

IMPACT DES PESTICIDES AGRICOLES SUR LES PERFORMANCES PHYSIOLOGIQUES DES POISSONS : CAS DU TIHAN 175 O-TEQ SUR LA REPRODUCTION DES FEMELLES DE *Clarias gariiepinus* EXPOSEES A DES DOSES CHRONIQUES

I. IMOROU TOKO^{1,2}, E. Y. ATTAKPA², P. C. TOBADA³, C. M. BLE⁴, L. N. GUEDEGBA¹ et H. ELEGBE¹

¹Unité de Recherche en Aquaculture et Ecotoxicologie Aquatique (URAEQ), 03 BP : 61 Parakou-URAEQ- Bénin,
E-mail : uraeq_fa_up@yahoo.fr

²Département des Sciences et Techniques de Production Animale (STPA), Faculté d'Agronomie (FA), Université
de Parakou (UP), BP 123, Parakou, Bénin

³Département de Production et Santé Animales (PSA), Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi (EPAC),
Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526, Cotonou, Bénin

⁴Département 'Aquaculture, Centre de Recherches Océanologiques d'Abidjan (CRO), BP V 18 Abidjan, Côte d'Ivoire.

RESUME

L'objectif général de cette étude est de déterminer l'effet du TIHAN 175 O-TEQ sur les paramètres physiologiques de reproduction des géniteurs de *C. gariiepinus* exposés à des doses chroniques. Cette expérimentation s'inscrit dans le cadre d'une étude écotoxicologique réalisée dans le but de mieux connaître l'effet des pesticides sur la biodiversité aquatique. En effet, des géniteurs femelles de *C. gariiepinus* de poids moyen $350,22 \pm 86,44$ g et de longueur totale moyenne $34,15 \pm 4,3$ cm ont été exposées au TIHAN à des doses chroniques de 1 et 10 μ L de TIHAN /L d'eau pendant 45 jours. Au terme de cette durée d'exposition, les performances zootechniques de reproduction des poissons ont été évaluées au moyen de paramètres tels que le taux de fécondité, le taux de fécondation, le taux d'éclosion des œufs et le diamètre des ovules. De même, des paramètres hématologiques (taux d'hémoglobine et hématocrite) et plasmatiques (Na^+ , K^+ , P , Cl^- , Fe^{2+} et les protides sanguins) ont été dosés sur des prélèvements sanguins de sujet exposés ou non au TIHAN. Les résultats hémato-physiologiques obtenus au cours des analyses ont pour la plupart varié très significativement d'un traitement à l'autre. Le taux d'hémoglobine sanguin et d'hématocrite des femelles a tendance à diminuer (significativement dans le cas de l'hémoglobine) avec l'augmentation de la dose d'exposition. La concentration des éléments plasmatiques tels que le Na^+ et le Fe^{2+} a significativement augmenté chez les poissons exposés (notamment avec la dose la plus forte), tandis que la concentration du plasma en K^+ , en Cl^- et en P a significativement baissé au fur et à mesure que la dose d'exposition augmente (entre T0, T1 et T2). Bien que les variations observées au niveau des protides plasmatiques ne soient pas significatives ($p > 0,05$), on note cependant une tendance remarquable d'augmentation de la concentration des protides dans le plasma des poissons exposés au TIHAN, comparativement au témoin. Par contre, on n'a pas observé d'effets significatifs des doses expérimentées sur la majorité des paramètres zootechniques de reproduction mesurés. Seul le diamètre des ovules a significativement varié ($p < 0,05$) d'un traitement à l'autre (1,04 mm, 1,07 mm et 1,07 mm, respectivement avec T0, T1 et T2) après la durée d'exposition.

Mots clés : Pesticides agricoles, paramètres hémato-physiologiques, reproduction des poissons, *Clarias gariiepinus*.

ABSTRACT

IMPACT OF AGRICULTURAL PESTICIDES ON THE PHYSIOLOGICAL PERFORMANCE OF FISH: THE CASE OF TIHAN 175 O-TEQ
ON THE FEMALE REPRODUCTION OF *Clarias gariiepinus* EXPOSED TO CHRONIC DOSES

The main objective of this study was to determine the effect of TIHAN 175 O-TEQ on reproductive performance of broodstock *C. gariiepinus* exposed to chronic doses. This experiment is part of an ecotoxicological study carried out in order to assess the effect of pesticides on aquatic biodiversity. For this purpose, the females

of *C. gariepinus* (mean weight = 350.22 ± 86.44 g ; and mean total length 34.15 ± 4.3 cm) were exposed, in experimental condition, to doses of 1 µg/L and 10 µg/L during 45 days. After each exposure time, the reproductive performances of the experimental fish were assessed by measuring parameters such as fecundity rate, fecundation rate, hatching rate, and ovum diameter. After 45 days of exposure, the blood (hemoglobin and hematocrit) and plasma elements (Na^+ , K^+ , P , Cl^- , Fe^{2+} and protein) were analyzed from blood samples collected in experimental fish. Most of the reproduction parameters did not vary significantly ($p > 0.05$) according to the doses tested. However, after 45 days of exposition, the ovum diameter varies significantly ($p < 0.05$) according to the treatment (1.04 mm, 1.07 mm and 1.07 mm, respectively with T0, T1 and T2). In the blood as well as in the plasma, most of the parameters measured have significantly varied according to the treatments. The hemoglobin concentration and the hematocrit decreased in fishes exposed to TIHAN, comparatively to the control. In the plasma, the elements such as Na^+ and the Fe^{2+} have significantly increased ($p < 0.05$) in fish exposed to TIHAN (T2 group) than the control group (T0). On the other hand, K^+ , Cl^- and P concentrations in fish exposed to TIHAN have decreased significantly. Although the proteins tend to increase in the plasma of fish exposed to TIHAN, no significant differences ($p > 0.05$) were observed among treatments.

Keywords : Agricultural pesticides, blood and plasma parameters, Fish reproduction, *Clarias gariepinus*.

INTRODUCTION

Dans le monde entier, les pesticides constituent la base des paquets technologiques développés dans la lutte contre les adventices et le traitement phytosanitaire des plantes. Depuis quelques années, en Afrique de l'Ouest, il est utilisé en remplacement à l'endosulfan, une nouvelle formule phytosanitaire appelée TIHAN 175 O-TEQ pour le traitement des ravageurs du cotonnier (Agbohessi *et al.*, 2012). Il s'agit d'un binaire acaricide composé de 100 g de flubendiamide et 75 g de Spirotétramate par litre du produit. Le flubendiamide est le premier produit d'une nouvelle classe d'insecticides prometteuse, les benzenedicarboxamides ou diamides de l'acide phtalique (Ebbinghaus *et al.*, 2007). C'est un produit non persistant avec une faible solubilité dans l'eau (0,029 mg/L à 20 °C) et reconnu comme étant un disrupteur endocrinien. Contrairement à la plupart des insecticides qui agissent sur le système nerveux, le flubendiamide trouble la fonction musculaire propre aux insectes en agissant sur le récepteur ryanodine, un canal de sortie du Ca^{2+} impliqué dans la contraction musculaire. Le spirotétramate quant à lui, est un insecticide systémique du groupe 23, c'est-à-dire les dérivés de l'acide tétronique possédant un large spectre d'action avec une solubilité supérieure à celle du flubendiamide. Il n'est persistant ni dans le sol, ni dans l'eau, la biotransformation y étant une voie de transformation importante. Il agit

comme inhibiteur de l'acétyl-CoA carboxylase, une enzyme clé de la biosynthèse des acides gras (PRD, 2007-2008) chez les insectes traités.

L'utilisation de ces produits dans l'agriculture en général et dans la production cotonnière en particulier ont conduit à des augmentations des niveaux de contaminants organiques dans l'environnement. Parmi les milieux récepteurs, ceux aquatiques sont particulièrement vulnérables aux résidus des pesticides utilisés en agriculture. Par ailleurs, comme le montre la figure 1, le milieu aquatique est le réceptacle final de tous ces biocides qui peuvent s'y trouver sous forme dissous dans l'eau, déposés sur les sédiments ou encore accumulés dans les chaînes trophiques (Ernault, 2009). Les organismes aquatiques sont par conséquent en permanence exposés aux résidus de pesticides dont certains peuvent persister plusieurs années dans le milieu. Ces molécules peuvent engendrer, en cas de déversements ponctuels importants, des intoxications aiguës entraînant des mortalités de végétaux, d'invertébrés et de poissons (Ernault, 2009). A plus long terme et de manière moins visible, leur présence chronique, à faible dose, peut entraîner entre autres, une baisse de la fécondité, une perte de poids, des troubles du métabolisme et du comportement, des perturbations biologiques ou physiologiques et du développement sexuel chez les organismes aquatiques en général, les poissons en particulier (Hayes *et al.*, 2006).

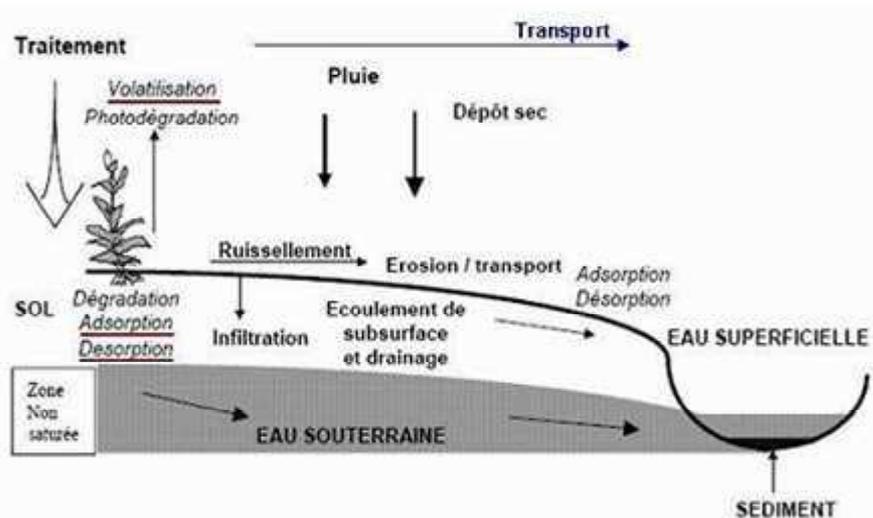


Figure 1 : Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans l'environnement (d'après le schéma conceptuel de INERIS, 2005).

Transfer mechanisms and transformations of pesticides in the environment (from the conceptual schema of INERIS, 2005).

Dans les écosystèmes aquatiques, les poissons, généralement situés à des niveaux supérieurs de la chaîne trophique, constituent des cibles par excellence de divers polluants. Ainsi, dans un milieu contaminé, les poissons absorbent directement via l'eau, par diffusion au travers des branchies ou de la peau et/ou indirectement à partir de nourriture contaminée plus de polluants qu'ils ne peuvent en éliminer naturellement (Gobas *et al.*, 1999). Le niveau de contamination (ou de bioaccumulation) des poissons est d'autant plus élevé lorsque ces derniers sont hydrophobes (lipophiles) ou faiblement hydrosolubles (Abarnou *et al.*, 2000). Il en résulte une rétention durable des substances toxiques dans les tissus de l'animal (viscères, chair, squelette), parfois amplifiée tout au long de la chaîne alimentaire (Ernout, 2009), pouvant représenter un certain niveau de risque pour le poisson lui-même, ou encore ses prédateurs ou consommateurs.

Les poissons en général, révèlent des informations sur leur environnement, mais certains sont plus utiles pour la surveillance de la qualité des eaux que d'autres (Charles et Smol, 1994). *Clarias gariepinus* en particulier est une espèce très utile dans la détermination de l'état sanitaire des eaux. C'est un poisson

benthique et carnivore qui se situe au bout de la chaîne trophique des milieux aquatiques, ce qui le rend plus vulnérable aux substances toxiques persistantes (De Graaf et Janssen, 1996 ; Ramade, 1991). Elle est aussi une espèce présente et bien distribuée dans les bassins hydrographiques du Bénin (Lalèyè *et al.*, 2004). C'est donc l'une des espèces les plus représentatives des populations halieutiques des biotopes aquatiques béninois, notamment ceux du bassin cotonnier béninois où sont déversés annuellement plus de 80 % des pesticides agricoles (AIC, 2008). Par ailleurs, les capacités de cette espèce à supporter les manipulations (De Graaf et Janssen, 1996), de même que la maîtrise de sa reproduction artificielle (Janssen, 1985) font de lui le meilleur candidat pour cette étude.

L'analyse sanguine, essentielle dans de nombreux domaines de recherche ichtyologique de la toxicologie et de la surveillance de l'environnement est considérée comme indicateur possible des changements physiologiques ou pathologiques des poissons (Adedeji *et al.*, 2000). Les indices hématologiques sont des paramètres très importants pour l'évaluation de l'état des poissons. Leurs niveaux de variation dépendent des espèces de poissons, l'âge, le

cycle de la maturité sexuelle et les maladies (Luskova, 1997). Toutefois, ces paramètres sont davantage liés à la réponse de l'organisme entier, c'est-à-dire l'effet sur la survie des poissons, la reproduction et la croissance.

MATERIEL ET METHODES

27 géniteurs femelles de *Clarias gariepinus* de poids moyen $350,2 \pm 86,4$ g et de longueur totale moyenne $34,1 \pm 4,3$ cm ont été acquis à la ferme piscicole du Centre Songhaï de ATAGARA situé à environ 10 km de Parakou (Benin). Ces femelles ont été choisies en fonction de leur stade de maturité sexuelle (ballonnement du ventre) et de l'absence de signes de maladie (par observation visuelle) puis transportées à l'aide de viviers en plastique. Une fois au laboratoire, elles ont été acclimatées pendant 28 jours dans des bacs remplis à l'eau de robinet déchlorée. Durant cette phase, les femelles ont été nourries avec un aliment commercial pour géniteurs de *clarias* (Aliment Coppens, 42 % de protéines, 4,5 mm de diamètre) à raison de 2 % de leur biomasse par jour (à cause du stress causé par le changement de milieu).

DOSES EXPERIMENTALES

Le TIHAN 175 O-TEQ (100 g de flubendiamide et 75 g de spirotétramate par litre de TIHAN) est le produit chimique utilisé pour cette étude. C'est un insecticide nouvelle technologie à formulation moderne utilisé actuellement contre les ravageurs du coton. Il s'agit d'un mélange prêt à l'emploi qui se présente sous forme d'un liquide visqueux de couleur blanc-laiteux.

Trois doses D_0 , D_1 et D_2 de TIHAN ont été testées. La dose D_0 correspond au témoin c'est-à-dire au milieu non contaminé ; la dose D_1 (1 μ L de TIHAN/L d'eau) est la dose environnementale (mesurée dans la rivière Alibori du Benin par Agbohessi *et al.* (2012) ; la dose D_2 (10 μ L de TIHAN/L d'eau) est choisie de façon à être 10 fois plus élevée que la dose D_1 . Ces doses ont été choisies en fonction de la concentration du flubendiamide dans le TIHAN, étant donné qu'il est plus toxique pour les poissons que le spirotétramate. En effet, chez la carpe la LC50 (96 h) du flubendiamide est de 548 μ g/L contre 0,25 mg/L pour le spirotétramate. La dose environnementale du flubendiamide

dans la rivière Alibori étant de 0,1 mg/L (Agbohessi *et al.*, 2012), la quantité de TIHAN qui pourrait correspondre à cette dose a été ainsi déduite.

Les poissons ont été répartis dans trois groupes (T0, T1 et T2) en fonction des concentrations auxquelles ils ont été exposés (0 ; 1 et 10 μ L de TIHAN/L d'eau respectivement pour T0, T1 et T2). Trois traitements ont été donc appliqués. Chaque traitement appliqué en triplicat correspond à une dose expérimentale donnée. Le groupe T0 est le groupe témoin et correspond aux femelles qui n'ont reçu aucune dose de TIHAN dans leur milieu.

EXPOSITION DES GENITEURS AU TIHAN

Pour l'exposition proprement dite, les femelles ont été mises dans différentes solutions (eau + dose de TIHAN correspondante) préparées en fonction des doses expérimentales. La quantité d'eau utilisée pour la préparation de chaque solution était de 80L.

Durant l'exposition, les géniteurs ont été nourris deux fois par jour à raison de 3 % de la biomasse par compartiment. L'aliment commercial Coppens pour géniteurs de *clarias* a été distribué manuellement sous forme de granulés extrudés. La ration journalière est réajustée après chaque pêche de contrôle en fonction de l'évolution de la biomasse, soit tous les 7 jours. Par ailleurs, l'expérimentation a été effectuée en condition semi-statique (pas de renouvellement continu de l'eau durant l'essai) avec renouvellement total de l'eau toutes les 72 heures. Durant toute la période d'exposition qui est de 45 jours, les paramètres physico-chimiques de l'eau ont été quotidiennement relevés.

Après l'exposition c'est-à-dire au J45, du sang a été prélevé chez un lot de femelles pour les analyses biochimiques et un autre lot de femelles a été reproduit artificiellement pour la détermination des performances de reproduction. Environ 1 ml de sang a été prélevé chez les femelles des différents groupes. Au total 9 échantillons de sang ont été prélevés et analysés. Le sang a été prélevé directement dans la veine caudale située au niveau de la ligne latérale avec des seringues de 1 ml adaptées à des aiguilles hypodermiques de 22G.

ANALYSES HEMATOLOGIQUES ET PLASMATIQUE

Chaque échantillon de sang prélevé (± 1 ml) a été transvasé dans un tube (5 ml) hépariné (pour éviter la coagulation) puis secoué lentement de sorte à mélanger l'héparine au sang. Le sang a été reparti dans des tubes eppendorfs et centrifugé à la vitesse de 5000 tours/mn pendant 5 min afin de séparer le plasma du culot. Le plasma a été recueilli dans d'autres tubes eppendorfs stériles et numérotés en conséquence afin d'effectuer le dosage des minéraux et des protides plasmatiques. Une partie du sang entier (non centrifugé) a été aussi maintenu dans les tubes héparinés pour le dosage de l'hémoglobine et de l'hématocrite.

Dans le sang entier

Le taux d'hémoglobine et l'hématocrite ont été dosés dans les différents échantillons de sang prélevés suivant les protocoles ci-après :

A l'aide des micro-tubes à hématocrite, nous avons prélevé du sang dans chaque tube à hémolyse et avec la pâte à modeler nous avons bouché les micro-tubes pour empêcher les fuites de sang dans l'appareil. Les micro-tubes ont été disposés dans une centrifugeuse (HAEMATOKRIT 210) et les échantillons de sang ont été centrifugés à 12 000 tours/minute pendant 5 min. Après la centrifugation du sang, la lecture de l'hématocrite a été faite à l'aide d'une platine graduée en pourcentage.

Pour le dosage de l'hémoglobine, nous avons prélevé, à l'aide d'une pipette graduée en μL , successivement 2 500 μl de liquide Drabkin et 10 μl de sang le tout mélangé dans un tube à hémolyse. Cette opération a été répétée pour chaque échantillon. Chaque tube à hémolyse est placé dans un spectrophotomètre électronique de marque VITAL SCIENTIFIC MICROLAB 300, et la lecture du taux d'hémoglobine (en g/dl) dans chaque échantillon est effectuée après quelques secondes.

Dans le plasma

Dans les échantillons de plasma nous avons dosé quelques minéraux de même que les protides plasmatiques.

Le dosage du Potassium (K^+), du Sodium (Na^+) et du Chlore (Cl^-) a été fait grâce à un automate

électronique de marque EASYLYTE PLUS muni d'une sonde qui après aspiration du plasma brute (sans réactif) affiche la valeur de ces trois éléments en mEq/L

La procédure utilisée pour le dosage du Phosphore (P) est la même que celles des dosages du Fer (Fe^{2+}) et des Protides. Elle a consisté à mélanger le plasma avec le réactif correspondant à chaque élément puis à effectuer la lecture au spectrophotomètre électronique (VITAL SCIENTIFIC MICROLAB 300).

EVALUATION DES PARAMETRES ZOOTECHNIQUES DE REPRODUCTION DE *C. gariepinus*

Un échantillon de géniteurs femelles de chaque traitement (1 géniteur par replicat) a été utilisé pour la reproduction artificielle afin de déterminer des performances de reproduction.

A cet effet, un lot de 15 mâles matures de *C. gariepinus* a été maintenu non exposé durant la phase de contamination puis utilisé pour les essais de reproduction artificielle.

Reproduction artificielle

La reproduction artificielle des poissons a été effectuée suivant le procédé classique décrit par Janssen (1985) à savoir :

- choix des géniteurs ;
- induction hormonale des géniteurs ;
- récolte de la laitance et extraction manuelle des œufs ;
- fécondation des œufs ;
- incubation des œufs.

Sélection des géniteurs

La sélection des géniteurs mâles et femelles a été faite exclusivement sur la base de critères externes. Dans chaque traitement nous avons choisi au J45 une femelle présentant une papille génitale protubérante, un abdomen bien dilaté qui sous légère pression émet quelques ovules. Les mâles de *C. gariepinus* utilisés ont été choisis sur la base de leur corpulence (embonpoint), ce qui très souvent justifie le bon développement de leurs testicules.

Au total 9 femelles et 3 mâles ont été sélectionnés pour la reproduction artificielle.

Induction hormonale des géniteurs

Afin de faciliter la maturation finale des ovules et donc leur expulsion par stripping (faible pression sur l'abdomen), les géniteurs femelles ont été induits par injection hormonale. L'OVAPRIM®, qui est un cocktail d'hormones de synthèse a été utilisé à la dose de 0,5 mL/kg pour induire toutes les femelles. Après avoir pesé le géniteur et prélevé le volume d'hormone à injecter, l'hormone a été introduite dans la musculature dorsale du poisson immobilisé dans une toile en coton. Après l'injection, l'endroit de la piqûre est frotté délicatement avec les doigts pour bien distribuer l'hormone dans les muscles (Coche et Muir, 1999) puis nous avons remis les géniteurs individuellement en stabulation (pendant 12 à 16 heures), chacun dans un aquarium contenant de l'eau non contaminée et à température ambiante (25 à 26 °C).

Fécondation et incubation des œufs

Après 12 à 16 heures de temps de latence, les femelles injectées sont délicatement pêchées (à l'aide d'une épuisette) et les œufs ont été récoltés par stripping. Les ovules ont été collectés à sec dans un bol en plastique puis pesés à l'aide d'une balance de marque SARTORIUS et de précision 0,001 g. Après cela, des échantillons d'ovules pesés ont été mis dans des tubes eppendorfs pour leur dénombrement en vue de déterminer le taux de fécondité et le diamètre des ovules (à l'aide d'une règle graduée au mm et d'un papier millimétré) à partir d'un échantillon de 100 ovules par femelle. Bien avant la récolte des ovules, des mâles ont été sacrifiés pour extraire leurs testicules. Les testicules ont été ensuite broyés dans un tube en verre puis la laitance répandue uniformément sur les ovules. A l'aide d'une plume de volaille, les ovules et la laitance ont été soigneusement mélangés pendant une à deux minutes. Un volume d'eau égal à celui des œufs a été à chaque fois ajouté au mélange pour provoquer l'activation des spermatozoïdes et la fécondation. Des échantillons (03 échantillons à chaque fois) de ce mélange ont été prélevés et mis dans des boîtes de pétri pour le comptage des œufs fécondés (à l'aide d'une loupe binoculaire) afin d'évaluer le taux de fécondation. Les ovules ainsi fertilisés ont été mis en incubation dans des auges d'incubation de

fabrication locale. Les ovules fertilisés de chaque femelle ont été répartis en 3 lots de 200 œufs environ, et chaque lot a été incubé dans une auge. Les trois auges d'incubation correspondant à une même femelle ont été maintenues dans un même aquarium.

L'incubation des œufs a été réalisée dans un dispositif constitué de 9 aquariums rectangulaires en plastique (volume 30 L) numérotés en fonction du traitement et du réplicat. Dans chaque aquarium nous avons disposé 3 incubateurs (auges d'incubation), et les aquariums ont été disposés sur une étagère. Chaque aquarium contenant 20 L d'eau non contaminée est muni d'un diffuseur d'air (par bulleurs) relié à un compresseur qui assure la réoxygénation de l'eau. Les œufs fécondés sont étalés sur les incubateurs de sorte à éviter que les œufs ne se condensent à un endroit.

Toutes les 4 heures durant l'incubation, les œufs morts (œufs ayant blanchi) ont été comptés dans chaque auge d'incubation. Douze heures après le début de l'incubation, les auges ont été minutieusement et régulièrement (toutes les 30 minutes) observées (à l'aide d'une loupe manuelle) afin d'identifier l'heure de la première (temps qui s'écoule entre l'heure du début de l'incubation et l'heure correspondant à l'éclosion du premier œuf dans chaque incubateur) et de la dernière éclosion dans chaque aquarium. Entre la première et la dernière heure d'éclosion le nombre d'œufs éclos a été recensé dans chaque auge.

PARAMETRES CALCULES

Les différentes données collectées nous ont permis de calculer les paramètres de reproduction (Tableau 1).

ANALYSES STATISTIQUES

Le logiciel STATISTICA version 16. a été utilisé pour les analyses statistiques. L'analyse de variance à un facteur de classification (ANOVA 1) a été utilisée pour la comparaison des paramètres hématologiques et physiologiques des géniteurs exposés aux différentes doses de TIHAN. Le test de Scheffé nous a permis de comparer les traitements deux à deux en ce qui concerne les paramètres hématologiques et physiologiques. Pour toutes ces comparaisons statistiques le seuil de significativité a été fixé à 5 %.

Tableau 1 : Formules des paramètres de reproduction..*Formulas of reproductive parameters.*

Paramètres	Formules
Taux de fécondité	(Nombre d'ovules récoltés par femelle / poids de la femelle (kg)) x 100
Taux de fécondation	(Nombre d'œufs fécondés / Nombre d'ovules fertilisés) x 100
Taux d'éclosion	(Nombre d'œufs éclos / Nombre d'œufs fécondés) x 100

RESULTATS

EFFET DU TIHAN SUR LES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES

Taux d'hémoglobine

La variation du taux d'hémoglobine dans le sang des géniteurs femelles de *C. gariepinus* exposés à différentes doses de TIHAN est présentée sur la Figure 2.

L'analyse de ce graphique révèle que le taux d'hémoglobine est affecté par l'exposition des géniteurs au TIHAN. Les poissons exposés au

pesticide ont des taux d'hémoglobine significativement ($p < 0,05$) plus bas que les témoins.

Taux d'hématocrite

La fraction d'hématocrite des géniteurs femelles de *C. gariepinus* exposés à différentes doses de TIHAN est présentée sur la Figure 3. Bien que le taux d'hématocrite sanguin des poissons ait peu varié d'un traitement à l'autre (entre 42 et 48 %), on note une tendance remarquable, mais pas significative ($p > 0,05$) à la réduction du taux d'hématocrite chez les géniteurs exposés au traitement T2.

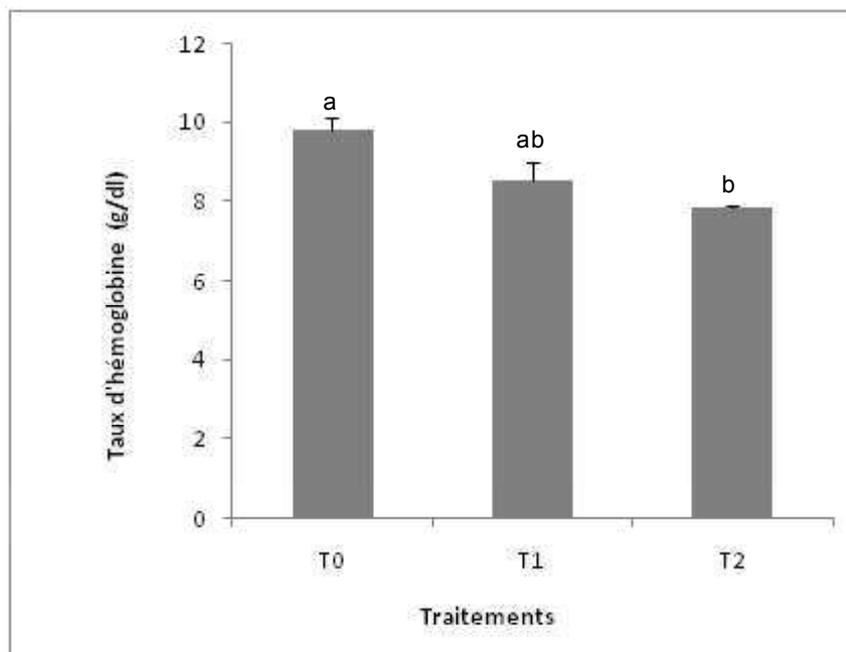


Figure 2 : Taux d'hémoglobine sanguin des géniteurs femelles de *C. gariepinus* exposées pendant 45 jours à différentes doses chroniques de TIHAN.

*Rate of blood hemoglobin broodstock in female broodstock of *C. gariepinus* exposed for 45 days at different chronic doses of TIHAN*

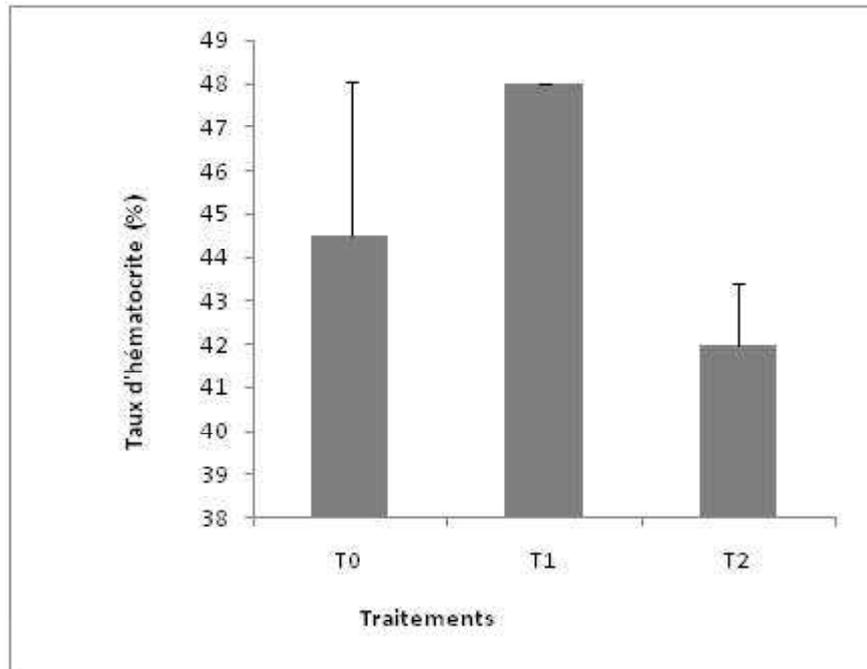


Figure 3 : Taux d'hématocrite sanguin des géniteurs femelles de *C. gariepinus* exposées pendant 45 jours à différentes doses chroniques de TIHAN.

Rate of blood hematocrit in female broodstock of C. gariepinus exposed for 45 days at different chronic doses of TIHAN

Effet sur les minéraux et protéines plasmatiques

La concentration en Na^+ dans le plasma a été significativement ($p < 0,05$) affectée par l'exposition des géniteurs au TIHAN. Les géniteurs exposés au TIHAN (T1 et T2) ont des concentrations plasmatiques en Na^+ plus élevées que les géniteurs non exposés au pesticide (Tableau 2).

Contrairement au Na^+ , la concentration en K^+ dans le plasma des poissons montre une tendance à la baisse au fur et à mesure que la dose de TIHAN augmente dans le milieu. Les poissons du traitement T2 ont des concentrations plasmatiques en K^+ significativement plus faibles ($p < 0,05$) que les poissons du traitement T1 et du lot témoin (Tableau 2).

La concentration en Cl^- dans le plasma des géniteurs du traitement T2 est significativement ($p < 0,05$) plus faible comparativement aux traitements T1 et T0 qui sont aussi significativement différents ($p < 0,05$) (Tableau 2).

Comme pour le Na^+ dans le plasma, les géniteurs exposés au TIHAN (T1 et T2) ont des concentrations plasmatiques en Fe^{2+} significativement

($p < 0,05$) plus élevées que les géniteurs non exposés au pesticide (Tableau 2).

La variation du P dans le plasma a suivi les mêmes tendances que celle du Cl^- chez les géniteurs femelles exposés. Les géniteurs du traitement T2 ont les plus faibles ($p < 0,05$) concentrations plasmatiques en P comparativement aux traitements T1 et T0 qui sont aussi significativement différents ($p < 0,05$) (Tableau 2).

Pour les concentrations en protide, on ne note aucune différence significative (Tableau 2).

EFFET DU TIHAN SUR LES PARAMETRES ZOOTECHNIQUES DE REPRODUCTION DE *C. gariepinus*

Les paramètres zootechniques analysés (Tableau 3) n'ont présenté aucune différence significative entre les différents traitements ($p > 0,05$) sauf le diamètre des œufs issus des femelles qui a présenté une différence significative entre les traitements ($p < 0,05$). On a constaté que les diamètres des œufs issus des femelles exposées sont significativement supérieurs au diamètre des œufs des femelles témoins.

Tableau 2 : Teneurs en minéraux et en protéines plasmatiques mesurées chez les femelles de *C. gariepinus* après leur exposition au TIHAN.*Mineral and plasma proteins contents in female of C. gariepinus after TIHAN exposure.*

Paramètres	Traitements	Moyenne*	P
Na ⁺ (mEq/L)	T0	105,7 ± 0,8 ^a	***
	T1	111,8 ± 0,07 ^b	
	T2	112,9 ± 0,3 ^b	
K ⁺ (mEq/L)	T0	44,12 ± 0,55 ^a	***
	T1	42,82 ± 0,02 ^a	
	T2	38,46 ± 0,18 ^b	
Cl ⁻ (mEq/L)	T0	105,9 ± 0,00 ^a	***
	T1	109,7 ± 0,28 ^b	
	T2	103,2 ± 0,07 ^c	
Fe ²⁺ (µg/dl)	T0	30,72 ± 0,56 ^a	***
	T1	48,51 ± 0,23 ^b	
	T2	43,35 ± 0,71 ^c	
P (mg/dl)	T0	6,81 ± 0,03 ^a	***
	T1	7,18 ± 0,01 ^b	
	T2	6,27 ± 0,00 ^c	
Protéines (g/L)	T0	51,65 ± 0,05	ns
	T1	53,88 ± 0,72	
	T2	54,92 ± 2,3	

*Les valeurs représentent la moyenne ± l'ecartype ; ***Indique que les différences sont significatives au seuil de 5 % ; ns signifie que les différences observées ne sont pas significatives au seuil de 5 %.

Tableau 3 : Paramètres de reproduction mesurés chez les femelles de *C. gariepinus*.*Reproductive parameters measured in female of C. gariepinus.*

Paramètres	Traitements	Moyenne*	P
Taux de Fécondité	T0	67501,97 ± 11296,04	ns
	T1	68215,77 ± 43518,73	
	T2	39712,58 ± 11668,51	
Taux de Fécondation	T0	99,42 ± 0,18	ns
	T1	78,95 ± 35,8	
	T2	98,11 ± 0,9	
Diamètre des ovules	T0	1,04±0,02a	***
	T1	1,07±0,01b	
	T2	1,07±0,00b	
Taux d'éclosion	T0	64,18 ± 13,74	ns
	T1	79,6 ± 13,74	
	T2	71,95 ± 16,54	

*Les valeurs représentent la moyenne ± l'ecartype ; ***Indique que les différences sont significatives au seuil de 5 % ; ns signifie que les différences observées ne sont pas significatives au seuil de 5 %.

DISCUSSION

Chez les animaux en général, et les poissons en particulier, la qualité des gamètes sexuels dépend de l'ensemble du processus de gamétogenèse qui est contrôlé par des neuro-hormones ou des hormones originaires soit de l'hypophyse (gonadostimuline ou GtH), soit des gonades (stéroïdes sexuels : androgènes, œstrogènes et progestagènes). Étant donné que le sang joue un rôle majeur dans les processus endocriniens, sa qualité est déterminante pour l'évaluation des performances de reproduction chez les animaux dont les poissons (Golovina, 1996 ; Luskova, 1997 ; Zhitrineva *et al.*, 1989 ; Svoboda *et al.*, 2001 ; Adedeji *et al.*, 2009). Plusieurs études ont aussi montré que lors de l'exposition des poissons aux polluants toxiques, les changements physiologiques ou comportementaux observés sont souvent dus à des modifications des paramètres hématologiques et/ou plasmatiques (Vosylienne, 1999 ; Van Vuren, 1986 ; Fernades et Mazon, 2003 ; Adedeji *et al.*, 2009). Dans le cadre de notre étude, l'exposition des géniteurs femelles de *C. gariepinus* au TIHAN a montré des variations significatives sur la qualité hématologique et plasmatique des individus exposés comparativement aux sujets témoins (non exposés au TIHAN). En effet, le taux d'hémoglobine qui est responsable du transport d'oxygène dans le sang a significativement diminué chez les femelles de *C. gariepinus* exposées au TIHAN, comparativement aux femelles non exposées. Le taux d'hématocrite, qui renseigne sur le déficit sanguin en Fer, et l'anémie (Gatlin et Wilson, 1986 ; Rehulka, 2002a ; Rehulka, 2002b) a aussi montré une tendance à la baisse chez les sujets exposés au TIHAN. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par Adedeji *et al.* (2009) chez des géniteurs sauvages et en captivités de *C. gariepinus* exposés au diazinon (pesticide organophosphoré). Chez des géniteurs de *C. batrachus* exposés au dichlorvos (organophosphoré), Bebarji et Rajendranath (1990) ont également observé des changements négatifs dans les paramètres hématologiques, comparativement aux sujets non exposés. Svoboda *et al.* (2001) rapportent également des résultats similaires chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) exposé au diazinon.

En plus des modifications hématologiques observées chez les géniteurs exposés au TIHAN, la concentration plasmatiques des éléments tels

que le Na⁺, le K⁺, le Cl⁻, le P et le Fe²⁺ ont aussi varié significativement ($p < 0,05$) en fonction des doses d'exposition. En effet, les éléments minéraux sont indispensables à toutes les fonctions organiques et interviennent dans tous les métabolismes de l'organisme (Watanabe *et al.*, 1997 ; Guillaume *et al.*, 1999 ; Lall, 2002). Ils entrent dans la constitution des tissus animaux, dans l'élaboration des hormones (y compris sexuelles) et servent également de régulateurs des fonctions organiques par leur action équilibrante (Watanabe *et al.*, 1997 ; Lall, 2002). Par exemple le potassium (K⁺) et le sodium (Na⁺) interviennent dans les échanges cellulaires et jouent de ce fait un rôle important dans l'équilibre acido-basique (Watanabe *et al.*, 1997 ; Lall, 2002). Le chlore étant le principal anion du sang, de la lymphe et de la grande majorité des liquides de l'organisme apparaît donc comme le régulateur de l'équilibre acide/basique dans l'organisme (Lall, 2002). Il intervient dans le bon fonctionnement du foie, organe qui produit la vitellogénine (VTG qui est une lipoglycophosphoprotéine) transportée par le sang puis clivée en protéines vitellines et stockée dans les ovocytes sous forme de globules vitellins (Scott *et al.*, 1983 ; Wallace et Selman, 1981 ; Ng et Idler, 1983 ; Tyler, 1991 ; Kime, 1993). Les faibles teneurs plasmatiques en Cl⁻ observées chez les géniteurs de *C. gariepinus* exposés aux fortes doses de TIHAN a certainement affecté la production de VTG ce qui peut aussi expliquer les faibles diamètres ovocytaires chez ces mêmes géniteurs.

Le phosphore par contre, participe à la croissance et à la régénérescence des tissus et aide à maintenir à la normale le pH du sang (Wilson *et al.*, 1982 ; Lall, 2002). Quant au fer, il est essentiel au transport de l'oxygène et à la formation des globules rouges dans le sang. Il joue aussi un rôle dans la fabrication de nouvelles cellules, des hormones et des neurotransmetteurs (messagers de l'influx nerveux).

De façon générale, les minéraux agissent de façon directe ou indirecte dans la reproduction des organismes. Les travaux réalisés dans ce domaine montrent que des déséquilibres en minéraux altèrent le fonctionnement de l'ensemble hypothalamus-hypophyse-gonade et donc pourrait perturber la gamétogenèse (Legendre et Jalabert, 1988). Chez les bovins par exemple, le fonctionnement ovarien est sensible à de nombreux oligoéléments. Selon Amélie (2009), leur carence serait à l'origine de différentes affections du post-partum,

d'avortement et d'altérations des paramètres de reproduction.

Enfin, bien que la teneur en protéines du plasma n'ait pas été significativement influencée par les doses de TIHAN testées, il paraît néanmoins important de signaler que le transport des œstrogènes (principalement du 17- β œstradiol) des gonades jusqu'au foie (où ils stimulent la production de la VTG) se fait via la circulation sanguine par les protéines spécifiques ou l'albumine (Legendre et Jalabert, 1988).

CONCLUSION

Au terme de cette étude sur l'impact des pesticides sur les performances de reproduction des poissons exposés aux pesticides, les résultats obtenus sur les paramètres physiologiques de la reproduction de *C. gariepinus* contribueront certainement à une meilleure gestion de ces polluants dans les écosystèmes aquatiques. En effet dans les paramètres hématologiques et plasmatiques, on a observé des baisses significatives du taux d'hémoglobine et du taux d'hématocrite chez les géniteurs exposés au TIHAN. Les concentrations du plasma en Na⁺, K⁺, Cl⁻, P et Fe²⁺ des géniteurs exposés au TIHAN pendant 45 jours ont été également significativement affectées.

Cette étude a permis d'améliorer la connaissance des effets de deux concentrations du pesticide TIHAN sur quelques paramètres physiologiques d'un poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*), contribuant ainsi au développement de la recherche appliquée et fondamentale de la toxicologie aquatique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs présentent leurs sincères remerciements à la Commission Universitaire au développement (CUD) de Belgique qui a contribué au financement de cette étude à travers la Bourse PostDoc CUD 2011 accordée au Dr Imorou Toko. Nos remerciements vont également à l'endroit du Conseil Scientifique de l'Université de Parakou (Bénin), qui a apporté un soutien financier à la réalisation des travaux.

REFERENCES

- Abarnou A., Burgeot T., Chevreuil M., Leboulenger F., Loizeau V., Madoulet-Jaouen A. et C. Minier. 2000. Les contaminants organiques : quels risques pour le monde vivant ? Ed. Ifremer. 35 p.
- Adedeji O. B., Adedeji O. A., Adeyemo O. K. et S. A. Agbede. 2009. Acute Effects Of Diazinon On Blood Paramters In The African Catfish (*Clarias Gariepinus*): The Internet Journal of Hematology, 5 (2) : 1 - 8.
- Agbohessi T. P., Imorou Toko I. et P. Kestemont. 2012. Etat des lieux de la contamination des Écosystèmes aquatiques par les pesticides organochlorés dans le bassin cotonnier béninois. Cah. Agric. 21 : 46 - 56.
- AIC. 2008. Plan de campagne agricole cotonnière 2008 - 2009 et perspectives 2009 - 2010. Cotonou. 35 p.
- Périé A. 2009. Alimentation bovine Sciences et pratique N° 1029 (www.depecheveterinaire.com)
- Bebarji and Rajendranth. 1990. Haematological changes induced by an organophosphorus insecticide in a fresh water fish *Clarias batrachus* (Linnaeus). Trop. Fresh water. Biol. 2 : 197 - 202.
- Charles D. F. and J. P. Smol. 1994. Long-term chemical changes in lakes - Quantitative inferences from biotic remains in the sediment record. - In : Environmental Chemistry of Land and Reservoirs. Amer Chemical Soc, pp 3 - 31.
- Coche A. G. et J. F. Muir. 1999. Méthode simples pour l'aquaculture, pisciculture continentale : la gestion, la ferme et ses stocks. FAO. Rome. 341 p.
- De Graaf G. et H. Janssen. 1996. Artificial reproduction and pond rearing of the African catfish *Clarias gariepinus* in Sub-Sahara Africa, a hand book. FAO Fisheries technical paper, 71 p.
- Ebbinghaus-Kintscher U., Lümmen P., Raming K., Masaki T. and N. Yasokawa. 2007. Flubendiamide, the first insecticide with a novel mode of action on insect ryanodine receptors. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 60 (2) : 117 - 140.
- Ernoul E. 2009. Etude de la contamination des bassins versants du layon et de l'aubance

- par les produits phytosanitaires et de leur bioaccumulation potentielle chez le poisson d'eau douce. Memoire pour le Master Eau Santé Environnement, Option Qualité des écosystèmes aquatiques, 76 p.
- Fernandes M. N. et A. F. Mazon. 2003. Environmental pollution and Fish gill morphology. Inval A.L. et B.G. Kapor (Eds.). Fish Adaptation. Sci Pub. Enfield USA. pp. 203 - 231.
- Gaitlin D. M., III et R. P. Wilson. 1986. Dietary copper requirement of fingerling channel catfish. Aquaculture, 54 : 277 - 285.
- Gobas F. A. P. C., Wilcockson J. B., Russell R. W. and G. D. Haffner. 1999. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. Environmental Science and Technology, 33 : 133 - 141.
- Golovina N. A. 1996. Morpho-Functional Characteristics of the blood of fish as objects of aquaculture. Doctorial thesis. Moscow, p 53.
- Guillaume J., Kaushik S., Bergot P. et R. Metailler. 1999. Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustace' s. Ed. INRA, Paris.
- Hayes T. B., Stuart A. A., Mendoza M., Collins A., Noriega N., Vonk A., Johnston G., Liu R. and D. Kpodzo. 2006. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17beta-estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. Environ Health Perspect, 114 (1) : 134 - 141.
- Janssen J. A. L. 1985. Elevage du poisson-chat africain *Clarias lazera* en RCA.4. Alimentation. Bangui, FAO, FAO/GCP/CAF/007NET, Doc. Tech. N°25, 16 p.
- Kime D. O. 1993. Classical and non classical reproductive steroids in fish. Rev. Fish Biol. Fish, 3 : 160 - 180.
- Lall S. P. 2002. The minerals In : Fish Nutrition, 3rd eds (Halver, J.E. et Hardy, R.W. eds). Academic Press, New York. pp. 259 - 308.
- Lalèyè P., Chikou A., Philippart J. C., Teugels G. G. et P. Vande Walle. 2004. Etude de la diversité ichtyologique du bassin du fleuve Ouémé au Bénin (Afrique de l'Ouest). Cybium, 28 : 329 - 339.
- Legendre M. et B. Jalabert. 1988. Physiologie de la reproduction In Lévêque Christian (Eds.), Bruton M. N. (Eds.), Ssentongo G. W. (Eds.) : Biologie et écologie des poissons d'eau douce africains. ORSTOM, Paris pp 153 - 175.
- Luskova V., 1997: Annual cycles and normal values of haematological parameters in fishers. Acta Sc. Nat. Brno. 31 (5) : 70 - 76.
- Ng T.B., Idler D.R, 1983: Yolk formation and differentiation in teleost fishes In Hoar W.S., Randall D.J., Donaldson E.M. (Eds.), Fish Physiology, Vol. IX-A. Academic Press, Inc., London. pp 373 - 404.
- PRD (Projet de décision d'homologation) du spirotétramate, 2008-07: Publication par l'Agence de Réglementation de la lutte antiparasitaire de Santé Canada ; p 134.
- Ramade F, 1991: Caractères écotoxicologiques et impact environnemental potentiel des principaux insecticides utilisés dans la lutte anti-acridienne. Ed. AUPELF-UREF pp. 179 - 191.
- Rehulka J. 2002a: Aeromonas causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinial Pathology, haematology and biochemistry. Acta Vet Brno. 71: 351-360.
- Rehulka, J. 2002b: Effect of polychlorinated biphenyls Delor 103 on some haematological and biochemical indices of the blood plasma of the rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). In: The second PCB workshop. Recent Advances in the Environmental Toxicology and Health Effects of PCBs. Brno, Czech Republic. May 07-11, 2003. Book of Abstracts, p 36.
- Scott A.P., Sumpter J.P., Hardiman P.A., 1983: Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Gen. Comp. Endocrinol., 49: 128-134.
- Svoboda M., V. Luskova, J. Drastihova, V. Zlabek. 2001: the effect of diazinon on haematological indces of common carp (*Cyprinus carpio*) Acta Vet. Brno, 70 : 457 - 465.
- Tyler C.R. 1991. Vitellogenesis in salmonids. In Scott A.P., Sumpter 1., Kime D., Rolfe M.(Eds): Proceedings of IV International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Fish Symp. 91 Sheffield, pp. 295 - 299.

- Van Vureen J. H. J. 1986. The effects of toxicants on haematology of *Labeo umbratus* (Teleostei cyprinidae). *Comparative Biochemistry & Physiology* 83. 155 - 159.
- Vosyliene M. Z. 1999. The effect of heavy metal mixture of haematological parameters of rainbow trout. *Heavy metals in environment. An integrated approach*. D. A. Lovejoy (Eds.) pp. 295 - 298.
- Watanabe T., Kiron V. et S. Satoh. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151, 185 - 207.
- Wallace R. A. and K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocytes growth in teleosts. *Amer. Zool.*, 21 : 325 - 343.
- Wilson R. P., Robinson E. H., Gatlin D. M. III and W. E. Poe. 1982. Dietary phosphorus requirement of channel catfish. *J. Nutr.*, 112, 1197 - 1202.
- Zhitrineva L. D., Poltavceva T. G. and O. A. Rudnickoja. 1989. Atlas of normal and pathological cells in 23256526 the blood of fish. Rostov-on-Don, 112 p.