2000; Cardinale et al., 2004). The combined use of morphometric variables (size and shape) and external outlines (shape analysis through Fourier series) showed the importance of otolith morphology study for intraspecific discrimination (Pothin et al., 2006).

Microsatellites are codominant molecular genetic markers, which are ubiquitously distributed within the genome and characterized by a relatively small size and a high level of

polymorphism (Chistiakov et al., 2006). Intense selection on isolated populations can cause loss of genetic diversity, which if persistent, reduces adaptive potential and increases extinction probability (McMillan et al., 2006). Microsatellite markers have been used to assess the genetic structure of a variety of fishes (Duftner et al., 2006; Menezes et al., 2008). The most often inferred reasons for different levels of divergence among different genetic markers include stochastic variation among loci in amount of genetic drift, and natural selection acting on some loci (Kristoffersen et al, 2008). Populations that have experienced a severe reduction in size will display a reduction in both allele numbers and gene diversity (heterozygosity), but allelic loss will occur more rapidly than loss of heterozygosity (Knaepkens et al., 2004).

The aim of this study was to analyze the structure of *Sarotherodon melanotheron* populations in highly contrasted environments in Senegal using both otolith shape and microsatellite markers, and to evaluate the potential of otolith shape as an indicator for population discrimination. First we evaluated if the salinity, the environment and the geographical location influenced shape and genetics structure. Second, we investigated the existence of links between the patterns of otolith shapes and genetics structure.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Study area**

Sampling sites (Figure 1) were located in Senegal with a salinity gradient ranging between 0 and 102. Two freshwater sites (Guiers and Niayes 2), three sites corresponding to seawater (St Louis, Hann and Niayes 1) and four estuarine sites (Missira, Koular, Foundiougne and Kaolack) were sampled during the dry season in Senegal (May and June 2009). Nine natural populations of *S. melanotheron* from Senegalese ecosystems were then sampled. The origin of the population, the number of individuals and the characteristics of each site are summarized in Table 1. A total of 20 to 30 wild individuals was collected in each site. Following sampling and for all fish, a piece of fin was dissected and stored in ethanol until DNA extraction and otoliths (sagittae) were extracted, cleaned in distilled water, dried and stored in referenced microtube vials.

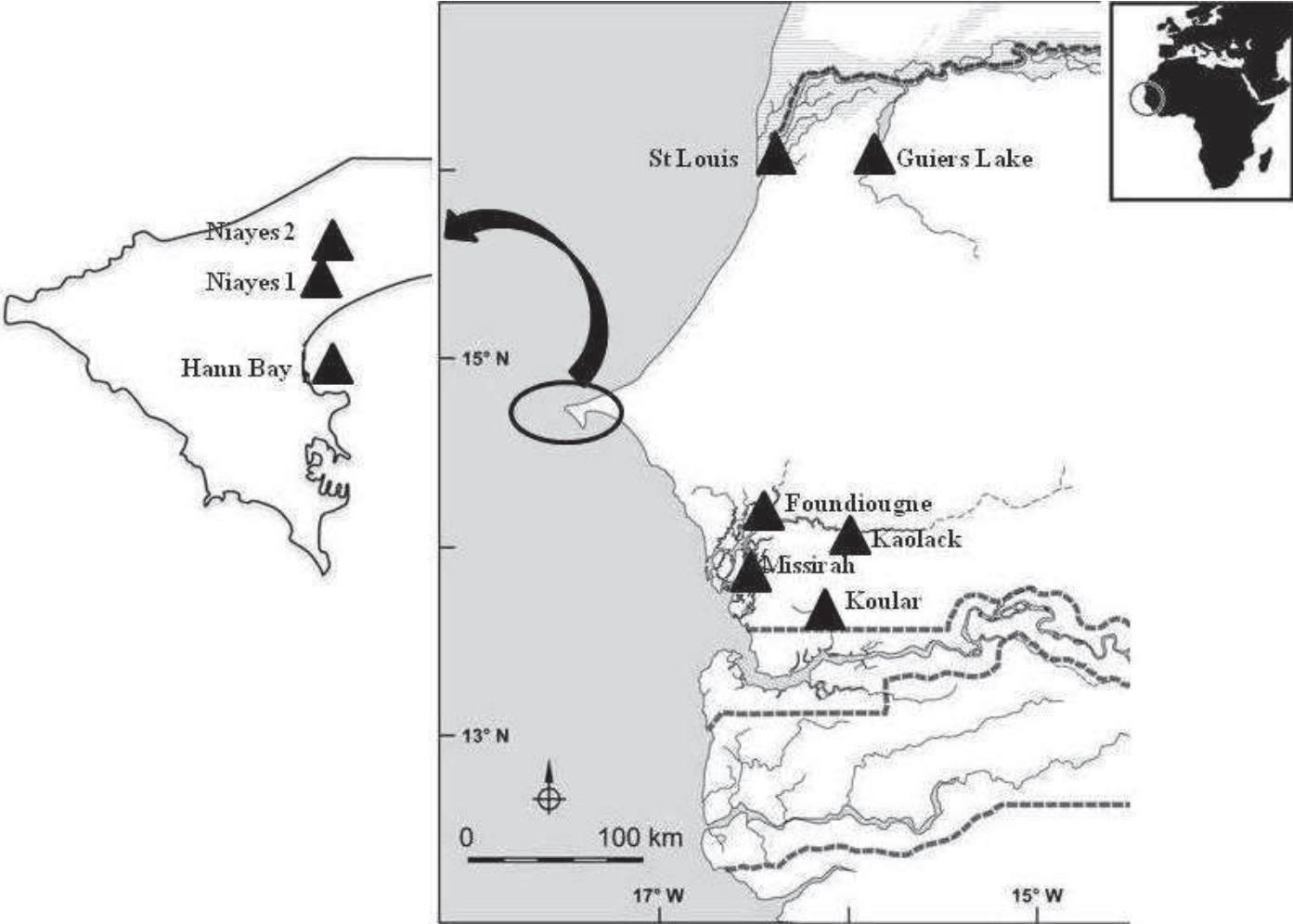


Figure 1: Map of sampling sites.



**Table 1: Sampling locations abbreviation, ecosystem and number of sample.**  
**FL fork length mean for each population, A number of alleles observed for each population, observed (Ho), expected (He) heterozygosity, Fis inbreeding coefficient and related P-values (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01 and \*\*\* P < 0.001)**

Abb.	Location	Ecosystem	Date	Salinity	N	FL	A	He	Ho	Fis
<b>KE</b>	Kaolack, Saloum	Estuary	May 2009	102	30	175 ± 12	8.67	0.620 ± 0.324	0.500 ± 0.256	0.143***
<b>FE</b>	Foudiougne, Saloum	Estuary	May 2009	51.4	29	133 ± 14	8.83	0.646 ± 0.325	0.546 ± 0.305	0.117
<b>ME</b>	Missirah, Saloum	Estuary	May 2009	39.3	30	170 ± 25	9.17	0.645 ± 0.331	0.456 ± 0.362	0.190***
<b>KUE</b>	Koular, Gambia	Estuary	May 2009	34.1	30	146 ± 23	7.67	0.554 ± 0.304	0.467 0.305	0.109
<b>BHE</b>	Hann Bay, Dakar	Bay	May 2009	34.7	30	134 ± 6	8.17	0.646 ± 0.322	0.472 ± 0.323	0.214***
<b>N1E</b>	Niayes 1, Dakar	Pond	May 2009	58.6	20	129 ± 19	1.83	0.328 ± 0.263	0.225 ± 0.186	0.287
<b>N2E</b>	Niayes 2, Dakar	Pond	May 2009	2.7	30	136 ± 17	3.00	0.347 ± 0.314	0.222 ± 0.188	0.191
<b>STL</b>	St Louis, Senegal River	Estuary	June 2009	27	20	147 ± 29	6.00	0.568 ± 0.311	0.483 ± 0.344	0.191***
<b>LGU</b>	Guiers Lake, Senegal River	Lake	June 2009	2	30	180 ± 12	8.67	0.604 ± 0.254	0.533 ± 0.281	0.099

## 2.2. Otolith shapes analysis

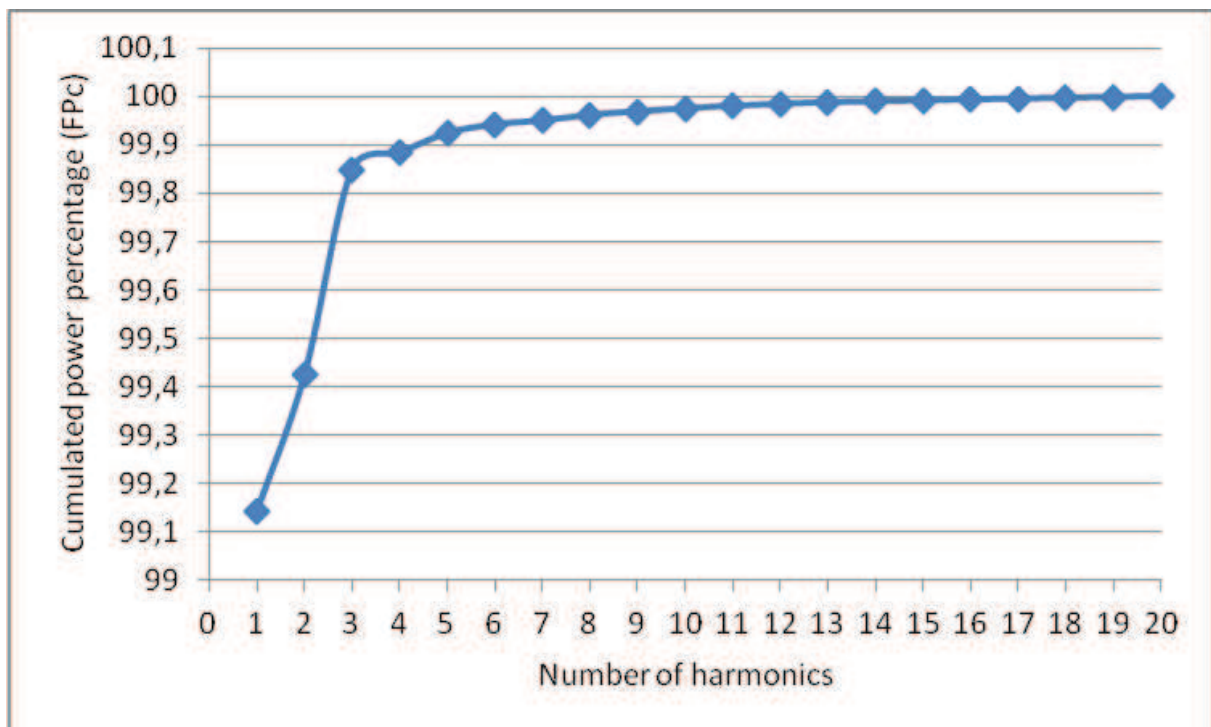
Otoliths were used for shape indices' calculation. Image of otoliths were recorded with the TNPC software (Visilog, Noesis, France), under a stereomicroscope using reflected light against a dark background, the otolith being immersed in 95° alcohol. Shape analysis was performed on the left otolith of each individual.

We described otolith shape variations between the different Senegalese ecosystems using shape indices and elliptical Fourier shape descriptors. The digital image were analyzed and size variables, including Area (A), perimeter (P), Feret width (FW) and Feret length (FL) were measured using the free software Image J. Different combinations of these size parameters were used to obtain shape indices according to Tuset et al. (2003b). Otolith shape indices, including form factor, circularity, ellipticity, rectangularity and roundness were calculated (Table 2) (Tuset et al., 2003b). Circularity and roundness give information on the similarity of various features to a perfect circle. Rectangularity describes the variations of length and width with respect to the area. Form-factor allows estimating the surface area irregularity and ellipticity indicates if the changes in the area are proportional. Kolmogorov-Smirnov normality test and Leven's test were used to verify normality and homogeneity of variance of shape indices. Significant differences between sampling locations were examined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by ad hoc comparisons (Ducan's test).

Elliptic Fourier descriptors were used to assess the shape of each otolith image according to Kuhl et al. (1982). Elliptical Fourier analysis was performed with the Shape software 1.2 in order to calculate the Fourier coefficients. The Fourier power (FP) spectrum was estimated: the Fourier power of a harmonic is proportional to its amplitude and provides a measure of the amount of "shape information" described by this harmonic (Morat et al., 2012). The sufficient and necessary number of harmonics was calculated following Crampton et al. (1995). Subsample of 32 otoliths was randomly selected and examined for this purpose. The Fourier analysis indicated that the first 15 harmonics represented 99.99 % of the cumulated power and the black chinned tilapia otolith shape could be summarized by 15 harmonics (Figure 2). Each harmonic was characterized by 4 coefficients. After the examination of several otoliths from different sites, a Canonical Discriminant Analysis (CDA) was carried out with 56 Fourier coefficients to determine spatial variation of otolith shape. Coefficients of the first harmonic were not used according to Crampton et al. (1995).

**Table 2: Otolith shape indices used in this study.**

Size parameters	Shape indices
Area (A)	Circularity = $P^2/A$
Perimeter (P)	Rectangularity = $A/(FL*FW)$
Feret weight (FW)	Form-factor = $(4\pi A)/P^2$
Feret length (FL)	Roundness = $(4A)/(\pi FL^2)$
	Ellipticity = $(FL-FW)/(FL+FW)$



**Figure 2: The mean cumulated power percentage of Fourier power variation.**

### **2.3. Microsatellite genotyping**

Each sample (fin section) was washed with distilled water to remove ethanol and was digested by proteinase K and the total DNA was extracted with phenol-chloroform extraction protocol (Sambrook et al., 1989). The reaction mixture contained 250  $\mu$ l of extraction buffer (1 M TRIS pH 8, 10 % SDS and 0.5 M EDTA) and 20  $\mu$ l of proteinase K was added to the sample and incubated at 55°C for 2 hours. DNA was extracted with 270  $\mu$ l of phenol/chloroform (phenol, isoamidic acid and Chloroform) and collected after centrifugation. DNA contained in supernatant fraction was precipitated in 1 volume of 100 % ethanol and incubated at -20°C for 1 hour. After incubation the DNA was centrifuged and washed twice with 70 % ethanol.

Primer sets for 6 published black chinned tilapia microsatellite loci were used (Pouyaud et al., 1999; Carleton et al., 2002; Agnès et al., 2009) and their forward primers were labeled with a fluorescent dye (6-FAM, CY3 or Tamra). The amplification of microsatellite was carried out with the modified PCR protocol (Agnès et al., 2009). PCR amplification was performed in a reaction volume of 50  $\mu$ l. The PCR reaction mixture contained 1 $\mu$ l total DNA from the sample, TAq DNA polymerase buffer (Promega), dNTP, BSA, mM MgCl<sub>2</sub> and 10pmol of each primer and ultra pure water quality. PCR amplification was carried out on three steps and performed on a Peltier Thermal Cycler (PTC-200). The following PCR conditions were used: an first step at initial denaturation phase at 94°C for 2 min, followed by second step 30 cycles with a denaturation phase at 91 °C for 30 s, an annealing phase at 55 °C for 30 s and an extension phase at 72 °C for 30 s and final step at final extension phase at 72 °C for 10 min.

After PCR, qualities of amplified PCR products were controlled by 1% agarose gel. They were diluted to the appropriate concentration with equal volume of formamide and denatured at 95°C in 5 min. Fragments were run in denaturing 8% polyacrylamide gel electrophoreses at V, mA and W for 50 min. Scanner FMBIO fluorescent imaging system (HITACHI) was used to estimated different alleles sizes.

Microsatellites analysis with MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) was performed to check genotyping errors and adjust allele frequency. Test for significant deviation from Hardy Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibria were performed using GENEPOP. Number of alleles (Na), observed heterozygosity (Ho), expected

heterozygosity ( $H_e$ ) and fixation index ( $F_{is}$ ) were estimated using GENETIX version 4.03 (Belkhir et al., 2004) for each population. The degree of genetic structuring of populations was measured by  $F_{st}$ -values. AMOVA analysis considering ecological structure, salinity, biogeography as sources of variation was assessed by ARLEQUIN package. A spatial assignment test performed in TESS was used to determine the number of genetically distinct *S. melanotheron* populations. MCMC algorithms were run for a length of 50,000 sweeps with burn-in periods of 40,000 sweeps. For each data set and each model, we ran the algorithm 100 times, retained the 20 runs with the best DICs, and averaged admixture estimates using CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007), with admixture model = CAR and  $K_s = 5$ .

### **3. Result**

#### **3.1. Shape analysis**

Otolith shape indices were used to discriminate study sites. The ANOVA results showed that only ellipticity did not change between sites but that all other otolith shape indices exhibited significant differences among sites (Table 3). For all parameters no significant difference was found along in the Niayes. No significant differences were measured for all parameters except rectangularity measured at different sites in Saloum estuary. The results for each variable showed a pattern of strong differentiation between sites.

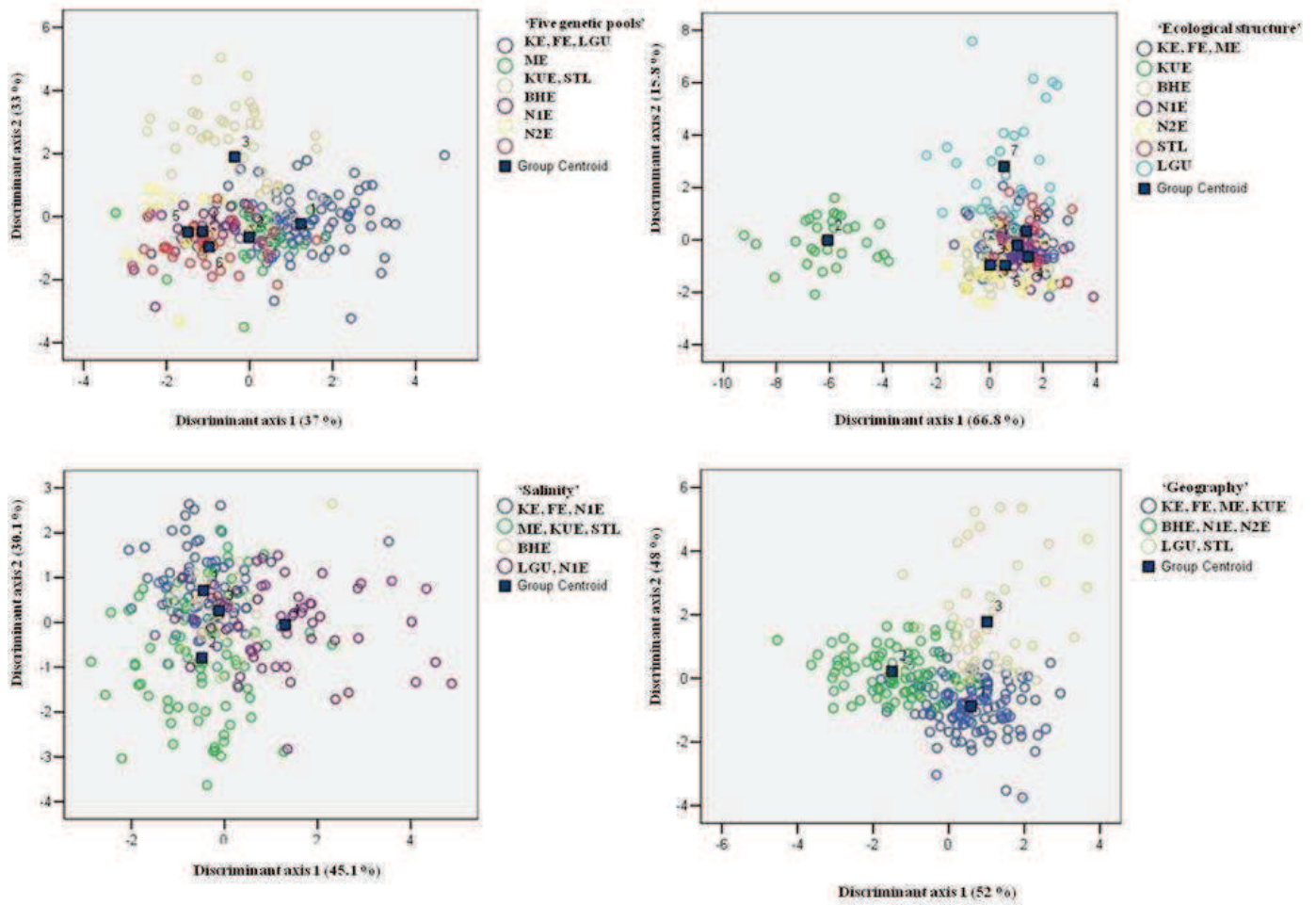
The CDA showed a distinction of different groups (Figure 3). The first two discriminant functions represented most of the variation among ‘five genetic pools structure’ and accounted for 70% of variance and separated one group (Figure 3). Results show a clear distinction of populations from St Louis and Koular with those from other sites. When considering the ‘Ecological structure’ (estuary vs. bay vs. pond vs. lake), individuals could be discriminated. The two first canonical axes explained 82% of the variance and discriminated different groups (Figure 3). Individuals from Koular were clearly separated to those from others sites.

The first two discriminant functions represented most of the variation among ‘salinity’ and accounted for 75% of the variance and individuals were gathered into three groups linked to the ‘geographical structure’ ranging from North to South (Figure 3). Nevertheless results showed no clear distinction between these groups. When considering geographical structure, individual could be discriminated into three groups. The two first canonical axes explained

100% of the variance and separated individuals into three groups linked to geographical structure (Figure 3). There was a clear distinction of the Dakar's population from those of the Northern part of Senegal.

**Table 3: Result of Shape indices between different locations tested by one-way ANOVA followed by ad hoc comparisons. Means with the same letter are not significantly different ( $P>0.05$ )**

	Mean $\pm$ SD	p value
Guiers Lake	0.202 $\pm$ 0.120e	0.000
Niayes2	0.400 $\pm$ 0.070a	
St Louis	0.299 $\pm$ 0.106bd	
Hann Bay	0.360 $\pm$ 0.027b	
Missirah	0.356 $\pm$ 0.109b	
Foundiougne	0.290 $\pm$ 0.093bc	
Niayes1	0.394 $\pm$ 0.096a	
Kaolack	0.334 $\pm$ 0.072ab	
Koular	0.261 $\pm$ 0.040cde	
Guiers Lake	0.322 $\pm$ 0.029a	0.000
Niayes2	0.419 $\pm$ 0.060cd	
St Louis	0.317 $\pm$ 0.068a	
Hann Bay	0.381 $\pm$ 0.033bd	
Missirah	0.392 $\pm$ 0.063cd	
Foundiougne	0.329 $\pm$ 0.051a	
Niayes1	0.428 $\pm$ 0.053c	
Kaolack	0.352 $\pm$ 0.051ab	
Koular	0.339 $\pm$ 0.030a	
Guiers Lake	0.202 $\pm$ 0.120c	0.000
Niayes2	0.400 $\pm$ 0.070b	
St Louis	0.299 $\pm$ 0.106a	
Hann Bay	0.360 $\pm$ 0.027ab	
Missirah	0.356 $\pm$ 0.109ab	
Foundiougne	0.290 $\pm$ 0.093a	
Niayes1	0.393 $\pm$ 0.096b	
Kaolack	0.336 $\pm$ 0.071ab	
Koular	0.308 $\pm$ 0.088a	
Guiers Lake	0.764 $\pm$ 0.208a	0.000
Niayes2	0.787 $\pm$ 0.062a	
St Louis	0.808 $\pm$ 0.108a	
Hann Bay	0.758 $\pm$ 0.084a	
Missirah	0.751 $\pm$ 0.053a	
Foundiougne	0.720 $\pm$ 0.082a	
Niayes1	0.735 $\pm$ 0.082a	
Kaolack	0.760 $\pm$ 0.148a	
Koular	0.115 $\pm$ 0.013b	
Guiers Lake	0.270 $\pm$ 0.084a	0.055
Niayes2	0.248 $\pm$ 0.020a	
St Louis	0.241 $\pm$ 0.025a	
Hann Bay	0.261 $\pm$ 0.034a	
Missirah	0.256 $\pm$ 0.018a	
Foundiougne	0.257 $\pm$ 0.020a	
Niayes1	0.267 $\pm$ 0.031a	
Kaolack	0.246 $\pm$ 0.025a	
Koular	0.244 $\pm$ 0.020a	



**Figure 3: Result of Canonical Discriminant Analysis (CDA) investigating otolith shape differences with the explained variability.**

### 3.2. Microsatellites genotyping

All pairwise values were statistically significant and showed significant differentiation with  $p < 0.001$ . Compared to other sampling sites, population from the Niayes' systems exhibited a high  $F_{st}$  value (Table 4).  $F_{ST}$  values for microsatellites showed little differentiation between populations from the Saloum estuary (Kaolack versus Foundiougne: 0.023; Kaolack versus Missirah: 0.05 and Foundiougne versus Missirah: 0.04). Contrary to the Saloum estuary, the greatest genetic differentiation was observed between the Niayes' populations (Niayes 1 versus Missirah: 0.447). Differences among groups ( $\phi_{ct}$ ) were significant when the groups were separated by "Ecological structure". A difference among populations within group ( $\phi_{sc}$ ) was also significant. When the "Five gene pools" were considered, both  $\phi_{ct}$  and  $\phi_{sc}$  were significant. Differences among groups ( $\phi_{ct}$ ) were not

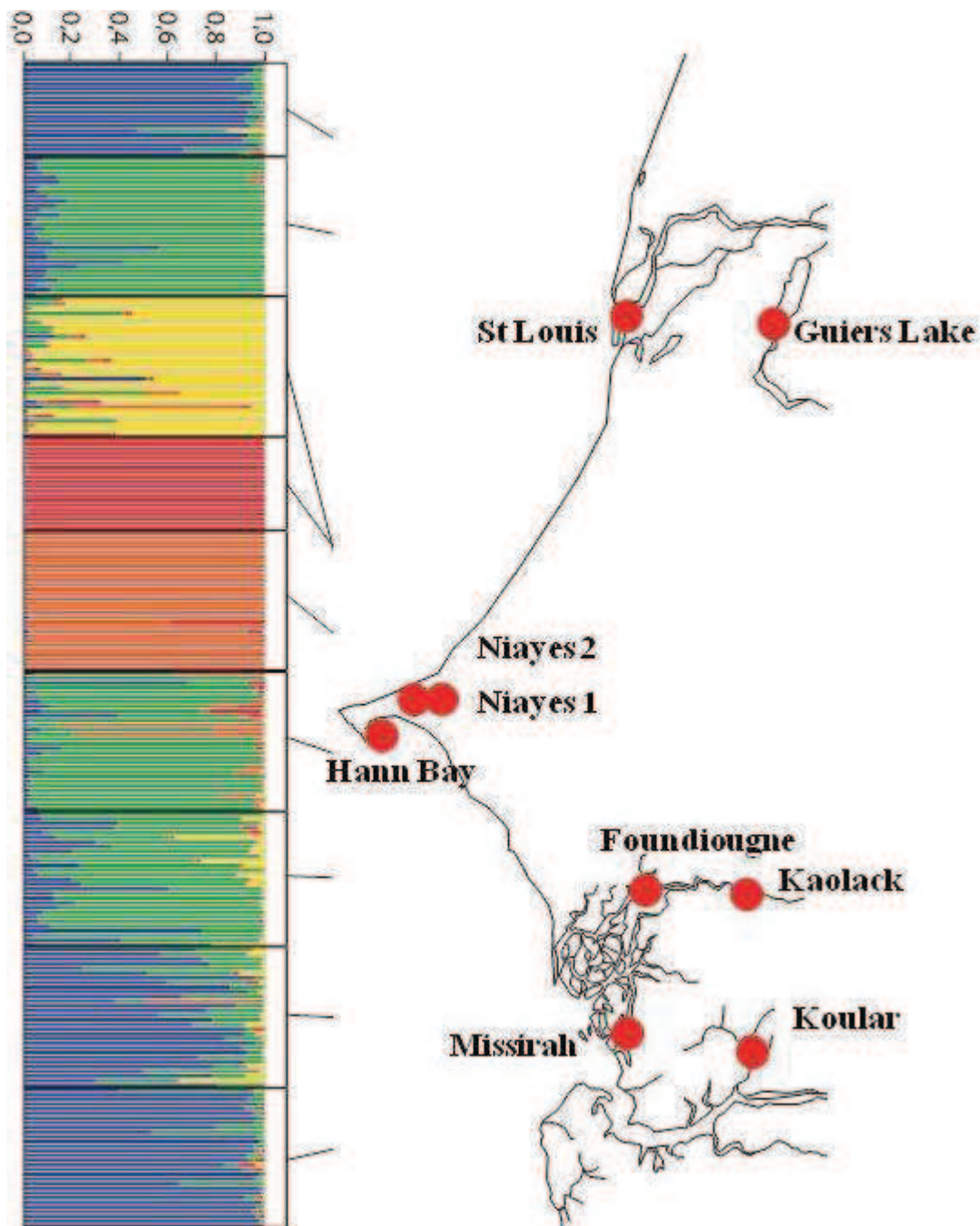


significant when the groups were separated by “Salinity”. When the “Geographical structure” was considered, both  $\phi_{ct}$  was not significant.

Tess clustering results showed five populations for the whole sample (Figure 4). The first two clusters corresponded to the estuary populations (Saloum and Gambia) and the Northern population. Hann Bay, Niayes 1 and Niayes 2 showed significant isolation and correspond to three distinct clusters. Nevertheless the five clusters distinguished with the TESS analysis were not in accordance with the classification using geographical repartition, salinity and ecosystems.

**Table 4: *Fst* values observed for all intraspecific pair wise comparisons (Theta de Weir et cockerham)**

	<b>FE</b>	<b>ME</b>	<b>KUE</b>	<b>BHE</b>	<b>N1E</b>	<b>N2E</b>	<b>STL</b>	<b>LGU</b>
<b>KE</b>	0.02274**	0.05007***	0.09376***	0.05904***	0.27393***	0.19329***	0.08856***	0.03456***
<b>FE</b>		0.04093***	0.10235***	0.04936***	0.27663***	0.23838***	0.08344***	0.03696***
<b>ME</b>			0.04183***	0.06574***	0.27721***	0.23403***	0.04427**	0.05336***
<b>KUE</b>				0.14472***	0.27588***	0.29280***	0.02049*	0.10632***
<b>BHE</b>					0.26375***	0.26804***	0.11954***	0.05973***
<b>N1E</b>						0.44726***	0.32074***	0.29605***
<b>N2E</b>							0.29949***	0.24047***
<b>LGU</b>								0.09647***



*Figure 4: Cluster analysis of *S. melanothron* population structure using TESS software and their geographical representation across Senegalese ecosystems. Bar plots represents individuals and colors indicate different genetic clusters.*

#### 4. Discussion

In the present study otolith shape indices showed a clear discrimination between sites. Radhakrishnan et al. (2012) found also differences in all *Coilia ectenes* shape indices between sites in Yangtze Basin in China. Differences in otolith shape can be influenced by recent feeding history (Gagliano and McCormick, 2004). Tuset et al. (2003a) indicated that the otolith shape indices were mainly under genetic control and could be used as natural tags for identifying and separating species in tropical fish species. However, both environmental (i.e. salinity) or genetic factors (i.e. heterozygosity) had no clear effect on otolith fluctuating asymmetry on otolith variables for *S. melanotheron* (Panfili et al., 2005). The advantage of shape descriptors is that they can be used to interpret biologically the morphological changes of otoliths (Tuset et al., 2006). CDA performed on Fourier descriptors showed a clear discrimination in different *S. melanotheron* groups: it revealed three distinct clusters corresponding to three geographical groups. For the species *Coilia ectenes* in the Yangtze Basin (China), CDA on otolith shape data revealed three distinct clusters of individuals representing anadromous, land-locked and freshwater-resident ecotypes (Radhakrishnan et al., 2012). Simoneau et al. (2000) suggested that the genotype can affect otolith shapes. Bolles et al. (2000) suggest that differences in otolith shape in silver hake (*Merluccius bilinearis*) may be caused by temperature in different geographical latitudes. The present study tended to show that the otolith shape analysis was suitable for discriminating geographical differences for *S. melanotheron* but the main factor involved into the shape differentiation could not be highlighted.

The present results showed that *S. melanotheron* populations (sampled in different sites) were genetically different from each other, with different levels of genetic structures. It is in accordance with the behavior of this species indicating that it does not migrate and move in its environment (Diouf et al., 2006). Populations located in the Saloum estuary showed genetic differences according to according to Fst. Estuaries and lagoons are discrete habitats separated by physical and/or ecophysiological barriers that prevent or limit gene flows of estuarine species (Durand et al., 2005). Influences of isolation by distance, gradients of landscape resistance, and true barriers can cause substructuring of individuals in natural populations (Cushman et al., 2006). Genetic drift, inbreeding, and the bottleneck effect can also cause genetic variability.

Our results showed that Hann Bay, Niayes 1 and Niayes 2 were the most genetically distinct populations. Niayes 1 and Niayes 2 are fully geographically isolated populations located around Dakar in small size reservoirs. This geographic isolation conducted Niayes 1 and Niayes 2 to reach two different and isolated genetic pools. In the Niayes, populations are extremely reduced with also strong fishing pressures compared to others populations. High genetic differences between Niayes 1 and Niayes 2 may reflect the presence of bottleneck due to the small size of populations. The same genetic pool present in the Saloum and Gambia are also found in the Northern Senegal. These two genetic pools are then not related to geographical isolation. These results may reflect the past connection between the populations from Saloum and Gambia estuaries, and that from the North. Successive isolation of *S. melanotheron* populations may have been favored by the Pleistocene period: Falk et al. (2003) suggested that rapid population contractions and population expansions during the glacial and interglacial may Pleistocene have consequently contributed to the dispersion of *S. melanotheron*.

Genetic difference between populations did not explain the variation in otolith shapes. The absence of correspondence between the patterns of morphological (otolith shape) and genetic variations suggested the occurrence of a reaction norm in the morphological adaptation of shell shapes to different local environmental conditions (Costa et al., 2008). Difference in otolith shape in our study can most likely be related to geographical isolation or environmental condition than to genetic differences. These results indicated that otolith shape analysis could be able to provide a better discrimination of the different geographical groups.

Further investigations are needed to assess the impact of chemical stress on *S. melanotheron* populations using allozyme markers and otolith shapes analysis for each genetic pool.

## References

- Agnès, J.-F., Adépo-Gourène, B. & Nyingi, D. (2009). Functional microsatellite and possible selective sweep in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Teleostei, Cichlidae). *Marine Genomics* **1**, 103-107.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufast, N. & Bonhomme, F. (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. In *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II*, Montpellier, France.
- Bolles, K. L. & Begg, G. A. (2000). Distinctions between silver hake (*Merluccius bilinearis*) stocks in U.S. waters of the northwest Atlantic based on whole otolith morphometric. *Fisheries Bulletin* **98**, 451-462.
- Campana, S. E. & Casselman, J. M. (1993). Stock Discrimination Using Otolith Shape Analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 1062-1083.
- Cardinale, M., Doering-Arjes, P., Kastowsky, M. & Mosegaard, H. (2004). *Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (Gadus morhua) otoliths*. Ottawa, Canada: National Research Council of Canada.
- Carleton, K. L., Streebman, J. T., Lee, B. Y., Gamhart, N., Kidd, M. & Kocher, T. D. (2002). Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal Genetics* **33**, 140-144.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B. & Volckaert, F. A. M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* **255**, 1-29.
- Costa, C., Aguzzi, J., Menesatti, P., Antonucci, F., Rimatori, V. & Mattoccia, M. (2008). Shape analysis of different populations of clams in relation to their geographical structure. *Journal of Zoology* **276**, 71-80.
- Crampton, J. S. (1995). Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia* **28**, 179-186.
- Cushman, S. A., McKelvey, K. S., Hayden, J. & Schwartz, M. K. (2006). Gene flow in complex landscapes: Testing multiple hypotheses with causal modeling. *Am. Naturalist* **168**, 486-499.
- Duftner, N., Sefc, K. M., Koblmüller, S., Nevado, B., Verheyen, E., Phiri, H. & Sturmbauer, C. (2006). Distinct population structure in a phenotypically homogeneous rockdwelling cichlid fish from lake Tanganyika. *Molecular Ecology* **15**, 2381-2395.
- Durand, J. D., Tine, M., Panfili, J., Thiaw, O. T. & Laë, R. (2005). Impact of glaciations and geographic distance on the genetic structure of a tropical estuarine fish, *Ethmalosa fimbriata* (Clupeidae, S. Bowdich, 1825). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**, 277-287.
- Falk, T. M., Abban, E. K. & Villwock, W. (1999). Population genetic analysis of the haemoglobins of the black-chinned tilapia. *Journal of Fish Biology* **55**, 233-242.
- Falk, T. M., Teugels, G. G., Abban, E. K., Villwock, W. & Renwranz, L. (2003). Phylogeographic patterns in populations of the black-chinned tilapia complex (Teleostei, Cichlidae) from coastal areas in West Africa: support for the refuge zone theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **27**, 81-92.
- Faunce, C. H. (2000). Reproduction of blackchin tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, within an impounded mangrove ecosystem in east-central Florida. *Environmental Biology of Fishes* **57**, 353-361.
- Gagliano, M. & McCormick, M. I. (2004). Feeding history influences otolith shape in tropical fish. *Marine Ecology Progress Series* **278**, 291-296.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806.
- Knaepkens, G., Bervoets, L., Verheyen, E. & Eens, M. (2004). Relationship between population size and genetic diversity in endangered populations of the European bullhead (*Cottus gobio*): implications for conservation. *Biological Conservation* **115**, 403-410.
- Kuhl, F. P. & Giardina, C. R. (1982). Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing* **18**, 236-258.

Lord, C., Morat, F., Lecomte-Finiger, R. & Keith, P. (2012). Otolith shape analysis for three *Sicyopterus*; (Teleostei: Gobioidae: Sicydiinae) species from New Caledonia and Vanuatu. *Environmental Biology of Fishes* **93**, 209-222.

McMillan, A., Bagley, M., Jackson, S. & Nacci, D. (2006). Genetic diversity and structure of an estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) indigenous to sites associated with a highly contaminated urban harbor. *Ecotoxicology* **15**, 539-548.

Menezes, M. R., Noguchi, D., Nakajima, M. & Taniguchi, N. (2008). Microsatellite development and survey of genetic variation in skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*. *Journal of Fish Biology* **73**, 463-473.

Morat, F., Letourneur, Y., Nérini, D., Banaru, D. & Batjakas, I. E. (2012). Discrimination of red mullet populations (Teleostean, Mullidae) along multi-spatial and ontogenetic scales within the Mediterranean basin on the basis of otolith shape analysis. *Aquatic Living Resources* **25**, 27-39.

Panfili, J., Durand, J., Diop, K., Gouréne, B. & Simier, M. (2005). Fluctuating asymmetry in fish otoliths and heterozygosity in stressful estuarine environments (West Africa). *Marine and Freshwater Research* **56**, 505-516.

Panfili, J., Mbow, A., Durand, J. D., Diop, K., Diouf, K., Thior, D., Ndiaye, P. & Lae, R. (2004). Influence of salinity on the life-history traits of the West African black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*): Comparison between the Gambia and Saloum estuaries. *Aquatic Living Resources* **17**, 65-74.

Pothin, K., Gonzalez-Salas, C., Chabanet, P. & Lecomte-Finiger, R. (2006). Distinction between *Mulloidichthys flavolineatus* juveniles from Reunion Island and Mauritius Island (south-west Indian Ocean) based on otolith morphometrics. *Journal of Fish Biology* **69**, 38-53.

Pouyaud, Desmarais, Chenuil, Agnese & Bonhomme (1999). Kin cohesiveness and possible inbreeding in the mouthbrooding tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Pisces Cichlidae). *Molecular Ecology* **8**, 803-812.

Radhakrishnan, K. V., Li, Y., Jayalakshmy, K. V., Liu, M., Murphy, B. R. & Xie, S. (2012). Application of otolith shape analysis in identifying different ecotypes of *Coilia ectenes* in the Yangtze Basin, China. *Fisheries Research* **125-126**, 156-160.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T., eds. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York.

Simoneau, M., Casselman, J. M. & Fortin, J. (2000). *Determining the effect of negative allometry (length/height relationship) on variation in otolith shape in lake trout (Salvelinus namaycush), using fourier-series analysis*. Ottawa, Canada: National Research Council of Canada.

Tuset, V. M., Lombarte, A., González, J. A., Pertusa, J. F. & Lorente, M. (2003a). Comparative morphology of the sagittal otolith in *Serranus* spp. *Journal of Fish Biology* **63**, 1491-1504.

Tuset, V. M., Lozano, I. J., González, J. A., Pertusa, J. F. & García-Díaz, M. M. (2003b). Shape indices to identify regional differences in otolith morphology of comber, *Serranus cabrilla* (L., 1758). *Journal of Applied Ichthyology* **19**, 88-93.

Tuset, V. M., Rosin, P. L. & Lombarte, A. (2006). Sagittal otolith shape used in the identification of fishes of the genus *Serranus*. *Fisheries Research* **81**, 316-325.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.

Vignon, M. & Morat, F. (2010). Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish. *Marine Ecology Progress Series* **411**, 231-241.



## **Conclusion et perspectives**





## Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'impact des effets croisés (contaminants chimiques et salinité) sur le tilapia *Sarotherodon melanotheron*. Pour atteindre cet objectif, une approche multi-paramétrique à différents niveaux d'organisation biologique a été mise en place et a permis d'appréhender le potentiel de ce tilapia comme espèce sentinelle dans l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques. Des indicateurs physiologiques (taux de croissance, facteur de condition) et une batterie de biomarqueurs en lien avec l'osmorégulation (NKA), le métabolisme des xénobiotiques (EROD et GST), la protection vis-à-vis du stress (TBARS), la transmission de l'influx nerveux (AChE) et la reproduction (VTG et histopathologie des gonades) ont été mesurés. La réponse de ces marqueurs a été complétée avec des études de la diversité génétique et des variations morphométriques des otolithes des différentes populations. L'ensemble des résultats obtenus participe à une meilleure compréhension des réponses des biomarqueurs du tilapia face au stress environnemental et à ses capacités d'adaptation. Cette étude a permis d'évaluer le statut d'« espèce sentinelle » utilisable pour la surveillance des milieux aquatiques au Sénégal, ou dans d'autres pays, dans un contexte de changement climatique et entrainé dans le cadre du projet EC2CO ECLIPSE 2010-2011 (CNRS INSU, Ecosphère Continentale et Côtière, « Effets du changement climatique et de la pollution au Sénégal chez un poisson estuarien, le tilapia, *Sarotherodon melanotheron* », coordinateur J.D. Durand). Une synthèse des résultats est donnée ci-après ainsi que des perspectives de futures recherches.

### Réponse des biomarqueurs du tilapia

Le modèle « tilapia » a été utilisé pour évaluer l'impact de la contamination des milieux aquatiques en utilisant certains biomarqueurs. Les effets des polluants aux niveaux inférieurs de l'organisation biologique (par exemple réponses moléculaires et biochimiques) sont précoces et peuvent constituer un signal d'alarme d'effets toxicologiques au niveau supérieur sur des populations (Clements, 2000). Les profils de réponses des biomarqueurs *in situ* ont été différents en fonction des sites d'étude (Chapitre 3). L'induction de l'activité EROD sur le site de la Baie de Hann était en adéquation avec les pressions environnementales au niveau de ce site (polluants HAP).

Peu de variations ont été observées pour l'activité GST, l'activité AChE et les TBARS. Les résultats obtenus ont montré que ces biomarqueurs ne reflètent pas les différents niveaux de contaminants présents dans les sites. L'interprétation de ces résultats est difficile car plusieurs facteurs biotiques et abiotiques doivent être pris en compte. L'ensemble des biomarqueurs a cependant permis une discrimination des sites échantillonnés. En parallèle les résultats ont montré une induction de l'activité NKA corrélée avec les différents niveaux de salinité (Chapitre 5) et une faible induction de la VTG (Chapitre 4). Les variables environnementales telles que la salinité, la température et l'hypoxie sont très fluctuantes au niveau des estuaires et peuvent aussi influencer les réponses biologiques (Mouneyrac et al., 2010). Au final les activités EROD et NKA ont représenté les biomarqueurs les plus discriminants dans cette étude pour l'évaluation des effets de certains contaminants et l'adaptation à la salinité respectivement.

### **Influence de la salinité**

Les variations de salinité au niveau des estuaires peuvent affecter la croissance et le développement de nombreuses espèces de poissons (Boeuf & Payan, 2001). Dans le présent travail l'impact potentiel de la variation de la salinité sur toutes les réponses des biomarqueurs a été évalué. Aucune relation claire n'a été trouvée entre les réponses des biomarqueurs (EROD, GST, AChE, TBARS et VTG) et la salinité à l'exception de l'activité NKA qui semble être corrélée avec la variation de la salinité. Les valeurs les plus basses des indicateurs de traits de vie (taux de croissance et facteur de condition) ont été observées au niveau des sites caractérisés par une salinité très élevée, même si statistiquement non significatives par rapport aux autres milieux. Les faibles valeurs observées dans les sites hypersalés sont en accord avec les résultats précédents sur cette espèce dans ces environnements (Panfili et al., 2004).

Le tilapia, comme un grand nombre d'espèces de poissons euryhalins, possède de remarquables capacités d'adaptation et peut survivre dans des environnements présentant des salinités extrêmes, jusqu'à 134 dans le Saloum (Panfili et al., 2006). Les échantillonnages sur le terrain durant la présente étude ont permis de mettre en évidence une induction de l'activité NKA chez des tilapias vivant à différentes salinités (Chapitre 5). Cette activité est 1,7 et 10 fois plus induite chez les tilapias collectés sur les sites de la Baie de Hann et de Kaolack au Sénégal en comparaison à l'activité mesurée chez les tilapias du Lac de Guiers (Chapitre 5).

Des résultats similaires ont été observés chez des tilapias collectés sur ces mêmes sites l'année précédant les échantillonnages de ce travail de thèse (Lorin-Nebel et al., 2012), confortant ainsi les niveaux d'induction, mais avec une variabilité interannuelle (valeurs plus élevées dans le présent travail). L'induction de l'activité NKA avec l'augmentation de la salinité est liée avec l'augmentation du nombre de cellules MRC et la modification de la surface basolatérale des branchies (Lavery & Skadhauge, 2012). Ces résultats ont montré la sensibilité de la NKA du *S. melanotheron* face au challenge osmotique (Chapitre 5). Ils sont en accord avec ceux obtenus chez la même espèce par Tine et al. (2012) en milieu contrôlé avec une expression de la NKA 4 fois plus induite en eau hypersalée qu'en eau douce.

### **Influence de la saisonnalité**

Au Sénégal, le climat est caractérisé par l'alternance de deux saisons, une sèche de novembre à juin et une pluvieuse de juillet à octobre. La salinité est très variable d'une saison à une autre dans les écosystèmes aquatiques de cette zone, et particulièrement dans l'estuaire du Saloum où les eaux de pluies constituent le seul apport d'eau douce (Trape et al., 2009). Les réponses des biomarqueurs, à l'exception du GST et des TBARS, ont été variables en fonction des saisons, cette variabilité pouvant s'expliquer par les variations des niveaux de contaminations liées à une certaine saisonnalité, et/ou par la variation saisonnière de la salinité, qui diminue par dilution lors de la saison des pluies. En effet la caractérisation chimique des sédiments des sites a montré une différence significative de leur contamination entre les deux saisons. Pour la majorité des contaminants analysés, leurs valeurs étaient plus élevées durant la saison sèche, probablement dues à des dilutions lors de la saison des pluies. Les variabilités saisonnières de la contamination chimique des sédiments étaient en adéquation avec celles observées au niveau des biomarqueurs. Les fluctuations de salinité et de contaminants durant la saison des pluies peuvent rendre difficile l'interprétation de la réponse des biomarqueurs. Les fortes variabilités des niveaux d'expression des gènes en lien avec l'adaptation de *S. melanotheron* aux variations de la salinité durant la saison des pluies semblent être dues aux variations soudaines et imprévisibles de la salinité durant cette saison (Tine et al., 2011). La saison sèche est donc plus indiquée pour tester les réponses des biomarqueurs du tilapia au Sénégal.

## **Caractérisation des réponses des marqueurs en lien avec l'osmorégulation en milieu contrôlé**

L'adaptation à la variation de salinité peut perturber les processus d'osmorégulation et l'énergie allouée aux traits biologiques chez les tilapias adaptés aux conditions hypersalées (Panfili et al., 2004). Pour caractériser la réponse du tilapia face à une fluctuation de la salinité les branchies ont été utilisées car elles constituent le lieu principal de pénétration des contaminants circulants. Des expériences en laboratoire ont permis d'approfondir les résultats observés au cours des recherches préliminaires *in situ* avec des tilapias exposés à différents niveaux de salinité et de contamination (Chapitre 5). *In situ*, l'activité NKA était significativement induite en eau de mer et en eau hypersalée comparée à l'eau douce (Chapitre 5). Ces résultats obtenus en milieu contrôlé confirment ceux obtenus *in situ*. Cependant l'ajout de DDT a entraîné une inhibition de l'activité NKA chez les tilapias présents dans les bacs contenant de l'eau douce, mais aussi ceux en eau de mer exposés au DDT, indiquant que le DDT a eu un impact sur l'adaptation du tilapia à la salinité. Dans une autre étude issue de la littérature, l'exposition à des composés présents dans l'environnement aquatique tels que les nonylphénol a également entraîné une inhibition de l'activité NKA chez le Saumon atlantique (*Salmo salar*) (Robertson & McCormick, 2012). L'ensemble de ces résultats ont montré la capacité d'adaptation du *S. melanotheron* exposé à différents stress, et que la mesure de l'activité NKA était un indicateur sensible aux stress osmotique et chimique.

## **Discrimination des différentes populations de tilapias**

L'analyse combinée de la variabilité génétique chez le tilapia *S. melanotheron* dans différents environnements côtiers au Sénégal et en Gambie a permis une discrimination de différentes unités populationnelles. La variabilité morphométrique des otolithes a permis de caractériser les différentes zones géographiques. Les populations du nord sont différentes de celles de Dakar, qui sont-elles mêmes différentes de celles du Saloum et de la Gambie (Chapitre 6). La variation morphométrique des otolithes, susceptible d'être influencé par la salinité des milieux, a été mise en lien avec la distance géographique (De Vries et al., 2002). Il existe en particulier une différence entre les populations collectées en eau dulçaquicole, salée et hypersalée (Chapitre 6). Cependant la relation entre la variabilité morphométrique des otolithes et les différentes salinités des sites a été moins marquée que celle due à la distance

géographique. Ce n'était pas le cas pour expliquer l'hétérogénéité génétique observée entre les populations (Cf. ci-après). La forme des otolithes ne reflèterait donc pas un degré d'isolement génétique, mais plutôt un isolement géographique, car les réponses au niveau d'un changement de forme des otolithes peuvent être plus rapides que celles au niveau génétique.

Etonnamment, les populations du nord sont génétiquement plus proches de celles du Saloum et de la Gambie, que de celles de Dakar. La forte hétérogénéité génétique observée entre les populations situées sur la péninsule du Cap Vert, et ce malgré une forte proximité géographique (quelques dizaines de mètres entre les 2 niayes échantillonnés), résulterait des petites tailles de ces populations. En effet, la dérive génétique et les effets de goulots d'étranglement lors de crash démographiques seraient d'autant plus importants que la taille efficace des populations est petite. Or l'environnement physique hébergeant les populations des niayes étant particulièrement restreinte, la taille de leurs populations est nécessairement beaucoup plus limitée que celles trouvées dans des milieux plus ouverts comme les estuaires du Saloum, de la Gambie et du fleuve Sénégal. En revanche, les populations situées plus au nord ou plus au sud auraient des tailles efficaces plus importantes, limitant les effets de la dérive génétique. Cependant, il a été révélé par une méthode d'assignation (TESS) la co-existence de deux pools géniques dans les échantillons du sud et du nord du Sénégal. L'existence de ces deux pools géniques aussi bien au Sénégal qu'en Gambie suggèrent une recolonisation des milieux littoraux sénégalais à partir de deux origines ou de deux refuges glaciaires. Selon Falk et al. (2003), les estuaires de la basse Guinée auraient constitué une zone refuge pour les espèces estuariennes pendant les glaciations du Pléistocène.

La dégradation des milieux de vie via des pressions environnementales d'origine naturelle ou anthropique peut entraîner des variations de la forme des otolithes. L'adaptation des organismes à un environnement peut être physiologique (au niveau des individus avec des changements biochimiques) ou génétique (au niveau des populations avec la structure génétique) (Meyer & Di Giulio, 2003). La contamination environnementale peut aussi affecter la structure génétique des populations avec une perte de la diversité génétique (Guttman, 1994). En favorisant des génotypes plus tolérants et en causant des goulots d'étranglements démographiques, l'exposition à des contaminants peut entraîner des modifications de la composition génétique d'une population (Van Straalen & Timmermans, 2002). Les conséquences de l'exposition à des concentrations élevées de métaux sont dépendantes de

l'intensité et de la durée de l'exposition mais aussi de la diversité génétique de la population (Bourret et al., 2008). Les relations entre la structure génétique d'une population et les niveaux de contamination doivent être prises en considération dans l'évaluation de l'impact des contaminations au niveau des populations.

## Perspectives

Trois perspectives pourraient être dégagées de cette thèse : 1) caractériser en condition contrôlée la sensibilité des biomarqueurs utilisés, 2) établir une relation entre la réponse des biomarqueurs (biochimiques et physiologiques) et les modifications du comportement (performance à la nage), et 3) estimer l'état énergétique de *S. melanotheron* dans un contexte multi-stress. En complément à ces analyses les niveaux de contaminations au niveau des tissus du *S. melanotheron* pourraient être mesurés et mis en relation avec la réponse des biomarqueurs. Ces données pourraient permettre de valider les outils utilisés dans le présent travail et de confirmer le potentiel de *S. melanotheron* comme espèce sentinelle.

Les biomarqueurs qui sont des indicateurs précoces des effets des contaminants environnementaux, peuvent également avoir une pertinence écologique s'ils sont mis en lien avec les effets observables à des niveaux plus élevés d'organisation biologique (Artigas et al., 2012). Des travaux complémentaires seraient donc nécessaires pour étudier les relations entre les indicateurs précoces (biomarqueurs), les indicateurs qui reflètent la fitness individuelle (croissance, fertilité, gènotoxicité des gamètes et indice de condition), le comportement, pour à terme prédire les effets sur les populations. Une autre perspective de ce travail serait **d'étudier la relation entre le comportement des individus et la réponse des biomarqueurs chez le tilapia**. Comme les processus métaboliques et les fonctions individuelles requièrent de l'énergie, la mesure de l'état des réserves énergétiques et du taux métabolique ont une grande importance dans l'évaluation des modifications des performances individuelles (Baird et al., 2007). L'état des réserves énergétiques peut influencer les performances individuelles des poissons (Jonsson & Hansen, 1997). L'exposition de poissons à différents contaminants peut donc entraîner une modification de leurs performances (Vieira et al., 2009). Par exemple, McKenzie et al. (2007) ont montré une baisse des performances de nage chez des chevaines (*Leuciscus cephalus*) exposés à des métaux et à des polluants organiques. Bien que la capacité des organismes à métaboliser les xénobiotiques contribue à une nette augmentation de leur santé, elle peut avoir des conséquences négatives sur les coûts

énergétiques (Bains & Kennedy, 2004). Pour faire face au stress chimique, les modifications des stratégies d'allocation d'énergie peuvent entraîner une baisse des performances de nage des poissons (Vieira et al., 2009). L'énergie allouée à la protection de l'organisme face aux pressions environnementales peuvent entraîner une réduction de l'énergie disponible pour les autres fonctions (e.g. reproduction, croissance et accumulation d'énergie dans les muscles) (Marchand et al., 2004). La réduction des performances de nage peut entraîner une réduction de leur capacité à capturer les proies, une perturbation de leur capacité d'évitement des prédateurs et même avoir une interférence sur le comportement social et reproducteur (Vieira et al., 2009). Une autre perspective serait donc d'**estimer l'état énergétique des tilapias face au stress environnemental** en étudiant l'état des réserves énergétiques (protéines, lipides et glucogène) et l'énergie allouée au niveau cellulaire qui prend en compte les réserves d'énergie et l'énergie consommée. L'impact du stress chimique sur l'énergie physiologique peut se refléter sur la santé des organismes exposés (Adams & Greeley, 2000). Smolders et al. (2004) ont montré que la mesure du budget énergétique au niveau cellulaire est très sensible au stress environnemental et pouvait être corrélé à des perturbations observables à des niveaux supérieurs d'organisation biologique.

Les contaminants tendent à s'accumuler dans les tissus des poissons (Tapie et al., 2011; Thomas et al., 2012). L'accumulation des composés organiques au niveau des tissus est corrélée avec l'induction de l'activité EROD (Winter et al., 2005). Comme les poissons accumulent les polluants dans leurs tissus directement à travers l'eau via leurs branchies et leur peau, mais aussi par leurs régimes trophiques (Roche et al., 2009), une des perspective de ces travaux serait d'étudier l'effets des contaminants sur les branchies du tilapia. Une autre perspective serait de prendre en compte l'aspect sanitaire. Le tilapia est l'une des principales sources de protéines des populations humaines locales, donc l'étude de la contamination de la chair des tilapias s'intègre dans l'évaluation du risque pour la santé humaine.



## **Références bibliographiques**



## Références bibliographiques

- Adams, S.M. (Ed.), 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress, Bethesda, Maryland.
- Adams, S.M., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. *Marine Pollution Bulletin* 51, 649-657.
- Adams, S.M., Greeley, M.S., 2000. Ecotoxicological Indicators of Water Quality: Using Multi-response Indicators to Assess the Health of Aquatic Ecosystems. *Water, Air, & Soil Pollution* 123, 103-115.
- Adepo-Gourène, B., Pouyaud, L., Teugels, G.G., Hansens, M.M., 1998. Morphological and genetic differentiation of West African populations of *Sarotherodon melanotheron* Rüppell, 1852 (Teleostei, Cichlidae). In: Agnèse, J.-F. (Ed.). Genetics and Aquaculture in Africa. ORSTOM, Paris, pp. 189-198.
- Agnèse, J.-F., Adépo-Gourène, B., Nyingi, D., 2009. Functional microsatellite and possible selective sweep in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Teleostei, Cichlidae). *Marine Genomics* 1, 103-107.
- Agrahari, S., Gopal, K., 2008. Inhibition of Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. *Pest. Biochem. Physiol.* 92, 57-60.
- Agüera, A., Brophy, D., 2011. Use of sagittal otolith shape analysis to discriminate Northeast Atlantic and Western Mediterranean stocks of Atlantic saury, *Scorpaenopsis scorpaenoides* (Walbaum). *Fisheries Research* 110, 465-471.
- Alam, M., Frankel, T.L., 2006. Gill ATPase activities of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and golden perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): Effects of environmental salt and ammonia. *Aquaculture* 251, 118-133.
- Albaret, J.J., 1987. Les peuplements de poissons de la Casamance (Sénégal) en période de sécheresse. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale* 20, 291-310.
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International* 27, 673-679.
- Almeida, J.R., Oliveira, C., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. *Ecotoxicology* 19, 1369-1381.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A., Forlin, L., 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 73, 171-180.
- Amara, R., Meziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., Laffargue, P., 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series* 351, 201-208.
- Arinc, E., Sen, A., Bozcaarmutlu, A., 2000. Cytochrome P4501A and associated mixed-function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. Pure and applied chemistry, Research Triangle Park, NC, ETATS-UNIS.
- Artigas, J., Arts, G., Babut, M., Caracciolo, A.B., Charles, S., Chaumot, A., Combourieu, B., Dahllöf, I., Despréaux, D., Ferrari, B., Friberg, N., Garric, J., Geffard, O., Gourlay-Francé, C., Hein, M., Hjorth, M., Krauss, M., De Lange, H.J., Lahr, J., Lehtonen, K.K., Lettieri, T., Liess, M., Lofts, S., Mayer, P., Morin, S., Paschke, A., Svendsen, C., Usseglio-Polatera, P., van den Brink, N., Vindimian, E., Williams, R., 2012. Towards a renewed research agenda in ecotoxicology. *Environ. Pollut.* 160, 201-206.
- Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T., Goksøyr, A., 2000. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 49, 159-170.

## Références bibliographiques

- Arukwe, A., Förlin, L., Goksøyr, A., 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2576-2583.
- Ayoade, A.A., Ikulala, A.O.O., 2007. Length weight relationship, condition factor and stomach contents of *Hemichromis bimaculatus*, *Sarotherodon melanotheron* and *Chromidotilapia guentheri* (Perciformes: Cichlidae) in Eleiyele Lake, Southwestern Nigeria. Universidad de Costa Rica, San Jose, COSTA RICA.
- Babin, M., Casado, S., Chana, A., Herradin, B., Segner, H., Tarazona, J.V., Navas, J.M., 2005. Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative Prochloraz in a rainbow trout cell line. *Toxicology in Vitro* 19, 899-902.
- Bains, O.S., Kennedy, C.J., 2004. Energetic costs of pyrene metabolism in isolated hepatocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 67, 217-226.
- Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R., Scott, G.I., 2007. In situ-based effects measures: Determining the ecological relevance of measured responses. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3, 259-267.
- Baklouti, M., Chevalier, C., Bouvy, M., Corbin, D., Pagano, M., Troussellier, M., Arfi, R., 2011. A study of plankton dynamics under osmotic stress in the Senegal River Estuary, West Africa, using a 3D mechanistic model. *Ecological Modelling* 222, 2704-2721.
- Bang, A., Grønkvær, P., Clemmesen, C., Høie, H., 2006. Parental effects on early life history traits of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334, 51-63.
- Barnhoorn, I.E.J., Bornman, M.S., Pieterse, G.M., van Vuren, J.H.J., 2004. Histological evidence of intersex in feral sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) from an estrogen-polluted water source in Gauteng, South Africa. *Environmental Toxicology* 19, 603-608.
- Barucca, M., Canapa, A., Olmo, E., Regoli, F., 2006. Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. *Environmental Research* 101, 68-73.
- Batterbury, S., Warren, A., 2001. The African Sahel 25 years after the great drought: assessing progress and moving towards new agendas and approaches. *Global Environmental Change* 11, 1-8.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H., Hansen, P.D., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Marine Environmental Research* 47, 17-47.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin* 36, 951-960.
- Bayley, M., Larsen, P.F., Bækgaard, H., Baatrup, E., 2003. The Effects of Vinclozolin, an Anti-Androgenic Fungicide, on Male Guppy Secondary Sex Characters and Reproductive Success. *Biology of Reproduction* 69, 1951-1956.
- Begley, S., 2007. « The Truth about Denial ». *Newsweek*. U.S. Edition, pp. 20-29.
- Behrens, A., Segner, H., 2001. Hepatic biotransformation enzymes of fish exposed to non-point source pollution in small streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)* 8, 281-297.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufast, N., Bonhomme, F., 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P., 1997. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 34, 298-305.
- Berger, C., Ba, N., Gugger, M., Bouvy, M., Rusconi, F., Coute, A., Troussellier, M., Bernard, C., 2006. Seasonal dynamics and toxicity of cylindrospermopsis raciborskii in lake guiers (Senegal, West Africa). *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 355-366.
- Berghahn, R., 2000. Response to extreme conditions in coastal areas: biological tags in flatfish otoliths. *Marine Ecology Progress Series* 192, 277-285.

## Références bibliographiques

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22, 25-34.
- Berntssen, M.H.G., Aatland, A., Handy, R.D., 2003. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology* 65, 55-72.
- Bethoux, J.P., Gentili, B., Raunet, J., Tailliez, D., 1990. Warming trend in the western Mediterranean deep water. *Nature* 347, 660-662.
- Bethoux, J.P., Gentili, B., Tailliez, D., 1998. Warming and freshwater budget change in the Mediterranean since the 1940s, their possible relation to the greenhouse effect. *Geophys. Res. Lett.* 25, 1023-1026.
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D.N., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research* 463, 33-51.
- Bindoff, N.L., Church, J.A., 1992. Warming of the water column in the southwest Pacific Ocean. *Nature* 357, 59-62.
- Binelli, A., Provini, A., 2003a. The PCB pollution of Lake Iseo (N. Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. *Chemosphere* 53, 143-151.
- Binelli, A., Provini, A., 2003b. POPs in edible clams from different Italian and European markets and possible human health risk. *Marine Pollution Bulletin* 46, 879-886.
- Bjerregaard, L., Madsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2006. Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluent. *Ecotoxicology* 15, 315-327.
- Bjerselius, R., Lundstedt-Enkel, K., Olsan, H., Mayer, I., Dimberg, K., 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17  $\beta$ -estradiol. *Aquatic Toxicology* 53, 139-152.
- Blasco, F., Saenger, P., Janodet, E., 1996. Mangroves as indicators of coastal change. *CATENA* 27, 167-178.
- Blazer, V.S., Iwanowicz, L.R., Iwanowicz, D.D., Smith, D.R., Young, J.A., Hedrick, J.D., Foster, S.W., Reeser, S.J., 2007. Intersex (Testicular Oocytes) in *Smallmouth Bass* from the Potomac River and Selected Nearby Drainages. *Journal of Aquatic Animal Health* 19, 242-253.
- Bodin, N., N'Gom Ka, R., Le Loc'h, F., Raffray, J., Budzinski, H., Peluhet, L., Tito de Morais, L., 2011. Are exploited mangrove molluscs exposed to Persistent Organic Pollutant contamination in Senegal, West Africa? *Chemosphere* 84, 318-327.
- Bodin, N., N'Gom-Kâ, R., Kâ, S., Thiaw, O.T., Tito de Morais, L., Le Loc'h, F., Rozuel-Chartier, E., Auger, D., Chiffolleau, J.-F., 2012. Assessment of trace metal contamination in mangrove ecosystems from Senegal, West Africa. *Chemosphere* 84, 318-327.
- Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130, 411-423.
- Boon, J.P., Lewis, W.E., Tjoen-A-Choy, M.R., Allchin, C.R., Law, R.J., de Boer, J., ten Hallers-Tjabbes, C.C., Zegers, B.N., 2002. Levels of Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants in Animals Representing Different Trophic Levels of the North Sea Food Web. *Environmental Science & Technology* 36, 4025-4032.
- Bourret, V., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2008. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology* 86, 76-90.
- Bouvy, M., Ba, N., Ka, S., Sane, S., Pagano, M., Arfi, R., 2006. Phytoplankton community structure and species assemblage succession in a shallow tropical lake (Lake Guiers, Senegal). *Aquatic Microbial Ecology* 45, 147-161.
- Boyer, T.P., Levitus, S., Antonov, J.I., Locarnini, R.A., Garcia, H.E., 2005. Linear trends in salinity for the World Ocean, 1955-1998. *Geophys. Res. Lett.* 32, 4.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brambilla, A., Rindone, B., Polesello, S., Galassi, S., Balestrini, R., 1993. The fate of triazine pesticides in River Po water. *Sci. Total Environ.* 132, 339-348.

## Références bibliographiques

- Brander, K.M., 2007. Global fish production and climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19709-19714.
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518-1532.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M., Jones, K.C., 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners – a mass balance approach: 2. Emissions. *Sci. Total Environ.* 290, 199-224.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M., Jones, K.C., 2007. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners – A mass balance approach: 3. An update. *Sci. Total Environ.* 377, 296-307.
- Brion, F., Rogerieux, F., Noury, P., Migeon, B., Flammarion, P., Thybaud, E., Porcher, J.-M., 2000. Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 737, 3-12.
- Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P., 2004. Impacts of 17 beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 68, 193-217.
- Bucheli, T.D., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 25, 201-268.
- Budzinski, H., Letellier, M., Thompson, S., LeMenach, K., Garrigues, P., 2000. Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 165-171.
- Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R., Garcia de la Parra, L.M., Pfohl-Leszkwicz, A., Raoux, C., Galgani, F., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* 131, 125-141.
- Burke, L., Kura, Y., Kassem, K., Revenga, C., Spalding, M., McAllister, D., 2001. Pilot Analysis of Global Ecosystems: Coastal Ecosystems In: World Resources Institute, W.D.C. (Ed.). World Resources Institute. World Resources Institute., Washington D.C.
- Cabanes, C., Cazenave, A., Le Provost, C., 2001. Sea Level Rise During Past 40 Years Determined from Satellite and *in Situ* Observations. *Science* 294, 840-842.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., Forget-Leray, J., 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147, 841-849.
- Cairns, J., Heath, A.G., Parker, B.C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47, 135-171.
- Campana, S.E., 1999. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series* 188, 263-297.
- Campana, S.E., Casselman, J.M., 1993. Stock discrimination using otolith shape-analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 1062-1083.
- Campana, S.E., Neilson, J.D., 1985. Microstructure of Fish Otoliths. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1014-1032.
- Campbell, C.G., Borglin, S.E., Green, F.B., Grayson, A., Wozel, E., Stringfellow, W.T., 2006. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere* 65, 1265-1280.
- Canonico, G.C., Arthington, A., McCrary, J.K., Thieme, M.L., 2005. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 15, 463-483.
- Cardellicchio, N., Buccolieri, A., Giandomenico, S., Lopez, L., Pizzulli, F., Spada, L., 2007. Organic pollutants (PAHs, PCBs) in sediments from the Mar Piccolo in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Marine Pollution Bulletin* 55, 451-458.

## Références bibliographiques

- Cardinale, M., Doering-Arjes, P., Kastowsky, M., Mosegaard, H., 2004. Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. National Research Council of Canada, Ottawa, Canada.
- Carere, M., Miniero, R., Cicero, M.R., 2011. Potential effects of climate change on the chemical quality of aquatic biota. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30, 1214-1221.
- Carleton, K.L., Streebman, J.T., Lee, B.Y., Gamhart, N., Kidd, M., Kocher, T.D., 2002. Rapid isolation of CA microsatellites from the tilapia genome. *Animal Genetics* 33, 140-144.
- Carrier, R., Beitinger, T.L., 1988. Reduction in thermal tolerance of *Notropis lutrensis* and *Pimephales promelas* exposed to cadmium. *Water Res.* 22, 511-515.
- Carton, J.A., Giese, B.S., Grodsky, S.A., 2005. Sea level rise and the warming of the oceans in the Simple Ocean Data Assimilation (SODA) ocean reanalysis. *J. Geophys. Res.-Oceans* 110, 8.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P.A., Wunderlin, D.A., 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ. Pollut.* 157, 3025-3033.
- Cazenave, J., Nores, M.L., Miceli, M., Diaz, M.P., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., 2008. Changes in the swimming activity and the glutathione S-transferase activity of *Jenynsia multidentata* fed with microcystin-RR. *Water Res.* 42, 1299-1307.
- Celander, M., Forlin, L., 1995. Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P450 1A1 system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquatic Toxicology* 33, 141-153.
- Champalbert, G., Pagano, M., Sene, P., Corbin, D., 2007. Relationships between meso- and macro-zooplankton communities and hydrology in the Senegal River Estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 74, 381-394.
- Chandrasekera, L., Pathiratne, A., Pathiratne, K.A.S., 2008. Effects of water borne cadmium on biomarker enzymes and metallothioneins in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Natl. Sci. Found. Sri Lanka* 36, 315-322.
- Chevreuil, M., Chesterikoff, A., L'Atolle, R., 1987. PCB pollution behaviour in the River Seine. *Water Res.* 21, 427-434.
- Cissé, I., Fall, S.T., Badiane, M., Diop, Y.M., Diouf, A., 2006. Horticulture et usage des pesticides dans la zone des niayes au Sénégal. Institut Sénégalais de recherche agricole, pp. 1-9.
- Clements, W.H., 2000. Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: an overview. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)* 7, 113-116.
- Clements, W.H., Rees, D.E., 1997. Effects of Heavy Metals on Prey Abundance, Feeding Habits, and Metal Uptake of Brown Trout in the Arkansas River, Colorado. *Transactions of the American Fisheries Society* 126, 774-785.
- Cochrane, K., De Young, C., Soto, D., Bahri, T. (Eds.), 2009. Climate change implications for fisheries and aquaculture: overview of current scientific knowledge. FAO, Rome.
- Cogels, F.-X., Fraboulet-Jussila, S., Varis, O., 2001. Multipurpose use and water quality challenges in Lac de Guiers (Senegal). International Water Association, London, Royaume-Uni.
- Costanza, R., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253-260.
- CSE, 2010. Papport sur l'état de l'environnement au Sénégal. In: Ecologique, C.d.S. (Ed.), Dakar, Sénégal, p. 266.
- Curry, R., Dickson, B., Yashayaev, I., 2003. A change in the freshwater balance of the Atlantic Ocean over the past four decades. *Nature* 426, 826-829.
- D'Cotta, H., Valotaire, C., le Gac, F., Prunet, P., 2000. Synthesis of gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic salmon smolts: differences in mRNA and protein levels. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278, R101-R110.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938.
- Davis, L.K., Fox, B.K., Lim, C., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hirano, T., Grau, E.G., 2009. Induction of vitellogenin production in male tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by commercial

## Références bibliographiques

- fish diets. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 154, 249-254.
- De Maagd, P.G.-J., Vethaak, A.D. (Eds.), 1998. Biotransformation of PAHs and their carcinogenic effects in fish. *The Handbook of Environmental Chemistry*, Berlin, Heidelberg.
- De Vries, D.A., Grimes, C.B., Prager, M.H., 2002. Using otolith shapes analysis to distinguish eastern Gulf of Mexico and Atlantic Ocean stocks of king mackerel. *Fisheries Research* 57, 51-62.
- de Wit, C.A., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583-624.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology* 32, 1549-1558.
- Deviller, G., Palluel, O., Aliaume, C., Asanthi, H., Sanchez, W., Franco Nava, M.A., Blancheton, J.P., Casellas, C., 2005. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 89-97.
- Di Giulio, R.T., Scanlon, P.F., 1984. Heavy metals in tissues of waterfowl from the Chesapeake Bay, USA. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 35, 29-48.
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926-929.
- Diouf, K., Panfili, J., Labonne, M., Aliaume, C., Tomás, J., Do Chi, T., 2006. Effects of salinity on strontium:calcium ratios in the otoliths of the West African black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* in a hypersaline estuary. *Environ. Biol. Fishes* 77, 9-20.
- Diouf, P.S., 1996. Les peuplements de poissons des milieux estuariens de l'Afrique de l'ouest : l'exemple de l'estuaire hyperhalin du Sine-Saloum. *Biologie des systèmes intégrés*. Université de Montpellier II, Montpellier, p. 267.
- Douben, P.E.T. (Ed.), 2003. PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, England.
- Durrant, C.J., Stevens, J.R., Hogstrand, C., Bury, N.R., 2011. The effect of metal pollution on the population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta L.*) residing in the River Hayle, Cornwall, UK. *Environ. Pollut.* 159, 3595-3603.
- Eissa, A.E., Zaki, M.M., 2011. The impact of global climatic changes on the aquatic environment. *Procedia Environmental Sciences* 4, 251-259.
- Ellison, J.C., Stoddart, D.R., 1991. Mangrove Ecosystem Collapse during Predicted Sea-Level Rise: Holocene Analogues and Implications. *Journal of Coastal Research* 7, 151-165.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres jr, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- EPA, 1997. Special report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. In: Development, O.o.R.a. (Ed.). EPA/630/R-96/012, Washington D.C. .
- EPA, 2009. Synthesis of Adaptation Options for Coastal Areas. In: Environmental Protection Agency, C.R.E.P. (Ed.), Washington, DC, U.S.
- Erdogrul, O., Covaci, A., Schepens, P., 2005. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaras, Turkey. *Environment International* 31, 703-711.
- Evans, D.H., 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295, R704-R713.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews* 85, 97-177.
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Du, M.L., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 15, 111-127.



## Références bibliographiques

- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1, 47-50.
- Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Stoliar, O.B., Nam, Y.K., 2011. Various responses to copper and manganese exposure of *Carassius auratus* gibelio from two populations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 154, 242-253.
- Falk, T.M., Abban, E.K., Villwock, W., 1999. Population genetic analysis of the haemoglobins of the black-chinned tilapia. *J. Fish Biol.* 55, 233-242.
- Falk, T.M., Teugels, G.G., Abban, E.K., Villwock, W., Renwranz, L., 2003. Phylogeographic patterns in populations of the black-chinned tilapia complex (Teleostei, Cichlidae) from coastal areas in West Africa: support for the refuge zone theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27, 81-92.
- Fall, S., Semazzi, F.H.M., Dutta, D., Niyogi, S., Anyah, R.O., Bowden, J., 2006. The spatiotemporal climate variability over Senegal and its relationship to global climate. *Int. J. Climatol.* 26, 2057-2076.
- Fall, S.T., Fall, A.S., Cissé, I., Badiane, A., Fall, C.A., Diao, M.B., 2000. Intégration horticulture-élevage dans les systèmes agricoles urbains de la zone des Niayes (Sénégal). *Bulletin de l'APAD* 19, 2-15.
- Fang, J.K.H., Au, D.W.T., Wu, R.S.S., Chan, A.K.Y., Mok, H.O.L., Shin, P.K.S., 2009. The use of physiological indices in rabbitfish *Siganus oramin* for monitoring of coastal pollution. *Marine Pollution Bulletin* 58, 1229-1235.
- FAO, 2003. Code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome.
- FAO, 2010. Rapport de la FAO sur la situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Rome, p. 100.
- Faunce, C.H., 2000. Reproduction of blackchin tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, within an impounded mangrove ecosystem in east-central Florida. *Environ. Biol. Fishes* 57, 353-361.
- Faye, G., 2010. Les impacts des activités économiques sur la dynamique du littoral de la Petite côte, de la baie de Hann à Joal au Sénégal. *Revue de Géographie du Laboratoire Leïdi N°08*
- Fenet, H., Gomez, E., Rosain, D., Casellas, C., 2006. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites and 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase Activity in Caged European Eels. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 232-236.
- Ferguson, G.J., Ward, T.M., Gillanders, B.M., 2011. Otolith shape and elemental composition: Complementary tools for stock discrimination of mulloway (*Argyrosomus japonicus*) in southern Australia. *Fisheries Research* 110, 75-83.
- Fiess, J.C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L.G., Yancey, P.H., Hirano, T., Grau, E.G., 2007. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* 146, 252-264.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E., Reis-Henriques, M.A., 2006. The Effect of Paraquat on Hepatic EROD Activity, Liver, and Gonadal Histology in Males and Females of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*; Exposed at Different Temperatures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 626-632.
- Flammarion, P., Devaux, A., Garric, J., 2000. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemple d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 209-226.
- Flammarion, P., Garric, J., 1997. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: A relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere* 35, 2375-2388.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J., 1998. Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40, 144-153.
- Flik, G., Wendelaar, B.S., Fenwick, J., 1983. Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes. I. Identification of Ca<sup>2+</sup>-activated ATPase activities with nonspecific phosphatase activities. *Comp Biochem Physiol B* 76, 745-754.

## Références bibliographiques

- Fossi, M.C., Casini, S., Marsili, L., Neri, G., Mori, G., Ancora, S., Moscatelli, A., Ausili, A., Notarbartolo-di-Sciara, G., 2002. Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Marine Environmental Research* 54, 667-671.
- Fram, M.S., Belitz, K., 2011. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. *Sci. Total Environ.* 409, 3409-3417.
- Freitas, V., Campos, J., Fonds, M., Van der Veer, H.W., 2007. Potential impact of temperature change on epibenthic predator-bivalve prey interactions in temperate estuaries. *Journal of Thermal Biology* 32, 328-340.
- Friedland, K.D., Reddin, D.G., McMenemy, J.R., Drinkwater, K.F., 2003. Multidecadal trends in North American Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks and climate trends relevant to juvenile survival. *Can J Fish Aquat Sci* 60, 563-583.
- Fryer, G., Iles, T.D., 1972. The Cichlid Fishes of the Great Lakes of Africa: their biology and evolution.
- Fukasawa, M., Freeland, H., Perkin, R., Watanabe, T., Uchida, H., Nishina, A., 2004. Bottom water warming in the North Pacific Ocean. *Nature* 427, 825-827.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 37-45.
- Gadagbui, B.K.-M., Addy, M., Goksøyr, A., 1996. Species characteristics of hepatic biotransformation enzymes in two tropical freshwater teleosts, tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mudfish (*Clarias anguillaris*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 114, 201-211.
- Gagliano, M., McCormick, M.I., 2004. Feeding history influences otolith shape in tropical fish. *Marine Ecology Progress Series* 278, 291-296.
- Galassi, S., Mingazzini, M., Battezzore, M., 1993. The use of biological methods for pesticide monitoring. *Sci. Total Environ.* 132, 399-414.
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19, 239-266.
- GIEC/IPPC, 2001. Climate Change 2001: Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: Basis, T.s. (Ed.). Press, Cambridge University Press.
- GIEC/IPPC, 2007. Contribution des Groupes de travail I, II et III au quatrième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat press., Genève, Suisse, p. 103.
- Gilman, E.L., Ellison, J., Duke, N.C., Field, C., 2008. Threats to mangroves from climate change and adaptation options: A review. *Aquatic Botany* 89, 237-250.
- Gimeno, S., Komen, H., Jobling, S., Sumpter, J., Bowmer, T., 1998. Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquatic Toxicology* 43, 93-109.
- Gioia, R., Eckhardt, S., Breivik, K., Jaward, F.M., Prieto, A., Nizzetto, L., Jones, K.C., 2011. Evidence for Major Emissions of PCBs in the West African Region. *Environmental Science & Technology* 45, 1349-1355.
- Glover, C.N., Petri, D., Tollefsen, K.-E., Jørum, N., Handy, R.D., Berntssen, M.H.G., 2007. Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. *Aquatic Toxicology* 84, 346-355.
- Goede, R., Barton, B., 1990. Organismic indices and an autopsy based assessment as indicators of health and condition of fish. *American Fisheries Society Symposium* 8, 93-108.
- Goksøyr, A., Forlin, L., 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22, 287-311.
- Gräwe, U., Wolff, J.O., Ribbe, J., 2010. Impact of climate variability on an east Australian bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 86, 247-257.
- Gray, M.A., Teather, K.L., Metcalfe, C.D., 1999. Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2587-2594.

## Références bibliographiques

- Guillette, L.J., Gunderson, M.P., 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction* 122, 857-864.
- Guttman, S.I., 1994. Population genetic structure and ecotoxicology. pp. 97-100.
- Habig, C., DiGiulio, R.D. (Eds.), 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. *Chemicals in Agriculture*, NY, USA.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- Hale, R.C., La Guardia, M.J., Harvey, E.P., Mainor, T.M., Duff, W.H., Gaylor, M.O., 2001. Polybrominated Diphenyl Ether Flame Retardants in Virginia Freshwater Fishes (USA). *Environmental Science & Technology* 35, 4585-4591.
- Halliwell, B., 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research* 31, 261-272.
- Hamers, T., Kamstra, J.H., Sonneveld, E., Murk, A.J., Kester, M.H.A., Andersson, P.L., Legler, J., Brouwer, A., 2006. In Vitro Profiling of the Endocrine-Disrupting Potency of Brominated Flame Retardants. *Toxicological Sciences* 92, 157-173.
- Hansen, J., Johnson, D., Lacis, A., Lebedeff, S., Lee, P., Rind, D., Russell, G., 1981. Climate Impact of Increasing Atmospheric Carbon Dioxide. *Science* 213, 957-966.
- Harley, C.D.G., Randall Hughes, A., Hultgren, K.M., Miner, B.G., Sorte, C.J.B., Thornber, C.S., Rodriguez, L.F., Tomanek, L., Williams, S.L., 2006. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters* 9, 228-241.
- Harrison, T.D., Whitfield, A.K., 2006. Temperature and salinity as primary determinants influencing the biogeography of fishes in South African estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 66, 335-345.
- Hawker, D.W., Connell, D.W., 1988. Octanol-water partition coefficients of polychlorinated biphenyl congeners. *Environmental Science & Technology* 22, 382-387.
- Hebert, P.D.N., Luiker, M.M., 1996. Genetic effects of contaminant exposure -- towards an assessment of impacts on animal populations. *Sci. Total Environ.* 191, 23-58.
- Hernandez-Moreno, D., Pérez-Lopez, M., Soler, F., Gravato, C., Guilhermino, L., 2011. Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Study of biomarkers and behaviour alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 7.
- Heugens, E.H.W., Jager, T., Creyghton, R., Kraak, M.H.S., Hendriks, A.J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-Dependent Effects of Cadmium on *Daphnia magna*: Accumulation versus Sensitivity. *Environmental Science & Technology* 37, 2145-2151.
- Hinck, J.E., Schmitt, C.J., Eilersieck, M.R., Tillitt, D.E., 2008. Relations between and among contaminant concentrations and biomarkers in black bass (*Micropterus spp.*) and common carp (*Cyprinus carpio*) from large US rivers, 1995-2004. *J. Environ. Monit.* 10, 1499-1518.
- Hinfray, N., Palluel, O., Piccini, B., Sanchez, W., Ait-Aissa, S., Noury, P., Gomez, E., Geraudie, P., Minier, C., Brion, F., Porcher, J.M., 2010. Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Sci. Total Environ.* 408, 2146-2154.
- Hinton, D.E. (Ed.), 1990. *Histological techniques*.
- Hiroi, J., Yasumasu, S., McCormick, S.D., Hwang, P.-P., Kaneko, T., 2008. Evidence for an apical NaCl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. *Journal of Experimental Biology* 211, 2584-2599.
- Hogan, J.W., 1971. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 5, 347-353.
- Howe, G.E., Marking, L.L., Bills, T.D., Rach, J.J., Mayer, F.L., 1994. Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 51-66.
- Hull, C.H.J., Titus, J.G., 1986. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. Greenhouse effect, sea level rise, and salinity in the Delaware Estuary

## Références bibliographiques

- Par United States. Environmental Protection Agency, Delaware River Basin Commission. In: EPA, U.S. (Ed.). United States. Environmental Protection Agency, Delaware River Basin Commission, pp. 1-82.
- Hulme, M., 1995. Estimating global changes in precipitation. *Weather* 50, 34-42.
- Huuskonen, S., Lindstrom-Seppa, P., 1995. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp mill effluents. *Aquatic Toxicology* 31, 27-41.
- Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48, 624-649.
- Iwata, H., Tanabe, S., Sakai, N., Tatsukawa, R., 1993. Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environmental Science & Technology* 27, 1080-1098.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806.
- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 515-540.
- Japenga, J., Wagenaar, W.J., Salomons, W., Lacerda, L.D., Patchineelam, S.R., Filho, C.M.L.o., 1988. Organic micropollutants in the Rio de Janeiro coastal region, Brazil. *Sci. Total Environ.* 75, 249-259.
- Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J.G., Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Beresford, N., Henshaw, A.C., Brighty, G., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 2002. Wild Intersex Roach (*Rutilus rutilus*) Have Reduced Fertility. *Biology of Reproduction* 67, 515-524.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science & Technology* 32, 2498-2506.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 1995. A variety of environmentally chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. US Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC, Etats-Unis.
- Jobling, S., Sumpter, J.P., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 194-202.
- Jonsson, N.B., Hansen, L.P., 1997. Changes in proximate composition and estimates of energetic costs during upstream migration and spawning in Atlantic salmon *Salmo salar*. Blackwell, Oxford, Royaume-Uni.
- Kâ, S., Pagano, M., Bâ, N., Bouvy, M., Leboulanger, C., Arfi, R., Thiaw, O.T., Ndour, E.H.M., Corbin, D., Defaye, D., Cuoc, C., Kouassi, E., 2006. Zooplankton Distribution Related to Environmental Factors and Phytoplankton in a Shallow Tropical Lake (Lake Guiers, Senegal, West Africa). *International Review of Hydrobiology* 91, 389-405.
- Kamat, J.P., Devasagayam, T.P.A., Priyadarsini, K.I., Mohan, H., 2000. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology* 155, 55-61.
- Katsiadaki, I., Scott, A.P., Mayer, I., 2002. The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. *Marine Environmental Research* 54, 725-728.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., Amara, R., 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 154, 187-195.
- Kester, M.H.A., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M.W.H., Bergman, A., Safe, S.H., Kuiper, G.G.J.M., Schuur, A.G., Brouwer, A., Visser, T.J., 2000. Potent Inhibition of Estrogen Sulfotransferase by Hydroxylated PCB Metabolites: A Novel Pathway Explaining the Estrogenic Activity of PCBs. *Endocrinology* 141, 1897-1900.

## Références bibliographiques

- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1989. The Role of Glutathione in Detoxication. *Environ. Health Perspect.* 49, 59-69.
- Khasnis, A.A., Nettleman, M.D., 2005. Global Warming and Infectious Disease. *Archives of Medical Research* 36, 689-696.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 8897-8901.
- Kirschner, L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. *Journal of Experimental Biology* 207, 1439-1452.
- Kishida, M., Specker, J.L., 2000. Paternal Mouthbrooding in the Black-Chinned Tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Pisces: Cichlidae): Changes in Gonadal Steroids and Potential for Vitellogenin Transfer to Larvae. *Hormones and Behavior* 37, 40-48.
- Klein, R.J.T., Nicholls, R.J., 1999. Assessment of coastal vulnerability to climate change. *Ambio* 28, 182-187.
- Klein, R.J.T., Nicholls, R.J., Ragoonaden, S., Capobianco, M., Aston, J., Buckley, E.N., 2001. Technological Options for Adaptation to Climate Change in Coastal Zones. *Journal of Coastal Research* 17, 531-543.
- Knapen, D., De Wolf, H., Knaepkens, G., Bervoets, L., Eens, M., Blust, R., Verheyen, E., 2009. Historical metal pollution in natural gudgeon populations: Inferences from allozyme, microsatellite and condition factor analysis. *Aquatic Toxicology* 95, 17-26.
- Kone, T., Teugels, G.G., 2003. Food habits of brackish water tilapia (*Sarotherodon melanotheron*); in riverine and lacustrine environments of a West African coastal basin. *Hydrobiologia* 490, 75-85.
- Koné, T., Teugels, G.G., 1999. Données sur la reproduction d'un tilapia estuarien (*Sarotherodon melanotheron*) isolé dans un lac de barrage ouest-africain. *Aquat. Living Resour.* 12, 289-293.
- Kuhl, F.P., Giardina, C.R., 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing* 18, 236-258.
- Kummerer, K., 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* 90, 2354-2366.
- Laë, R., Ecoutin, J.-M., Mendy, A., Raffray, J., Weigel, J.-Y., Sadio, O., Djobe, O., 2004. Effects of a targeted shrimp (*Penaeus notialis*) exploitation on fish catches in the Gambia estuary : Fishes of the Gambia River Estuary, West Africa. EDP Sciences, Paris, FRANCE.
- Larno, V., Laroche, J., Launey, S., Flammarion, P., Devaux, A., 2001. Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P4501A induction. *Ecotoxicology* 10, 145-158.
- Laroche, J., Quiniou, L., Juhel, G., Auffret, M., Moraga, D., 2002. Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2705-2712.
- Laubier, L., 2003. Changement et vulnérabilité des peuplements marins côtiers. *Comptes Rendus Geoscience* 335, 561-568.
- Laurance, W.F., Carolina Useche, D., Shoo, L.P., Herzog, S.K., Kessler, M., Escobar, F., Brehm, G., Axmacher, J.C., Chen, I.C., Gámez, L.A., Hietz, P., Fiedler, K., Pyrcz, T., Wolf, J., Merkord, C.L., Cardelus, C., Marshall, A.R., Ah-Peng, C., Aplet, G.H., del Coro Arizmendi, M., Baker, W.J., Barone, J., Brühl, C.A., Bussmann, R.W., Cicuzza, D., Eilu, G., Favila, M.E., Hemp, A., Hemp, C., Homeier, J., Hurtado, J., Jankowski, J., Kattán, G., Kluge, J., Krömer, T., Lees, D.C., Lehnert, M., Longino, J.T., Lovett, J., Martin, P.H., Patterson, B.D., Pearson, R.G., Peh, K.S.H., Richardson, B., Richardson, M., Samways, M.J., Senbeta, F., Smith, T.B., Utteridge, T.M.A., Watkins, J.E., Wilson, R., Williams, S.E., Thomas, C.D., 2011. Global warming, elevational ranges and the vulnerability of tropical biota. *Biological Conservation* 144, 548-557.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldúa, D., Martín, R., Porte, C., 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 247-257.
- Laverty, G., Skadhauge, E., 2012. Adaptation of teleosts to very high salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 163, 1-6.

## Références bibliographiques

- Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41-55.
- Legendre, M., Ecoutin, J.-M., 1989. Suitability of brackish water tilapia species from the Ivory Coast for lagoon aquaculture. I-Reproduction. *Aquat. Living Resour.* 2, 71-79.
- Legendre, M., Ecoutin, J.-M., 1996. Aspects de la stratégie de reproduction de *Sarotherodon melanotheron*, comparaison entre une population naturelle (lagune Ebrié, Côte d'Ivoire) et différentes populations d'élevage. Le Troisième Symposium International sur le Tilapia en Aquaculture. ICLARM conf., pp. 360-374.
- Legler, J., Brouwer, A., 2003. Are brominated flame retardants endocrine disruptors? *Environment International* 29, 879-885.
- Lehadey, P., Alheit, J., Barange, M., Baumgartner, T., Beaugrand, G., Drinkwater, K., Fromentin, J.-M., Hare, S.R., Ottersen, G., Perry, R.I., Roy, C., Van Der Lingen, C.D., Werner, F., 2006. Climate variability, fish, and fisheries. American Meteorological Society, Boston, MA, ETATS-UNIS.
- Lemarié, G., Baroiller, J.F., Clota, F., Lazard, J., Dosdat, A., 2004. A simple test to estimate the salinity resistance of fish with specific application to *O. niloticus* and *S. melanotheron*. *Aquaculture* 240, 575-587.
- Lévêque, C., Paugy, D., 2006. Les poissons des eaux continentales africaines : diversité, écologie, utilisation par l'homme. IRD Editions, Paris.
- Lévêque, C., Paugy, D., Teugels, G.G. (Eds.), 1992. The fresh and brackish water fishes of West Africa. ORSTOM, Paris.
- Levitus, S., Antonov, J.I., Boyer, T.P., Stephens, C., 2000. Warming of the World Ocean. *Science* 287, 2225-2229.
- Li, W.-H., Tian, Y.-Z., Shi, G.-L., Guo, C.-S., Li, X., Feng, Y.-C., 2011. Concentrations and sources of PAHs in surface sediments of the Fenhe reservoir and watershed, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75, 198-206.
- Li, Z.-H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T., 2009. Responses of antioxidant status and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, chronically treated with carbamazepine. *Chemosphere* 77, 1476-1481.
- Lindstrom-Seppa, P., Oikari, A., 1989. Biotransformation and other physiological responses in whitefish caged in a lake receiving pulp and paper mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 18, 191-203.
- Lindstrom-Seppa, P., Oikari, A., 1990. Biotransformation and other toxicological and physiological responses in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) caged in a lake receiving effluents of pulp and paper industry. *Aquatic Toxicology* 16, 187-204.
- Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 57, 195-211.
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 43-49.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, 656-666.
- Lombarte, A., Leonart, J., 1993. Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environ. Biol. Fishes* 37, 297-306.
- Lorin-Nebel, C., Avarre, J.-C., Faivre, N., Wallon, S., Charmantier, G., Durand, J.-D., 2012. Osmoregulatory strategies in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* exposed to extreme salinities in West African estuaries. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 182, 771-780.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144, 283-289.

- Mackay, D., Shiu, W., Ma, K. (Eds.), 1992. Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Maioli, O.v.L.G., Rodrigues, K.C., Knoppers, B.A., Azevedo, D.b.A., 2010. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from two Brazilian estuarine systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21, 1543-1551.
- Mancera, J.M., McCormick, S.D., 2000. Rapid Activation of Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the Euryhaline Teleost *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.* 287, 263-274.
- Manirakiza, P., Akinbamijo, O., Covaci, A., Pitonzo, R., Schepens, P., 2003. Assessment of organochlorine pesticide residues in West African city farms: Banjul and Dakar case study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 171-179.
- Marchand, J., Evrard, E., Guinand, B., Cachot, J., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Genetic polymorphism and its potential relation to environmental stress in five populations of the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic coast. *Marine Environmental Research* 70, 201-209.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.-T., Laroche, J., 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology* 70, 327-343.
- Marshall, W.S., Singer, T.D., 2002. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in teleost fish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1566, 16-27.
- Martinez-Gomez, C., Campillo, J.A., Benedicto, J., Fernandez, B., Valdes, J., Garcia, I., Sanchez, F., 2006. Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern Iberian shelf after the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 53, 305-314.
- Matos, P., Fontanhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Carrola, J., Rocha, E., 2007. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pest. Biochem. Physiol.* 89, 73-80.
- Matson, C.W., Rodgers, B.E., Chesser, R.K., Baker, R.J., 2000. Genetic diversity of *Clethrionomys glareolus* populations from highly contaminated sites in the Chernobyl region, Ukraine. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2130-2135.
- Mayon, N., Bertrand, A., Leroy, D., Malbrouck, C., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Goffart, A., Thomé, J.-P., Kestemont, P., 2006. Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations: A case study. *Sci. Total Environ.* 367, 715-731.
- McCormick, S.D., 2001. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. *American Zoologist* 41, 781-794.
- McCormick, S.D., Sundell, K., Björnsson, B.T., Brown, C.L., Hiroi, J., 2003. Influence of salinity on the localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC) and CFTR anion channel in chloride cells of the Hawaiian goby (*Stenogobius hawaiiensis*). *Journal of Experimental Biology* 206, 4575-4583.
- McDonald, T.A., 2002. A perspective on the potential health risks of PBDEs. *Chemosphere* 46, 745-755.
- McIntyre, K.M., Setzkorn, C., Baylis, M., Waret-Szkuta, A., Caminade, C., Morse, A.P., Akin, S.A., Huynen, M., Martens, P., Morand, S., 2010. Impact of climate change on human and animal health. *Vet. Rec.* 167, 586-586.
- McKenzie, D.J., Garofalo, E., Winter, M.J., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N., Hayes, R., van der Oost, R., Butler, P.J., Chipman, J.K., Taylor, E.W., 2007. Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362, 2043-2059.
- Mendoza-Vera, J.M., Kâ, S., Cuoc, C., Bouvy, M., Pagano, M., 2008. Decline of *Pseudodiaptomus hessei* (Copepoda, Calanoida) in two water bodies located in the Senegal River hydrosystem (West Africa): Hypotheses and perspectives. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79, 740-750.
- Meng, L., Powell, J., Taplin, B., 2001. Using winter flounder growth rates to assess habitat quality across an anthropogenic gradient in Narragansett Bay, Rhode Island. *Estuaries Coasts* 24, 576-584.

## Références bibliographiques

- Messaad, I.A., Peters, E.J., Young, L., 2000. Thermal Tolerance of Red Shiner (*Cyprinella lutrensis*) After Exposure to Atrazine, Terbufos, and Their Mixtures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 748-754.
- Metcalfe, T.L., Metcalfe, C.D., Kiparissis, Y., Niimi, A.J., Foran, C.M., Benson, W.H., 2000. Gonadal development and endocrine responses in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to o,p'-DDT in water or through maternal transfer. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1893-1900.
- Meunier, B., De Visser, S.I.P., SHAIK, S., 2004. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. American Chemical Society, Washington, DC, ETATS-UNIS.
- Meyer, J.N., Di Giulio, R.T., 2003. Heritable adaptation and fitness cost in killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a polluted estuary. *Ecol. Appl.* 13, 490-503.
- Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343, 1-34.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquené, G., Godefroy, D., Burgeot, T., Leboulenger, F., 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50, 373-377.
- Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L.c., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143, 141-149.
- Mooney, H., Larigauderie, A., Cesario, M., Elmquist, T., Hoegh-Guldberg, O., Lavorel, S., Mace, G.M., Palmer, M., Scholes, R., Yahara, T., 2009. Biodiversity, climate change, and ecosystem services. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 1, 46-54.
- Morales-Nin, B., 2000. Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research* 46, 53-67.
- Morat, F., Betoulle, S., Robert, M., Thailly, A.F., Biagianti-Risbourg, S., Lecomte-Finiger, R., 2008. What can otolith examination tell us about the level of perturbations of Salmonid fish from the Kerguelen Islands? *Ecology of Freshwater Fish* 17, 617-627.
- Morat, F., Letourneur, Y., Nérini, D., Banaru, D., Batjakas, I.E., 2012. Discrimination of red mullet populations (Teleostean, Mullidae) along multi-spatial and ontogenetic scales within the Mediterranean basin on the basis of otolith shape analysis. *Aquat. Living Resour.* 25, 27-39.
- Moreau, M., Surico-Bennett, J., Vicario-Fisher, M., Crane, D., Gerads, R., Gersberg, R., Hurlbert, S., 2007. Contaminants in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from the Salton Sea, California, in relation to human health, piscivorous birds and fish meal production. *Hydrobiologia* 576, 127-165.
- Mouneyrac, C., Perrein-Ettajani, H., Amiard-Triquet, C., 2010. Influence of anthropogenic stress on fitness and behaviour of a key-species of estuarine ecosystems, the ragworm *Nereis diversicolor*. *Environ. Pollut.* 158, 121-128.
- Munang, R., Rivington, M., Takle, E.S., Mackey, B., Thiaw, I., Liu, J., 2010. Climate Information and Capacity Needs for Ecosystem Management under a Changing Climate. *Procedia Environmental Sciences* 1, 206-227.
- Najjar, R.G., Pyke, C.R., Adams, M.B., Breitburg, D., Hershner, C., Kemp, M., Howarth, R., Mulholland, M.R., Paolisso, M., Secor, D., Sellner, K., Wardrop, D., Wood, R., 2010. Potential climate-change impacts on the Chesapeake Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 86, 1-20.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F.o., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish. *Environ Health Perspect* 112.
- Navas, J.M., Segner, H., 2001. Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chemico-Biological Interactions* 138, 285-298.
- Ndong, J.B., 1995. L'évolution de la pluviométrie au Sénégal et les incidences de la sécheresse récente sur l'environnement / The evolution of rainfall in Senegal and the consequences of the recent drought on the environment. *Revue de géographie de Lyon* 70, 193-198.



## Références bibliographiques

- Niang-Diop, I., Dansokho, M., Ly, I., Niang, S., 2002. Senegal National Report Phase I: Integrated problem analysis. Global Environment Facility MSP Sub-Saharan Africa Project (GF/6010-0016) "Development and Protection of the Coastal and Marine Environment in Sub-Saharan Africa".
- Niang, I., Dansokho, M., Faye, S., Gueye, K., Ndiaye, P., 2010. Impacts of climate change on the Senegalese coastal zones: Examples of the Cap Vert peninsula and Saloum estuary. *Glob. Planet. Change* 72, 294-301.
- Niang, S., 1999. Utilisation des eaux usées brutes dans l'agriculture au Sénégal : bilan et perspectives.
- Niasse, M., Afouda, A., Amani, A. (Eds.), 2004. Réduire la vulnérabilité de l'Afrique de l'ouest aux impacts du climat sur les ressources en eau, les zones humides et la désertification : Eléments de stratégie régionale de préparation et d'adaptation. UICN, Gland, Suisse et Cambridge, Royaume-uni.
- Nowak, C., Vogt, C., Oehlmann, J., Pfenninger, M., Schwenk, K., Streit, B., Oetken, M., 2012. Impact of genetic diversity and inbreeding on the life-history of *Chironomus* midges over consecutive generations. *Chemosphere* 88, 988-993.
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environment International* 35, 971-986.
- Nriagu, J.O., 1992. Toxic metal pollution in Africa. *Sci. Total Environ.* 121, 1-37.
- Oakes, K.D., Van der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicology* 63, 447-463.
- Ogala, J.E., Iwegbue, C.M.A., 2011. Occurrence and profile of polycyclic aromatic hydrocarbons in coals and shales from eastern Nigeria. *Petroleum & Coal* 53, 188-193.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Okoumassoun, L.-E., Brochu, C., Deblois, C., Akponan, S., Marion, M., Averill-Bates, D., Denizeau, F., 2002. Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Ouémé River in Republic of Benin. *The Science of The Total Environment* 299, 163-172.
- Oliveira, M., Gravato, C., Guilhermino, L., 2011. Acute toxic effects of pyrene on *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): Mortality, biomarkers and swimming performance. *Ecological Indicators* 19, 206-214.
- OMS, 2004. Prévention des risques pour la santé liés à l'utilisation des pesticides dans l'agriculture.
- Oreskes, N. (Ed.), 2012. Les marchands de doute aux Etats-Unis. Edwin Zaccai et al., Paris.
- Oshima, Y., Kang, I.J., Kobayashi, M., Nakayama, K., Imada, N., Honjo, T., 2003. Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 $\beta$ -estradiol. *Chemosphere* 50, 429-436.
- OSPAR, 2010. Quality status report-climate change. pp. 17-26.
- Ouattara, N.G., Bodinier, C., Nègre-Sadargues, G., D'Cotta, H., Messad, S., Charmantier, G., Panfili, J., Baroiller, J.-F., 2009. Changes in gill ionocyte morphology and function following transfer from fresh to hypersaline waters in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. *Aquaculture* 290, 155-164.
- Overland, J.E., Alheit, J., Bakun, A., Hurrell, J.W., Mackas, D.L., Miller, A.J., 2010. Climate controls on marine ecosystems and fish populations. *J. Mar. Syst.* 79, 305-315.
- Pagès, J., Citeau, J., 1990. Rainfall and salinity of a Sahelian estuary between 1927 and 1987. *J. Hydrol.* 113, 325-341.
- Pait, A.S., Nelson, J.O., 2002. Endocrine Disruption in Fish: An Assessment of Recent Research and Results. In: Memo, N.T. (Ed.). NOS NCCOS CCMA 149. . NOAA, NOS, Center for Coastal Monitoring and Assessment, Silver Spring, Maryland p. 55.
- Panfili, J., De Pontual, H., Troadec, H., Wright, P.J. (Eds.), 2002. Manual of Fish Sclerochronology. . IFREMER-IRD, Brest, France.
- Panfili, J., Mbow, A., Durand, J.D., Diop, K., Diouf, K., Thior, D., Ndiaye, P., Lae, R., 2004. Influence of salinity on the life-history traits of the West African black-chinned tilapia

## Références bibliographiques

- (*Sarotherodon melanotheron*): Comparison between the Gambia and Saloum estuaries. *Aquat. Living Resour.* 17, 65-74.
- Panfili, J., Thior, D., Ecoutin, J.M., Ndiaye, P., Albaret, J.J., 2006. Influence of salinity on the size at maturity for fish species reproducing in contrasting West African estuaries. *J. Fish Biol.* 69, 95-113.
- Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Länge, R., Lye, C.M., Sumpster, J.P., Zerulla, M., Tyler, C.R., 2002. Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 319-326.
- Parente, T.E.M., De-Oliveira, A., Silva, I.B., Araujo, F.G., Paumgarten, F.J.R., 2004. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere* 54, 1613-1618.
- Parnesan, C., 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 637-669.
- Parrilla, G., Lavin, A., Bryden, H., Garcia, M., Millard, R., 1994. Rising temperature in the subtropical north-Atlantic ocean over the past 35 years. *Nature* 369, 48-51.
- Parvez, S., Sayeed, I., Raisuddin, S., 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 62-66.
- Pathiratne, A., Chandrasekera, L., Pathiratne, K., 2009. Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. *Environ. Monit. Assess.* 156, 361-375.
- Patra, R.W., Chapman, J.C., Lim, R.P., Gehrke, P.C., 2007. The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1454-1459.
- Paula, J.P., 2011. Exploring climate change criteria for strategic environmental assessments. *Progress in Planning* 75, 109-154.
- Pauly, D., Moreau, J., Palomares, M.L.D., 1988. Detritus and energy consumption and conversion efficiency of *Sarotherodon melanotheron* (Cichlidae) in a West African lagoon. *Journal of Applied Ichthyology* 4, 190-193.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Collier, T.K., 2003. *Ecotoxicological Studies Focusing on Marine and Freshwater Fish. PAHs: An Ecotoxicological Perspective.* John Wiley & Sons, Ltd, pp. 191-224.
- Peck, M., Buckley, L., Bengtson, D., 2006. Effects of Temperature and Body Size on the Swimming Speed of Larval and Juvenile Atlantic Cod (*Gadus Morhua*): Implications for Individual-based Modelling. *Environ. Biol. Fishes* 75, 419-429.
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D., Fontainhas-Fernandes, A., 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pest. Biochem. Physiol.* 85, 91-96.
- Petit, F., Le Goff, P., Cravédi, J.-P., Kah, O., Valotaire, Y., Pakdel, F., 1999. Trout oestrogen receptor sensitivity to xenobiotics as tested by different bioassays. *Aquaculture* 177, 353-365.
- Pfeifer, S., Schiedek, D., Dippner, J.W., 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 320, 93-103.
- Philippart, J., Ruwet, J.C., 1982. Ecology and distribution of Tilapias. In: Pullin R.S.V., L.-M.R.H.E. (Ed.). *The biology and culture of Tilapias.* ICLARM Conf. Proc, Manila, Philippines, pp. 16-60.
- PNUE, 2001. *Convention de STOCKHOLM sur les polluants organiques persistants.* Stokholm, Suede.
- PNUE, 2009. *Convention de STOCKHOLM sur les polluants organiques persistants.* Geneve.
- Poff, N.L., Brinson, M., Day, J.W., 2002. "Aquatic ecosystems and global climate change". Potential impacts on Inland Freshwater and Coastal Wetland Ecosystems in the United States. In: reports, P.C. (Ed.).
- Pörtner, H., Langenbuch, M., Reipschläger, A., 2004. Biological Impact of Elevated Ocean CO<sub>2</sub> Concentrations: Lessons from Animal Physiology and Earth History. *Journal of Oceanography* 60, 705-718.

## Références bibliographiques

- Portner, H.O., Farrell, A.P., 2008. Physiology and Climate Change. *Science* 322, 690-692.
- Pörtner, H.O., Knust, R., 2007. Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. *Science* 315, 95-97.
- Pörtner, H.O., Langenbuch, M., Michaelidis, B., 2005. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO<sub>2</sub> on marine animals: From Earth history to global change. *J. Geophys. Res.* 110, C09S10.
- Pouyaud, Desmarais, Chenuil, Agnese, Bonhomme, 1999. Kin cohesiveness and possible inbreeding in the mouthbrooding tilapia *Sarotherodon melanotheron* (Pisces Cichlidae). *Molecular Ecology* 8, 803-812.
- Pouyaud, L., Agnèse, J.-F., 1995. Différenciation génétique des populations de *Sarotherodon melanotheron*, Rüppell, 1853. In: Agnese, J.-F. (Ed.). *Comptes rendus de l'atelier Biodiversité et aquaculture en Afrique*. Agnèse Jean-François Abidjan, pp. 66-72.
- Propper, C.R., 2005. The Study of Endocrine-Disrupting Compounds: Past Approaches and New Directions. *Integr. Comp. Biol.* 45, 194-200.
- Pullin, R., Lowe-McConnell, R., 1982. The Biology and Culture of Tilapias. *The International Conference on the Biology and Culture of Tilapias*, pp. 1-351.
- Quay, P., 2002. Ups and Downs of CO<sub>2</sub> Uptake. *Science* 298, 2344.
- Quéro, J.C., Du Buit, M.H., Vayne, J.J., 1998. Les observations de poissons tropicaux et le réchauffement des eaux dans l'Atlantique européen. *Oceanol. Acta* 21, 345-351.
- Rahman, F., Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2001. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Sci. Total Environ.* 275, 1-17.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* 42, 2895-2921.
- Rejiba, F., Bobée, C., Maugis, P., Camerlynck, C., 2012. GPR imaging of a sand dune aquifer: A case study in the niayes ecoregion of Tanma, Senegal. *Journal of Applied Geophysics* 8, 16-20.
- Reynaud, S., Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77, 229-238.
- Rijnsdorp, A.D., Peck, M.A., Engelhard, G.H., Mollmann, C., Pinnegar, J.K., 2009. Resolving the effect of climate change on fish populations. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 66, 1570-1583.
- Rikans, L.E., Hornbrook, K.R., 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1362, 116-127.
- Robertson, L.S., McCormick, S.D., 2012. The effect of nonylphenol on gene expression in Atlantic salmon smolts. *Aquatic Toxicology* 122-123, 36-43.
- Roche, H., Tidou, A., 2009. First Ecotoxicological Assessment Assay in a Hydroelectric Reservoir: The Lake Taabo (Côte d'Ivoire). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 322-326.
- Roche, H., Vollaire, Y., Persic, A., Buet, A., Oliveira-Ribeiro, C., Coulet, E., Banas, D., Ramade, F., 2009. Organochlorines in the Vaccarès Lagoon trophic web (Biosphere Reserve of Camargue, France). *Environ. Pollut.* 157, 2493-2506.
- Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Morris, S., Kelly, C., Kirby, S., Janbakhsh, A., Harries, J.E., Waldock, M.J., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2000. Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish. *Environmental Science & Technology* 34, 1521-1528.
- Roessig, J.M., Woodley, C.M., Cech, J.J., Hansen, L.J., 2004. Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14, 251-275.
- Ronisz, D., Larsson, D.G.J., Forlin, L., 1999. Seasonal variations in the activities of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 124, 271-279.
- Roots, O., 1995. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in the ecosystem of the baltic sea. *Chemosphere* 31, 4085-4097.
- Roy, J.R., Chakraborty, S., Chakraborty, T.R., 2009. Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans: a review. *International Scientific Literatur*, Albertson, NY, Etats-Unis.

## Références bibliographiques

- Sabine, C.L., Feely, R.A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., Bullister, J.L., Wanninkhof, R., Wong, C.S., Wallace, D.W.R., Tilbrook, B., Millero, F.J., Peng, T.-H., Kozyr, A., Ono, T., Rios, A.F., 2004. The Oceanic Sink for Anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Science* 305, 367-371.
- Safe, S.H., 1994. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Impact, Biochemical and Toxic Responses, and Implications for Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 24, 87-149.
- Sall, M., Vanclooster, M., 2009. Assessing the well water pollution problem by nitrates in the small scale farming systems of the Niayes region, Senegal. *Agricultural Water Management* 96, 1360-1368.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T. (Eds.), 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York.
- Sanchez, W., Ait-Aïssa, S., Palluel, O., Ditché, J.M., Porcher, J.M., 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16, 279-287.
- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditché, J.M., Porcher, J.M., 2008. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. *Environment International* 34, 490-498.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J., Aït-Aïssa, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ Toxicol Pharmacol.* 19, 177-183.
- Sanchez, W., Porcher, J.-M., 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28, 150-158.
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfrey, N., Porcher, J.-M., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International* 37, 1342-1348.
- Sancho, E., Ferañdez-Vega, C., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., 2003. Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 434-441.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Andreu, E., 1997. Inhibition of Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Activity in the Eel, *Anguilla anguilla*, by Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38, 132-136.
- Sarkar, A., Nagarajan, R., Chaphadkar, S., Pal, S., Singbal, S.Y.S., 1997. Contamination of organochlorine pesticides in sediments from the Arabian Sea along the west coast of India. *Water Res.* 31, 195-200.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 295-301.
- Scavia, D., Field, J., Boesch, D., Buddemeier, R., Burkett, V., Cayan, D., Fogarty, M., Harwell, M., Howarth, R., Mason, C., Reed, D., Royer, T., Sallenger, A., Titus, J., 2002. Climate change impacts on U.S. Coastal and Marine Ecosystems. *Estuaries Coasts* 25, 149-164.
- Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R.W., 2007. Interactions between climate change and contaminants. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1845-1856.
- Schlenk, D., Lavado, R., 2011. Impacts of climate change on hypersaline conditions of estuaries and xenobiotic toxicity. *Aquatic Toxicology* In Press, Corrected Proof.
- Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquatic Toxicology* 104, 38-47.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.
- Shailaja, M.S., D'Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53, 835-841.
- Sheppard, C., 2001. The Main Issues Affecting Coasts of the Indian and Western Pacific Oceans: A Meta-analysis from Seas at the Millennium. *Marine Pollution Bulletin* 42, 1199-1207.

## Références bibliographiques

- Short, F.T., Neckles, H.A., 1999. The effects of global climate change on seagrasses. *Aquatic Botany* 63, 169-196.
- Simier, M., Blanc, L., Aliaume, C., Diouf, P.S., Albaret, J.J., 2004. Spatial and temporal structure of fish assemblages in an "inverse estuary", the Sine Saloum system (Senegal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 59, 69-86.
- Simier, M., Laurent, C., Ecoutin, J.-M., Albaret, J.-J., 2006. The Gambia River estuary: A reference point for estuarine fish assemblages studies in West Africa. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 69, 615-628.
- Singleton, D.W., Khan, S.A., 2003. Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8, s110-118.
- Smith, G.C., Parrish, J.D., 2002. Estuaries as Nurseries for the *Jacks Caranx ignobilis* and *Caranx melampygus* (Carangidae) in Hawaii. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55, 347-359.
- Smith, P.J., Robertson, S.G., Horn, P.L., Bull, B., Anderson, O.F., Stanton, B.R., Oke, C.S., 2002. Multiple techniques for determining stock relationships between orange roughy, *Hoplostethus atlanticus*, fisheries in the eastern Tasman Sea. *Fisheries Research* 58, 119-140.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Boeck, G., Blust, R., 2002. Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 87-93.
- Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.* 129, 99-112.
- Solé, M., Rodríguez, S., Papiol, V., Maynou, F., Cartes, J.E., 2009. Xenobiotic metabolism markers in marine fish with different trophic strategies and their relationship to ecological variables. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 83-89.
- Specker, J.L., Sullivan, C.V. (Eds.), 1993. Vitellogenesis in fishes status and perspectives. National Research council of Canada, Ottawa, Canada.
- Stagg, R.M., Rusin, J., Brown, F., 1992. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the gills of the flounder (*Platichthys flesus*) in relation to mercury contamination in the Firth of Forth. *Marine Environmental Research* 33, 255-266.
- Stahl, L., Snyder, B., Olsen, A., Pitt, J., 2009. Contaminants in fish tissue from US lakes and reservoirs: a national probabilistic study. *Environ. Monit. Assess.* 150, 3-19.
- Stierhoff, K.L., Targett, T.E., Power, J.H., 2009. Hypoxia-induced growth limitation of juvenile fishes in an estuarine nursery: assessment of small-scale temporal dynamics using RNA:DNA. National Research Council of Canada, Ottawa, ON, Canada.
- Stransky, C., Baumann, H., Fevolden, S.-E., Harbitz, A., Høie, H., Nedreaas, K.H., Salberg, A.-B., Skarstein, T.H., 2008. Separation of Norwegian coastal cod and Northeast Arctic cod by outer otolith shape analysis. *Fisheries Research* 90, 26-35.
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., Hart, A., 2011. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci. Total Environ.* 416, 1-21.
- Sturm, A., da Silva de Assis, H.C., Hansen, P.D., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research* 47, 389-398.
- Sturve, J., Hasselberg, L., Folth, H., Celander, M., Forlin, L., 2006. Effects of North Sea oil and alkylphenols on biomarker responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology* 78, Supplement, S73-S78.
- Sucré, E., Charmantier-Daures, M., Grousset, E., Charmantier, G., Cucchi-Mouillot, P., 2010. Embryonic occurrence of ionocytes in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Cell.Tissue Res.* 339, 543-550.
- Tapie, N., Budzinski, H., Le Ménach, K., 2008. Fast and efficient extraction methods for the analysis of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 2169-2177.
- Tapie, N., Menach, K.L., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., Budzinski, H., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83, 175-185.

## Références bibliographiques

- Teh, S.J., Adams, S.M., Hinton, D.E., 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology* 37, 51-70.
- Theodorakis, C.W., Lee, K.-L., Adams, S.M., Law, C.B., 2006. Evidence of Altered Gene Flow, Mutation Rate, and Genetic Diversity in Redbreast Sunfish from a Pulp-Mill-Contaminated River. *Environmental Science & Technology* 40, 377-386.
- Theodorakis, C.W., Shugart, L.R., 1997. Genetic ecotoxicology II: population genetic structure in mosquitofish exposed in situ to radionuclides. *Ecotoxicology* 6, 335-354.
- Thomas, M., Lazartigues, A., Banas, D., Brun-Bellut, J., Feidt, C., 2012. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediments and fish from freshwater cultured fish ponds in different agricultural contexts in north-eastern France. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 77, 35-44.
- Thompson, S., Budzinski, H., 2000. Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 76, 49-60.
- Thompson, S., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., 1999. Comparison of PCB and DDT Distribution between Water-column and Sediment-dwelling Bivalves in Arcachon Bay, France. *Marine Pollution Bulletin* 38, 655-662.
- Thompson, S., Tilton, F., Schlenk, D., Benson, W.H., 2000. Comparative vitellogenic responses in three teleost species: extrapolation to in situ field studies. *Marine Environmental Research* 50, 185-189.
- Tine, M., de Lorgeril, J., D'Cotta, H., Pepey, E., Bonhomme, F., Baroiller, J.F., Durand, J.-D., 2008. Transcriptional responses of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* to salinity extremes. *Marine Genomics* 1, 37-46.
- Tine, M., de Lorgeril, J., Panfili, J., Diop, K., Bonhomme, F., Durand, J.D., 2007. Growth hormone arid Prolactin-1 gene transcription in natural populations of the black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron* acclimatised to different salinities. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 147, 541-549.
- Tine, M., Guinand, B., Durand, J.D., 2012. Variation in gene expression along a salinity gradient in wild populations of the euryhaline black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron*. *J. Fish Biol.* 80, 785-801.
- Tine, M., McKenzie, D.J., Bonhomme, F., Durand, J.-D., 2011. Salinity-related variation in gene expression in wild populations of the black-chinned tilapia from various West African coastal marine, estuarine and freshwater habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 91, 102-109.
- Toni, C.n., Ferreira, D., Kreutz, L.C., Loro, V.L., Barcellos, L.J.G., 2011. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chemosphere* 83, 579-584.
- Towle, D.W., 1981. Role of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in ionic regulation by marine and estuarine animals. *Mar. Biol. Lett.* 2, 107-122.
- Trape, S., Durand, J.D., Guilhaumon, F., Vigliola, L., Panfili, J., 2009. Recruitment patterns of young-of-the-year mugilid fishes in a West African estuary impacted by climate change. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 85, 357-367.
- Trenberth, K.E., 1997. The use and abuse of climate models. *Nature* 386, 131-133.
- Trewavas, E., 1982. Genetic groupings of Tilapiini used in aquaculture. *Aquaculture* 27, 79-81.
- Trewavas, E. (Ed.), 1983. Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum (Natural History), London.
- Troussellier, M., Got, P., Bouvy, M., Mboup, M., Arfi, R., Lebihan, F., Monfort, P., Corbin, D., Bernard, C., 2004. Water quality and health status of the Senegal River estuary. *Marine Pollution Bulletin* 48, 852-862.
- Tuset, V.M., Lozano, I.J., González, J.A., Pertusa, J.F., García-Díaz, M.M., 2003. Shape indices to identify regional differences in otolith morphology of comber, *Serranus cabrilla* (L., 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 19, 88-93.
- Tyler, C., van der Eerden, B., Jobling, S., Panter, G., Sumpter, J., 1996. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *Journal of*

## Références bibliographiques

- Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology 166, 418-426.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 271-281.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- van der Oost, R., Heida, H., Satumalay, K., van Schooten, F.-J., Ariese, F., Vermeulen, N.P.E., 1994. Bioaccumulation, biotransformation and DNA binding of pahs in feral eel (*Anguilla anguilla*) exposed to polluted sediments: A field survey. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 859-870.
- van der Ven, K., De Wit, M., Keil, D., Moens, L., Van Leemput, K., Naudts, B., De Coen, W., 2005. Development and application of a brain-specific cDNA microarray for effect evaluation of neuro-active pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 141, 408-417.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538.
- Van Straalen, N.M., Timmermans, M.J.T.N., 2002. Genetic Variation in Toxicant-Stressed Populations: An Evaluation of the "Genetic Erosion" Hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8, 983-1002.
- Vargas-Yanez, M., Moya, F., Garcia-Martinez, M.C., Tel, E., Zunino, P., Plaza, F., Salat, J., Pascual, J., Lopez-Jurado, J.L., Serra, M., 2010. Climate change in the Western Mediterranean Sea 1900-2008. *J. Mar. Syst.* 82, 171-176.
- Varis, O., Fraboulet-Jussila, S., 2002. Water Resources Development in the Lower Senegal River Basin: Conflicting Interests, Environmental Concerns and Policy Options. *International Journal of Water Resources Development* 18, 245-260.
- Vega-López, A., Martínez-Tabche, L., Domínguez-López, M.L., García-Latorre, E., Ramón-Gallegos, E., García-Gasca, A., 2006. Vitellogenin induction in the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*: Vitellogenin characterization and estrogenic effects of polychlorinated biphenyls. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 142, 356-364.
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.I.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59, 511-524.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Mancinelli, G., Accomando, R., Smaal, A.C., Orunesu, M., 1995. Stress on stress response: A simple monitoring tool in the assessment of a general stress syndrome in mussels. *Marine Environmental Research* 39, 245-248.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146, 281-300.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416-1427.
- Viganò, L., Arillo, A., Bottero, S., Massari, A., Mandich, A., 2001. First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *The Science of The Total Environment* 269, 189-194.
- VijayaVenkataRaman, S., Iniyan, S., Goic, R., 2012. A review of climate change, mitigation and adaptation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 878-897.
- Vives, I., Canuti, E., Castro-Jimenez, J., Christoph, E.H., Eisenreich, S.J., Hanke, G., Huber, T., Mariani, G., Mueller, A., Skejo, H., Umlauf, G., Wollgast, J., 2007. Occurrence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Lake Maggiore (Italy and Switzerland). *J. Environ. Monit.* 9, 589-598.

## Références bibliographiques

- Walther, G.R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J.M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389-395.
- Wania, F., MacKay, D., 1996. Peer Reviewed: Tracking the Distribution of Persistent Organic Pollutants. *Environmental Science & Technology* 30, 390A-396A.
- Watanabe, I., Sakai, S.-i., 2003. Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environment International* 29, 665-682.
- Watanabe, I., Tatsukawa, R., 1990. Anthropogenic brominated aromatics in the Japanese environment. Proceedings of the Workshops on Brominated Flame Retardants, National Chemicals Inspectorate (KEMI), Stockholm, Sweden, pp. 63-71.
- Waycott, M., Duarte, C.M., Carruthers, T.J.B., Orth, R.J., Dennison, W.C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J.W., Heck, K.L., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Short, F.T., Williams, S.L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 12377-12381.
- Weis, J.S., Candelmo, A., 2012. Pollutants and fish predator/prey behavior: A review of laboratory and field approaches. *Current Zoology* 58, 9-20.
- Wendelaar Bonga, S.E., Lock, R.A.C., 1991. Toxicants and Osmoregulation in Fish. *Netherlands Journal of Zoology* 42, 478-493.
- Wepener, V., van Vuren, J.H.J., Chatiza, F.P., Mbizi, Z., Slabbert, L., Masola, B., 2005. Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 30, 751-761.
- Whitfield, A.K., Elliott, M., 2002. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. *J. Fish Biol.* 61, 229-250.
- Wilson, J.M., Laurent, P., 2002. Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.* 293, 192-213.
- Winter, M.J., Verweij, F., Garofalo, E., Ceradini, S., McKenzie, D.J., Williams, M.A., Taylor, E.W., Butler, P.J., van der Oost, R., Chipman, J.K., 2005. Tissue levels and biomarkers of organic contaminants in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) from rivers in the West Midlands, UK. *Aquatic Toxicology* 73, 394-405.
- Witt, G., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 31, 237-248.
- Witt, G., Trost, E., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of the Baltic Sea and of the German coastal waters. *Chemosphere* 38, 1603-1614.
- Yim, U.H., Hong, S.H., Shim, W.J., Oh, J.R., 2005. Levels of Persistent Organochlorine Contaminants in Fish from Korea and Their Potential Health Risk. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 358-366.
- Zagal, A., Mazmanci, B., 2011. Oxidative stress response in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to textile mill effluent. *Toxicol. Ind. Health* 27, 81-85.
- Zimmerli, S., Bernet, D., Burkhardt-Holm, P., Schmidt-Posthaus, H., Vonlanthen, P., Wahli, T., Segner, H., 2007. Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* 69, 11-25.



## **Abstract:**

The euryhaline black-chinned tilapia *Sarotherodon melanotheron heudelotii* is endemic in West Africa and able to adapt to changes of salinity, to survive and to reproduce in different natural conditions. It is one of rare species to survive in hyperhaline area. Increased of the salinity levels is one of the consequences of climate change in West Africa coastal environments. However coastal zones are also the ultimate sink of chemical contaminants. The aim of this study was to assess the impact of the combined effects of salinity and pollutants in the black-chinned tilapia for evaluate the Senegalese aquatic habitat quality. In accord to this objective physiological marker (condition factor and growth rate) and several biochemical biomarkers to link with osmoregulatory (NKA), xenobiotic metabolisation (EROD, GST), oxidative stress (TBARS), neurotoxicity (AChE) and reproduction (VTG and gonad histopathology) were assessed. Field studies revealed that EROD and NKA can discriminate different sampling site and could be used as biomarkers on pollutants and salinity exposure respectively. The combined effects of salinity and DDT on osmoregulatory were characterized in laboratory conditions. Results showed that influenced the osmoregulatory mechanisms induction of NKA. The results showed that a set of biomarkers to assess effects of multiple stressors can be useful in *S. melanotheron*. In addition, the *S. melanotheron* population structure using morphologic and genetic analysis revealed that otolith shape analysis provides a geographical discrimination and microsatellites analysis allow genetic pool discrimination. Results show the absence of correspondence between the morphologic and genetic patterns. The present study demonstrated that importance of use multi-parametric approach to assess impact of multiple stressors, such as salinity and contaminants on black-chinned tilapia. Further studies should be realized for a better characterize this set of biomarker responses.

**Key words:** climate change, salinity, chemical contaminants, biomarkers, *Sarotherodon melanotheron*

## Résumé :

*Sarotherodon melanotheron* est un poisson euryhalin endémique d'Afrique de l'ouest, qui vit et se reproduit dans tous les milieux aquatiques. Dans cette région où le changement climatique a provoqué l'apparition d'estuaires hypersalés, cette espèce est la seule à survivre en milieu hyperhalin, et constitue donc un excellent modèle biologique. Les milieux aquatiques côtiers sont aussi impactés par de nombreux contaminants issus de l'activité humaine. L'objectif de cette thèse était d'évaluer l'impact des effets croisés de la salinité et des contaminants chez *S. melanotheron* dans des milieux très contrastés au Sénégal en utilisant une approche multi-multiparamétrique. Des indicateurs physiologiques (taux de croissance, facteur de condition) et une batterie de biomarqueurs en lien avec l'osmorégulation (pompe NKA), le métabolisme des xénobiotiques (EROD et GST), la protection vis-à-vis du stress (TBARS), la transmission de l'influx nerveux (AChE) et la reproduction (vitellogénine et histopathologie gonadique) ont été mesurés. Ils ont été complétés par une étude de la diversité génétique et de la forme des otolithes pour différencier les populations. Un dosage préalable de la contamination des sédiments a permis de caractériser précisément les sites échantillonnés. L'induction de l'activité EROD sur le site le plus impacté en HAP et celle de la NKA sur les sites de salinité plus élevée ont montré la sensibilité de ces biomarqueurs. Des expérimentations sur *S. melanotheron* en milieu contrôlé ont permis d'appréhender l'impact des effets combinés de la salinité et du DDT, et de caractériser l'activité NKA. L'analyse de la forme des otolithes et de la génétique des populations de *S. melanotheron* échantillonnées ont montré que la distance géographique semble être discriminante pour les variations morphométriques des otolithes, alors que la variabilité génétique observée traduisait l'histoire de la colonisation postglaciaire et les événements démographiques affectant les populations les plus isolées. Tous les résultats montrent l'intérêt de l'utilisation d'une approche multi-paramétrique pour caractériser l'impact de perturbateurs environnementaux multiples. Des travaux complémentaires permettraient d'affirmer que ce tilapia est un très bon indicateur utilisable dans l'évaluation de la qualité des écosystèmes côtiers en milieu tropical.

**Mots clés :** changement climatique, salinité, pollution chimique, biomarqueurs, *Sarotherodon melanotheron*,