

## Réponse à un stress environnemental induit par le cuivre (Cu<sup>2+</sup>) chez le poisson d'eau douce Tilapia « *Oreochromis niloticus* ».

MEKNACHI Abdellah<sup>1,2</sup>, DJELLALI Mostapha<sup>1</sup>, KOURDALI Sidali<sup>1</sup>, BADIS Abdelmalek<sup>2</sup>

### Résumé

La biosurveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques à travers des indicateurs biologiques (Biomarqueurs) est largement utilisée dans les différents programmes internationaux de surveillance environnementale. En complément de l'approche chimique, la mesure de biomarqueurs permet de disposer d'information sur la nature et le niveau de la contamination chimique mais aussi sur la santé des organismes vivants et des populations des écosystèmes aquatiques. Dans ce travail nous avons utilisé le Tilapia (*Oreochromis niloticus*), poisson d'eau douce, comme modèle d'étude afin de mettre en évidence les réponses à un stress induit par le cuivre Cu<sup>2+</sup> dissous dans le milieu d'élevage. Parmi les biomarqueurs, la mesure de marqueurs biochimiques tels que l'activité catalase (CAT) et l'activité protéase (P<sub>ase</sub>) chez les poissons paraît particulièrement intéressante en termes de sensibilité, spécificité et précocité. Les résultats ont montré que l'exposition du modèle choisi au cuivre a fait augmenter l'induction enzymatique CAT au niveau du foie (~ 70 U/mg Protéines après 42 jours d'exposition) et des branchies (~120 U/mg Protéines 42 jours d'exposition) et ceci en comparaison avec le test témoin (~40 et 30 U/mg Protéines dans le foie et dans les branchies, respectivement). En parallèle, La diminution de l'activité protéase chez les Tilapias stressés par le cuivre, mesurée au niveau de l'intestin, reflète éventuellement le résultat d'une perturbation physiologique de l'enzyme digestive des espèces testées. Ces deux réponses biochimiques (CAT et P<sub>ase</sub>), pourraient être intégrées utilement comme des biomarqueurs de stress non spécifique, dans un réseau pérenne de mesure en routine de la qualité et de la santé des écosystèmes aquatiques.

**Mots-clés :** Biosurveillance, Biomarqueurs, *Oreochromis niloticus*, Cu<sup>2+</sup>, Catalase, Protéase.

### Abstract

Biomonitoring of the quality of aquatic ecosystems through biological indicators (Biomarkers) is widely used in various international environmental monitoring programs. In addition to the chemical approach, the measurement of biomarkers provides information on the nature and level of chemical contamination but also on the health of living organisms and populations of aquatic ecosystems. In this work we used Tilapia (*Oreochromis niloticus*), a freshwater fish, as a study model in order to highlight the responses to stress induced by copper Cu<sup>2+</sup> dissolved in the farming environment. Among the biomarkers, the measurement of biochemical markers such as catalase activity (CAT) and protease activity (P<sub>ase</sub>) in fish seems particularly interesting in terms of sensitivity, specificity and precocity. The results showed that exposure of the

<sup>1</sup> Centre Nationale de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture

<sup>2</sup> Département de chimie industrielle, Université de Blida

selected model to copper increased CAT enzyme induction in the liver (~70 U/mg Protein after 42 days of exposure) and gills (~120 U/mg Protein 42 days of exposure) and this in comparison with the control test (~40 and 30 U/mg Protein in the liver and in the gills, respectively). In parallel, the decrease in protease activity in Tilapias stressed by copper, measured at the level of the intestine, possibly reflects the result of a physiological disturbance of the digestive enzyme of the species tested. These two biochemical responses (CAT and Pasa), in the process of being fully validated, could be usefully integrated as biomarkers of non-specific stress, in a permanent network for routine measurement of the quality and health of aquatic ecosystems.

**Keywords:** Biomonitoring, Biomarkers, *Oreochromis niloticus*, Cu<sup>2+</sup>, Catalase, Protease.

## 1. Introduction

L'analyse chimique des polluants présents dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques n'est pas toujours possible du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique. Par ailleurs, une telle approche ne renseigne pas sur les risques encourus par les populations animales ou végétales exposées aux polluants, et ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies...) ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants. De ce fait, le gestionnaire manque d'informations sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer l'état de santé de ces écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des écosystèmes (Abdellah, Mustapha, & Abdelmalek; Flammarion, 2000; Lagadic & Caquet, 1997; Lagadic, Caquet, Amiard, & Ramade, 1998).

Le suivi de la perturbation de cibles biologiques peut pallier cette difficulté. Par exemple, la spécificité d'un biomarqueur pour certaines familles de molécules chimiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques,

polychlorobiphényles, métaux traces, produits phytosanitaires...) permet d'une part de révéler la présence de ces polluants, et d'autre part de renseigner sur la biodisponibilité de ces polluants ainsi que sur les effets biologiques précoces sur les organismes (Abdel-Khalek, Kadry, Badran, & Marie, 2015; Aslan et al., 2018; Flammarion, Devaux, & Garric, 2001; Forbes, Palmqvist, & Bach, 2006).

Une gestion adaptée et pertinente des milieux aquatiques doit reposer sur des outils d'évaluation de l'intégrité des écosystèmes mise à mal par le transfert et l'accumulation dans l'environnement des produits de l'activité humaine. Parallèlement aux mesures chimiques, désormais utilisées dans les programmes de surveillance, la mesure de variables biologiques est susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de l'écosystème aquatique ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification. De ce fait, les variables biologiques sont un complément indispensable au sein d'un programme de surveillance et d'alerte (Flammarion, 2000).

C'est dans ce souci que les chercheurs se sont intéressés au développement de biomarqueurs que représentent les «

indicateurs biochimiques, physiologiques ou histologiques d'exposition, ou d'effet, d'un organisme à des contaminants » (Flammarion, 2000; Flammarion et al., 2001; Lagadic & Caquet, 1997; Lagadic et al., 1998).

Cependant, la question de la signification écotoxicologique de la réponse biologique mesurée par un biomarqueur reste à ce jour un débat scientifique et un champ de recherche très ouvert.

Dans ce cadre nous avons réalisé nos recherches portant sur le modèle biologique : le poisson Tilapia du Nil « *Oreochromis niloticus* » largement utilisé comme espèce bioindicatrice de la pollution aquatique (Abdel-Khalek et al., 2015). Cette espèce a été employée afin de mieux cerner les thématiques de recherches de l'écotoxicologie moderne, dont l'objectif principal est la contribution à la recherche de biomarqueurs comme réponse précoce susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de l'écosystème aquatique ainsi que sur les phénomènes de bioaccumulation.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Procédure des tests écotoxicologiques (contamination/décontamination)

Les Tilapias « *Oreochromis niloticus* » au nombre de 60 individus mâles de poids moyen initial (21.1±3.1 g) et de taille moyenne initiale (10.85±0.65cm), obtenus du service aquaculture (CNDPA, BouIsmaïl), ont été répartis dans des aquariums rectangulaires « 70 x 35 x 40cm ». L'emploi des pompes à air et des thermostats assure la saturation de l'eau des aquariums par l'oxygène dissout et le maintien d'une température moyenne de 25°C.

Une période de deux semaines d'adaptation des poissons avec les conditions expérimentales précède le test de contamination par le polluant métallique Cu<sup>2+</sup>. Par la suite, et contre une moitié des poissons maintenus comme témoins (0mg/l de Cu<sup>2+</sup>), une exposition chronique (01mg/l de Cu<sup>2+</sup> pendant 42 jours) suivie d'une période de détoxification (0mg/l Cu<sup>2+</sup> pendant 21 jours) ont été réalisées sur l'autre moitié des poissons. L'eau des aquariums est renouvelée deux fois par semaine pour minimiser les pertes en polluant et les effets toxiques des composés azotés sur les Tilapias. La mesure de poids des poissons par une balance analytique et leurs tailles par un Ichtyomètre, durant le cycle expérimental, servent à calculer la ration alimentaire à donner aux poissons et à étudier l'évolution de la croissance de ces derniers.

### 2.2. Méthodes et mesures analytiques

#### 2.2.1. Mesure biométrique

Le taux de croissance spécifique (TCS) correspond à la croissance pondérale moyenne quotidienne du poisson, exprimé en % par jour et est donné par la relation suivante:

$$TCS = \frac{\ln\left(\frac{P_2}{P_1}\right)}{(t_2 - t_1)} \times 100 \quad (1)$$

Avec P<sub>2</sub> et P<sub>1</sub> poids moyens à t<sub>2</sub> et t<sub>1</sub>, (t<sub>1</sub> et t<sub>2</sub> correspond aux jours de mesure du poids et de la taille de chaque poisson).

#### 2.2.2. Paramètres physico-chimiques

La température (T), la conductivité (Cond), l'oxygène dissout (DO), le potentiel d'hydrogène (pH), les solides totaux dissous (TDS) et la salinité (Sal) ont été mesurés tous les jours avant et après chaque

nutrition des individus et cela à l'aide d'un multiparamètre de type YSI model 556.

### 2.2.3. Mesures biochimiques

#### 2.2.3.1. Préparation des échantillons tissulaires en vue des analyses biochimiques

Après chaque 21 jour et à la fin du cycle expérimental, des individus de chaque groupe sont enlevés et anesthésiés par le Phénoxy-ethanol. Par la suite la taille et le poids sont mesurés avant de procéder à la dissection et la séparation des différents organes, à savoir le foie, les branchies et l'intestin qui seront conservés à -30°C.

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

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

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

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

#### 2.2.3.2. Détermination des protéines totales

Les protéines totales extraites ont été dosés selon la méthode développée par Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall (1951). Cette méthode combine deux réaction principales l'une avec le réactif Folin-ciocalteu et l'autre est celle de Biuret, respectivement. Dans des tubes à essais, les prises d'échantillons de la fraction S9 (surnageant) sont diluées au 1/5-1/8-1/10 et complétées à 1 ml. Le tube de blanc contient 01ml d'eau distillée. 05ml de réactif Lowry sont ajoutés à chaque tube (il faut homogénéiser et attendre 10min). Par la suite, 0,5ml de réactif *Folin-Ciocalteu* dilué extemporanément au 1/2 est additionné au mélange (il est important d'agiter juste après l'addition de ce dernier). L'ensemble est mis au repos à l'obscurité au moins 30min. Ainsi, la lecture de l'absorbance est faite à 660nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) étalon mère.

#### 2.2.3.3. Mesure de l'activité catalase (CAT par mode cinétique)

L'activité enzymatique catalase (CAT) a été mesurée selon la méthode de Lartillot et al, décrite par Atli, Alptekin, Tükel, and Canli (2006). Dans notre pratique, 2.5ml du substrat (100µl solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% ; 2.4ml tampon phosphate 75mM à pH7) sont placés dans une cuvette du spectrophotomètre déjà réglée sur le mode cinétique. 50µl de la fraction S9 (source d'enzyme) sont ajoutés au mélange, ainsi la décomposition de peroxyde d'hydrogène est suivi à 240nm dans un intervalle de temps de 60s. Les résultats obtenus de l'activité enzymatique sont exprimés en tant que micromoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommées par minute par milligramme de protéines (U/mg Protéines).

#### 2.2.3.4. Mesure de l'activité protéase (Pase à temps fixe)

Le dosage de l'activité protéase au niveau de l'intestin est déterminé selon la méthode décrite par Bezerra et al. (2005). 02ml de la solution de caséine (01% P/V dans le Tris-HCl pH7.2) utilisée comme substrat est incubée avec 02ml de surnageant (source d'enzyme S9), préalablement dilué à différentes rations, à une température de 50°C pendant 01heure. La réaction est stoppée en ajoutant 01ml du TCA à 10% (Acide trichloroacétique). Une

deuxième centrifugation à 6000g pendant 15min, est effectuée après un quart d'heure de repos. La lecture de l'absorbance est faite à 280nm. Dans le blanc l'eau physiologique remplace les 02ml du S9.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Variation moyenne des paramètres physicochimiques (eau d'élevage)

Les résultats expérimentaux relevés quotidiennement sont regroupés dans le tableau 1 récapitulatif ci-dessous.

**Tableau 1.** Variation journalière moyenne des paramètres physicochimiques

Paramètres	T (°C)	Cond (ms/cm)	TDS (g/l)	Sal (‰)	DO (mg/l)	pH
Aquariums contamination	25±1	2.28±0.18	1.26±0.29	1.115±0.1	5.02±1.95	7.64±0.22
Aquariums témoin	25±1	2.24±0.14	1.25±0.28	1.11±0.1	5.26±2.13	7.67±0.25

La croissance, l'activité métabolique, le stress oxydatif, les mécanismes de la bioaccumulation et de détoxification des polluants chez le Tilapia « *Oreochromis niloticus* » sont directement influencés par la température, le pH, l'oxygène dissout et d'autres (Atli et al., 2006; Baykan, Atli, & Canli, 2007; Bezerra et al., 2005; Birnie-Gauvin, Costantini, Cooke, & Willmore, 2017; Bocci, 1999; Gewurtz et al., 2006) . De ce fait et dans le but de minimiser au maximum ces facteurs stressants l'assurance des conditions environnementales optimales (Tableau 1) pour l'élevage des individus Tilapia était l'étape primaire avant de commencer les tests d'écotoxicité. En effet, et dans le même contexte un contrôle de qualité physico-chimique et bactériologique de l'aliment et de l'eau d'élevage était une étape cruciale.

D'après le modèle de Bocci (Bocci, 1999), la croissance des tilapias entre 20 et 25°C

est une fonction exponentielle. En dehors de ce gradient préférentiel la croissance est ralentie. A une température voisinant 25°C l'ingestion d'aliment est meilleure avec un optimum des performances biologiques des poissons tilapias (El-Sayed & Kawanna, 2008; Mohamed Saad El-Sherif & Amal Mohamed Ibraim El-Feky, 2009; Mengistu, Mulder, Benzie, & Komen, 2020).

Pour ces raisons, la température de 25°C est choisie pour optimiser la croissance du poisson en créant un environnement adéquat afin que ce dernier puisse exercer ces activités métaboliques d'une façon optimale. A telle température les mécanismes de défense cellulaire sont à l'état extrême et l'agressivité des individus entre eux est minimale. Donc, dans notre étude la température n'est pas un facteur stressant.

L'évolution journalière des valeurs du pH mesurés (Tab 1) reste toujours dans l'intervalle de tolérance des spécimens

entre 7,4 et 7,8 (l'optimum de pH se situe entre 6.5 et 8.5 (Mohamed Saad El-Sherif & Amal Mohamed Ibrahim El-Feky, 2009; Herawati, Hutabarat, & Radjasa, 2015; Makori, Abuom, Kapiyo, Anyona, & Dida, 2017)) durant tout le cycle expérimental. Ainsi le pH de l'eau d'élevage ne présentant aucun effet stressant pouvant perturber l'état de santé des individus.

Du point de vue concentration en oxygène dissous, le tilapia *nilotica* exige une concentration de 4 à 5 mg/l (Mengistu et al., 2020; Mulyani & Fitriani, 2014; Nariswari, Yustiati, Rostini, & Suryadi, 2020). Les valeurs journalières de l'oxygène dissout mesurées (Tab 1) durant le cycle expérimental (entre 4 et 6mg/l) répondaient aux exigences des spécimens.

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

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

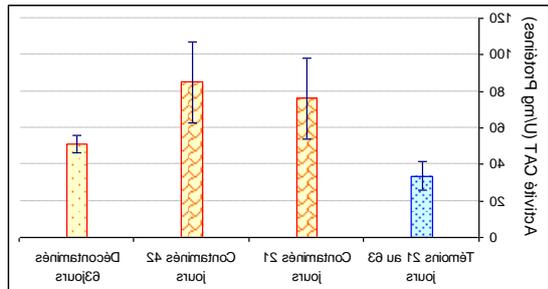
Tout être vivant peut être considéré comme un système énergétique ouvert, c'est-à-dire qu'il échange de la matière et de l'énergie avec son environnement. Au cours de processus biochimiques propres à chaque espèce, l'énergie absorbée est progressivement transformée en énergie utile qui est dissipée sous forme de chaleur ou de travail chimique, osmotique et mécanique. Au sens large, la respiration est l'ensemble des mécanismes physico-chimiques et biochimiques qui fournissent à l'être vivant l'énergie nécessaire à son métabolisme. De manière classique, on distingue la fraction de l'énergie totale allouée à la croissance somatique et au métabolisme général, de celle allouée à la croissance gonadique et à la reproduction (Jourdan, 2006).

L'environnement, à travers ses effets sur la physiologie notamment, fixe les conditions et les limites des processus énergétiques (Leung, Chu, & Wu, 1999). Dans certaines conditions environnementales stressantes, l'approvisionnement maximal de tous les organes ne peut être assuré. Conséquences : mauvaise croissance, mauvais état de santé (Gewurtz et al., 2006; Lagadic et al., 1998), ce qui est le cas dans notre étude où on a enregistré un retard de croissance chez les poissons contaminés.

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

### 3.2. Evolution de l'activité catalase (CAT)

Les résultats issus du suivi de l'évolution de l'activité enzymatique catalase (CAT) au niveau du foie et des branchies des poissons sont représentés dans les Figures 1 et 2, respectivement.



**Figure 1.** Etude de l'effet du cuivre sur l'activité de la catalase dans le foie des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*.

En général, une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) de l'activité CAT est observée chez les individus exposés au cuivre  $\text{Cu}^{2+}$ . Comparativement aux individus témoins, ces derniers n'ont montré aucun changement significatif ( $p > 0,05$ ) de leur activité CAT et cela le long du cycle expérimental. (fig 1). Par ailleurs, une corrélation positive est constatée entre la concentration du polluant accumulé par les poissons (Tab 2) et le niveau d'induction de l'activité enzymatique CAT.

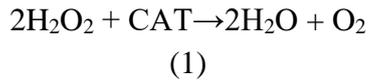
**Tableau 2 :** Concentration du cuivre accumulé par les spécimens *Oreochromis niloticus*.

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

L'étude de l'activité CAT, dans le foie des poissons (fig 1), montre que cette dernière est accélérée par le xénobiotique ( $\text{Cu}^{2+}$ ) présent dans le milieu, et cela en fonction du temps d'exposition et de la concentration

bioaccumulée du polluant (Tab 2). Ainsi les activités mesurées aux 21<sup>ème</sup> et 42<sup>ème</sup> jours atteignirent ( $76,18 \pm 22,09 \text{ U/mg Prot}$ ) et ( $84,92 \pm 22,46 \text{ U/mg Prot}$ ) respectivement.

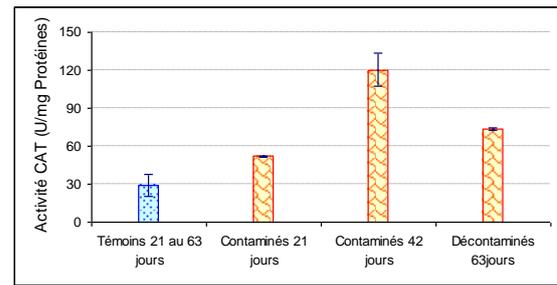
Dans les systèmes biologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites en permanence par divers mécanismes impliquant des composés endogènes ou exogènes comme des xénobiotiques (Amiard & Amiard-Triquet, 2008; Birnie-Gauvin et al., 2017; A Figueiredo-Fernandes, Fontainhas-Fernandes, Peixoto, Rocha, & Reis-Henriques, 2006; Jean-Claude & Claude, 2008; Peixoto, Alves-Fernandes, Santos, & Fontainhas-Fernandes, 2006; Roche, Buet, & Ramade, 2003). De plus, les polluants chimiques sont d'importants producteurs de ROS (Abdel-Gawad et al., 2020; Atli et al., 2006; Kourdali et al., 2022; Meknachi, Djellali, & Badis, 2021; Sidali, Nabila, Abdellah, Bilal, & Ahmed, 2020). En effet les xénobiotiques connus pour leurs propriétés redox, comme les métaux de transition ( $\text{Cu}^{2+}$ ), induisent la formation de peroxyde d'hydrogène, précurseur d'autres radicaux libres (Gopi et al., 2019). Le cuivre induit la formation de ROS via la réaction de Fenton. L'ion  $\text{Cu}^{2+}$  positif peut également agir directement en se liant à des groupes protéiques SH chargés négativement et en dénaturant les enzymes, ou indirectement via la génération de ROS entraînant un stress oxydatif (Abdel-Khalek et al., 2015). Les catalases (CAT) (enzymes anti-oxydantes) sont des hémoprotéines présentes au niveau des peroxysomes qui participent à la défense contre les dérivés de l'oxygène. La CAT catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau selon la réaction (1) suivante (Amiard & Amiard-Triquet, 2008; Atli et al., 2006; Meknachi et al., 2021):



Donc l'induction de l'activité catalase (CAT) est le signe de l'exposition des poissons au stress oxydatif causé par le cuivre Cu<sup>2+</sup>.

Chez le tilapia *Oreochromis niloticus*, (Atli & Canli, 2007), dans leur étude, observèrent une stimulation de l'activité CAT sous l'effet du cadmium (Cd<sup>2+</sup>) à différentes concentrations. Par ailleurs, (Peixoto et al., 2006), constatèrent également une augmentation de l'induction de la catalase en fonction du temps et sous l'effet du polluant oxyfluorfen. Ainsi, l'intérêt majeur de la catalase en tant que biomarqueur réside dans le caractère aspécifique de sa réponse, ce qui constitue un avantage dans le contexte de la contamination multiple des écosystèmes aquatiques (Abdel-Moneim, El-Saad, Hussein, & Dekinesh, 2012; Abdellah et al.; Gopi et al., 2019; Matos, Fontai, Peixoto, Carrola, & Rocha, 2007; Meknachi et al., 2021).

Une baisse d'induction de l'activité catalase (CAT) est mesurée à la fin du cycle de décontamination (Fig. 1). L'activité relevée est de 51.16U/mg Protéines ce qui traduit la curabilité de l'état de santé des poissons et la réversibilité du mécanisme physiologique dont on mesura également une diminution de la bioaccumulation (Tab 2) suite à l'action des différents processus d'excrétion et de décontamination des polluants. Selon plusieurs auteurs, les biomarqueurs de défense comme l'activité catalase (CAT) contribuent au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Cette dernière dépend de la relation dose, durée/effet (Atli et al., 2006; Atli & Canli, 2007; Durmaz, Sevgiler, & Üner, 2006).



**Figure 2.** Effet du cuivre (Cu<sup>2+</sup>) sur l'activité catalase (CAT) dans les branchies des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*.

La plus importante induction de l'activité catalase (CAT) est mesurée au niveau des branchies des poissons contaminés (Fig. 2) après 42 jours d'exposition. Guluzar *et al* [71], dans leur études de l'effet des métaux traces Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> sur l'activité CAT au niveau des branchies des tilapias ont relevé également de fortes inductions de l'enzyme antioxydante sous l'effet du cuivre à 0,5 ; 01 et 1,5mg/l.

Les branchies des poissons sont considérées comme les organes critiques lors d'exposition au cuivre. En effet elles constituent la plus grande partie de la surface de contact totale des poissons et sont, ainsi, le lieu principal d'échange d'eau et d'ions entre le sang et l'environnement (Atli et al., 2006; S. Monteiro, Rocha, Fontainhas-Fernandes, & Sousa, 2008; Sandra M Monteiro, Mancera, Fontainhas-Fernandes, & Sousa, 2005). La fixation du cuivre (Cu<sup>2+</sup>) présents dans les eaux au niveau des branchies des poissons est la cause de dysfonctionnement des fonctions métaboliques, respiratoires et ionorégulatrices (Dang, Lock, Flik, & Wendelaar Bonga, 2000; Sandra M Monteiro et al., 2005). Le cuivre est de plus connu pour provoquer de graves dommages au niveau de la structure lamellaire des branchies (Alkobaby & Abd El-Wahed, 2017; Basirun et al., 2019; António

Figueiredo-Fernandes et al., 2007; Sandra Mariza Monteiro, dos Santos, Calejo, Fontainhas-Fernandes, & Sousa, 2009). Selon (Di Giulio, Habig, & Gallagher, 1993), la catalase nous renseigne sur le degré d'altération de la cellule. Shaw and Handy (2006), dans leur étude histologique de branchies des individus tilapias exposés au cuivre via la nourriture, n'observèrent aucune altération de ces dernières. Or dans notre étude les poissons sont exposés au cuivre via l'eau. Monteiro et al (Sandra M Monteiro et al., 2005), dans leur étude, indique, qu'en association avec l'accumulation du cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) au niveau des branchies des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*, plusieurs changements histopathologiques se produisaient au niveau de l'épithélium branchial avec des changements systématiques des paramètres physiologiques ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase...). Des altérations des cellules à chlorure, chargées de l'osmorégulation, ainsi que des cellules pavimenteuses, des hyperplasies et des fusions lamellaires des lamelles secondaires ont été observées par Arellano et al (Arellano, Storch, & Sarasquete, 1999) sur une espèce marine. (Mazon, Cerqueira, & Fernandes, 2002) ont obtenus des résultats similaires en exposant une espèce de poisson tropical vivant dans les eaux douces aux différentes concentrations du cuivre toujours.

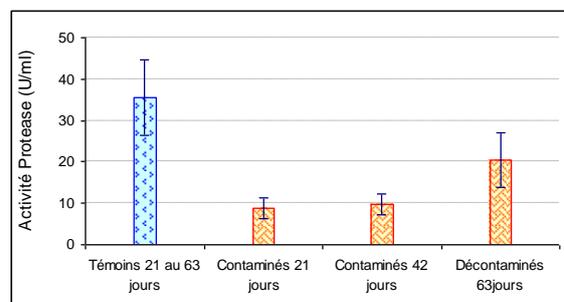
Une légère diminution de l'induction de l'activité catalase (CAT) ( $73,41 \pm 0,71$  U/mg Protéines) est mesurée à la fin du cycle de décontamination. Ainsi le degré d'activation de l'enzyme peut être considéré comme signe d'exposition des poissons à une contamination passée par le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$ . De fait, l'étude de l'atteinte des différentes cibles par les xénobiotiques s'avère très

importante dans un diagnostic complet de l'état de santé des espèces bioindicatrices, ce qui est souvent l'objectif des recherches en écotoxicologie afin d'éviter les fausses réponses d'un biomarqueur donné (Almeida et al., 2002; Atli et al., 2006; Barillet, Adam, Palluel, & Devaux, 2007; Durmaz et al., 2006).

Vu les caractéristiques, la sensibilité de l'enzyme et la facilité du dosage de cette dernière plusieurs auteurs qualifient la catalase comme un biomarqueur sensible dans le biomonitoring des écosystèmes aquatiques (Abdellah et al.; Atli et al., 2006; Atli & Canli, 2007; Meknachi et al., 2021; Peixoto et al., 2006; Sanchez et al., 2005; Sun et al., 2006).

### 3.3. Evolution de l'activité protéase (Pase)

Le dosage de l'activité protéase au niveau de l'intestin des poissons (Fig.3), mit en évidence une diminution significative ( $p < 0,05$ ) d'activité de l'enzyme digestive chez les individus exposés au xénobiotique ( $\text{Cu}^{2+}$ ) atteignant des activités inférieures à 10U/ml le long de cycle de contamination. Par ailleurs, une reprise d'activité protéase (significative au seuil de  $p < 0,05$ ) est mesurée après la période de décontamination, cependant l'activité atteinte ( $20,33 \pm 6,59$  U/ml) était toujours inférieure à celles mesurée chez les individus témoins ( $35,56 \pm 09,03$  U/ml).



**Figure 3.** Effet du cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) sur l'activité protéase (Pase) dans l'intestin des poissons tilapias *Oreochromis niloticus*.

(Bezerra et al., 2005), dans leur étude sur les tilapias *nilotica* ont observé une inhibition de l'activité protéase sous l'effet des ions Cd<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> et Co<sup>2+</sup>, cependant leurs expériences ont été menées *in vitro*. L'ensemble des processus biochimiques et physiologiques impliqués dans le cycle vital des organismes dépend étroitement du métabolisme énergétique. Le foie et le pancréas des vertébrés ainsi que la glande digestive ou hépatopancréas des crustacés et des mollusques jouent un rôle très important dans la digestion des aliments, en synthétisant et en sécrétant les enzymes digestives (Cui, Du, Zhang, Liu, & Chen, 2007; A Figueiredo-Fernandes et al., 2006; Jean-Claude & Claude, 2008). Cependant, ces organes sont aussi la cible des contaminants chimiques qui y sont transportés pour leur détoxification. De ce fait, ils constituent les principaux sites d'accumulation des contaminants, et en particulier des contaminants métalliques, chez les animaux aquatiques (Atli & Canli, 2007; A Figueiredo-Fernandes et al., 2006; Jean-Claude & Claude, 2008). Selon (Lagadic & Caquet, 1997) et (Van der Oost, Beyer, & Vermeulen, 2003), les variations d'activités enzymatiques sont souvent une des premières réponses au stress, elles représentent donc des points utiles dans la confirmation des effets toxiques avant que ces derniers ne soient perceptibles à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (cellulaire, tissulaire, physiologique...).

Des inhibitions d'activités protéase, amylase ou lipase ont été observées chez différentes espèces de poissons exposées à des agents métalliques. De plus des effets négatifs des contaminants métalliques et organiques sont aussi observés chez différents organismes aquatiques (Amiard & Amiard-Triquet,

2008). Selon (Essedaoui, Masse, & Sif, 1998), les activités d'enzymes digestives chez des moules (*Mytilus galloprovincialis*) prélevées le long d'un gradient de contamination montrent des activités plus faibles de l' $\alpha$ -amylase chez les individus présentant les teneurs en cadmium les plus élevées.

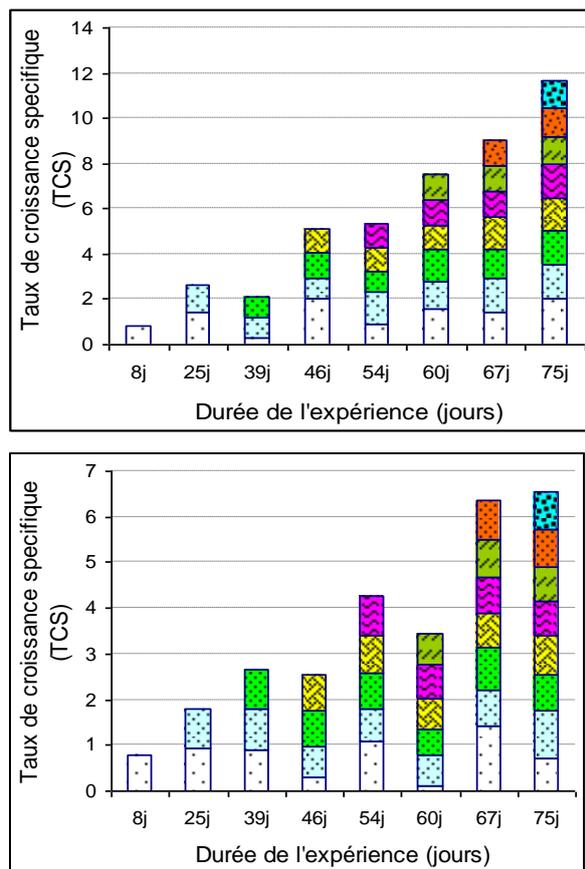
Dans notre étude et durant le cycle de contamination, l'ingestion de la nourriture par les poissons stressés était souvent incomplète où l'aliment reste en surface puis sédimente au fond des aquariums (refus alimentaire). Selon (Amiard & Amiard-Triquet, 2008), l'acquisition de la nourriture nécessite la mise en œuvre de comportements complexes qui peuvent être affectés par les anomalies engendrées par les polluants au niveau du système nerveux et des organes de locomotions. La diminution de la prise alimentaire peut également résulter soit d'une perturbation physiologique, soit d'un comportement d'évitement, l'organisme étant chémosensible à la présence des contaminants dans sa nourriture. D'après (Wilding & Maltby, 2006), lorsque l'exposition cesse, le taux d'alimentation redevient immédiatement normal chez les individus précédemment contaminés, montrant qu'il s'agissait uniquement d'un phénomène d'évitement alors que l'inhibition persiste dans le cas d'une perturbation physiologique. Dans notre cas l'activité atteinte à la fin du cycle de décontamination (fig. 3) est probablement le résultat d'une perturbation physiologique et ne semble pas être liée au comportement d'évitement.

Le suivi de l'impact potentiel des contaminants sur l'activité des enzymes digestives est un paramètre intéressant présentant une pertinence écologique forte,

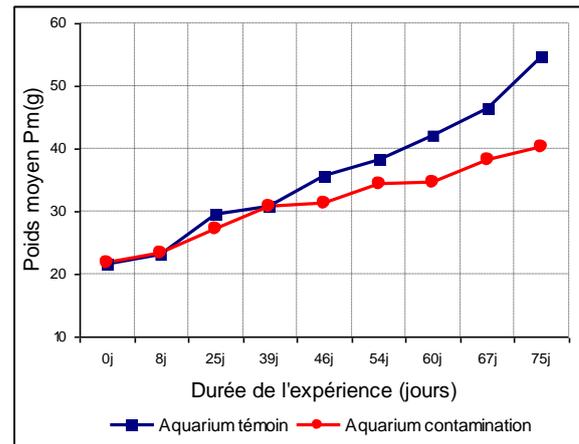
car elles jouent un rôle crucial sur les processus d'assimilation de la nourriture. Une diminution de la digestion pourra résulter en une diminution de la croissance et de la reproduction avec un impact possible sur le maintien de la population. La mesure de ces variations d'activités enzymatiques a ainsi été proposée par plusieurs auteurs comme biomarqueurs très utiles (Amiard & Amiard-Triquet, 2008).

### 3.4. Mesures biométriques

Des mesures biométriques peuvent être utilisées pour déterminer des indices de conditions chez divers organismes tels que les poissons. Les résultats sont illustrés dans les Figures 4 et 5.



**Figure 4.** Effet du cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  sur le taux de croissance spécifique TCS durant la période d'étude (A : poissons témoins ; B : poissons contaminés).



**Figure 5.** Effet du cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) sur l'évolution des poids moyens (Pm) des tilapias durant la période d'étude.

Les valeurs des taux de croissance (TCS), exploitées dans la Figure 4 (A ; B), montrent que les gains en poids chez les poissons témoins sont supérieurs à ceux mesurés chez les spécimens exposés au cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), dont on a relevé un retard de croissance de ces derniers (Fig. 5). D'après Gopi, et al (Gopi et al., 2019), l'effet stressant du cuivre est à l'origine de la diminution de la croissance des poissons *Tilapia*. Ceci est probablement dû au déséquilibre de la balance énergétique associée à l'exposition au xénobiotique ( $\text{Cu}^{2+}$ ), sachant que, chez tous les organismes vivants, l'ensemble des processus biochimiques et physiologiques est étroitement dépendant de la quantité d'énergie disponible au niveau cellulaire. Selon (Amiard & Amiard-Triquet, 2008), une hausse des dépenses énergétiques pour le métabolisme de base afin de faire face aux stress endurés peut conduire à une réduction de l'investissement énergétique envers la croissance et/ou la reproduction. Par ailleurs, sous l'effet d'un stress, y compris d'origine chimique, la réaction de l'organisme se traduit par un accroissement de la dépense énergétique liée à la mise en place de mécanisme de compensation physiologique (Lagadic &

Caquet, 1997). Les contaminants chimiques peuvent aussi intervenir lors de digestion de l'aliment en altérant l'activité des enzymes digestives ce qui limite la capacité d'une espèce à maximiser sa prise énergétique. (Shaw & Handy, 2006), ont constaté aussi des retards de croissance chez des Tilapias exposés au cuivre via la nourriture. Par ailleurs, (Marchand, Quiniou, Riso, Thebaut, & Laroche, 2004), dans leurs études ont révélés une diminution générale des facteurs de conditions chez des poissons plats *Platichthys flesus* prélevés dans des estuaires impactés en comparaison à ceux d'un estuaire de référence. Cependant ce types d'indices n'est pas considérés comme un biomarqueur au sens strict de la définition, mais ils sont mesurés en première intention car ils sont simples à réaliser, de faible coût et ils peuvent fournir des informations sur l'impact potentiel des polluants (A Figueiredo-Fernandes et al., 2006; Kosmala, 1998; Roche et al., 2003; Van Gestel & Van Brummelen, 1996).

#### 4. Conclusion

Dans une perspective de synthèse des résultats des mesures biochimiques des biomarqueurs catalase et protéase, on peut dire que l'augmentation des dépenses énergétiques allouées à la défense traduite par l'induction de l'enzyme antioxydante CAT ainsi que la perturbation de l'enzyme digestive protéase ainsi discutée sont à l'origine de l'atteinte de la biométrie suite à l'exposition au xénobiotique (Cu<sup>2+</sup>). De fait, une forte pertinence est accordée à ces deux biomarqueurs comme un signal précoce de la dégradation de l'état de santé des organismes indicateurs ce qui donne aux gestionnaires de l'environnement une information sur l'urgence des mesures à prendre pour améliorer la qualité des

écosystèmes, ou protéger la biodiversité et l'intégrité des milieux avant que les effets soient perceptibles à des niveaux supérieurs aboutissant en phase finale à une dégradation de la qualité écologique d'un écosystèmes dans sa totalité. De ce fait, les variables biologiques sont un complément indispensable au sein d'un programme de surveillance et d'alerte.

#### Références bibliographies

- Abdel-Gawad, F. K., Khalil, W. K., Bassem, S. M., Kumar, V., Parisi, C., Inglese, S., . . . Guerriero, G. (2020).** The duckweed, lemna minor modulates heavy metal-induced oxidative stress in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Water*, 12(11), 2983.
- Abdel-Khalek, A. A., Kadry, M. A., Badran, S. R., & Marie, M.-A. S. (2015).** Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*: biochemical and oxidative stress. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 72, 43-57.
- Abdel-Moneim, A. M., El-Saad, A. M. A., Hussein, H. K., & Dekinesh, S. I. (2012).** Gill oxidative stress and histopathological biomarkers of pollution impacts in Nile tilapia from Lake Mariut and Lake Edku, Egypt. *Journal of aquatic animal health*, 24(3), 148-160.
- Abdellah, M., Mustapha, D., & Abdelmalek, B. ECOTOXICITY ASSESSMENT OF INDUSTRIAL WASTEWATER: EVOLUTION OF CATALASE ACTIVITY AS A BIOMARKER OF OXIDATIVE STRESS IN THE MUSSELS MYTILUS GALLOPROVINCIALIS AND PERNA PERNA.
- Alkobaby, A., & Abd El-Wahed, R. (2017).** The acute toxicity of copper to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings and its effects on gill and liver histology. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 8(1), 1-6.
- Almeida, J., Diniz, Y., Marques, S., Faine, L., Ribas, B., Burneiko, R., & Novelli, E. (2002).** The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, 27(8), 673-679.
- Amiard, J.-C., & Amiard-Triquet, C. (2008).** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.

- Arellano, J. M., Storch, V., & Sarasquete, C. (1999).** Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44(1), 62-72.
- Aslan, E., Görgün, A. U., Katalay, S., Filizok, I., Becerik, S., & Aydemir, T. (2018).** An investigation on the seasonal variations of the biomarkers of oxidative stress response and their correlations to Polonium-210 in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and common sole (*Solea solea*) from İzmir Bay, Turkey. *Journal of Environmental Radioactivity*, 189, 103-108.
- Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S., & Canli, M. (2006).** Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2), 218-224.
- Atli, G., & Canli, M. (2007).** Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(2), 282-287.
- Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., & Devaux, A. (2007).** Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(3), 497-505.
- Basirun, A., Ahmad, S., Yasid, N., Sabullah, M., Daud, H., Sha'arani, S., . . . Shukor, M. (2019).** Toxicological effects and behavioural and biochemical responses of *Oreochromis mossambicus* gills and its cholinesterase to copper: a biomarker application. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(2), 887-898.
- Baykan, U., Atli, G., & Canli, M. (2007). The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(1), 33-38.
- Bezerra, R. S., Lins, E. J., Alencar, R. B., Paiva, P. M., Chaves, M. E., Coelho, L. C., & Carvalho Jr, L. B. (2005).** Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, 40(5), 1829-1834.
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., & Willmore, W. G. (2017).** A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries*, 18(5), 928-942.
- Bocci, M. (1999).** Modelling the growth of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeding on natural resources in enclosures in Laguna de Bay (Philippines). *Ecological modelling*, 119(2-3), 135-148.
- Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H., & Chen, J. (2007).** Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. *Food chemistry*, 105(2), 612-618.
- Dang, Z., Lock, R., Flik, G., & Wendelaar Bonga, S. (2000).** Na (+)/K (+)-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. *Journal of Experimental Biology*, 203(2), 379-387.
- Di Giulio, R. T., Habig, C., & Gallagher, E. P. (1993).** Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology*, 26(1-2), 1-22.
- Durmaz, H., Sevgiler, Y., & Üner, N. (2006).** Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 84(3), 215-226.
- El-Sayed, A.-F., & Kawanna, M. (2008).** Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. *Aquaculture Research*, 39(6), 670.
- El-Sherif, M. S., & El-Feky, A. M. I. (2009).** Performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. I. Effect of pH. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(3), 297-300.
- El-Sherif, M. S., & El-Feky, A. M. I. (2009).** Performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. II. Influence of different water temperatures. *Int. J. Agric. Biol*, 11(3), 1814-9596.
- Essedaoui, A., Masse, H., & Sif, J. (1998).** Etude de l'effet du cadmium sur l'activité de l'estérase C4, l'α-amylase et la β-galactosidase chez le mollusque *Mytilus galloprovincialis* dans la région de Jorf-Lasfar-El Jadida, Maroc. *Bull. Inst. Sci. Rabat*, 21, 89-94.
- Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Matos, P., & Fontainhas-Fernandes, A. (2007).** Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27, 103-109.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E., & Reis-Henriques, M. (2006).** Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide biochemistry and physiology*, 85(2), 97-103.

**Flammarion, P. (2000).** *Mesure d'un biomarqueur de pollution chez des poissons d'eau douce. Validation et optimisation*: Cemagref Editions.

**Flammarion, P., Devaux, A., & Garric, J. (2001).** MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE POLLUTION DANS LES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES CONTINENTAUX. EXEMPLES D'UTILISATION ET PERSPECTIVES POUR LE GESTIONNAIRE. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*(357-360), 209-226.

**Forbes, V. E., Palmqvist, A., & Bach, L. (2006).** The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(1), 272-280.

Gewurtz, S. B., Laposa, R., Gandhi, N., Christensen, G. N., Evenset, A., Gregor, D., & Diamond, M. L. (2006). A comparison of contaminant dynamics in arctic and temperate fish: A modeling approach. *Chemosphere*, 63(8), 1328-1341.

**Gopi, N., Vijayakumar, S., Thaya, R., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., . . . Vaseeharan, B. (2019).** Chronic exposure of *Oreochromis niloticus* to sub-lethal copper concentrations: effects on growth, antioxidant, non-enzymatic antioxidant, oxidative stress and non-specific immune responses. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 55, 170-179.

**Herawati, V. E., Hutabarat, J., & Radjasa, O. K. (2015).** Growth and survival rate of tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed by *Daphnia magna* cultured with organic fertilizer resulted from probiotic bacteria fermentation. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(4), 169-173.

**Jean-Claude, A., & Claude, A.-T. (2008).** *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*: Lavoisier.

**Jourdan, H. (2006).** MANGER OU NAGER: FAUT-IL CHOISIR?

**Kosmala, A. (1998).** *Evaluation écotoxicologique de l'impact des effluents de stations d'épuration sur les cours d'eau: intérêt d'une approche intégrée*. Doctorat Toxicologie de l'environnement, Université de Metz.

**Kourdali, S., Boudjema, K., Meknachi, A., Bounakous, N., Jaouadi, B., Mechri, S., & Badis, A. (2022).** An ecotoxicological approach for assessing marine pollution: Comparative study of multi-responses of marine mussels, *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna*, exposed to pollutant heavy metals (copper and lead). *Regional Studies in Marine Science*, 52, 102334.

**Lagadic, L., & Caquet, T. (1997).** *Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux*: Masson.

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J., & Ramade, F. (1998). Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement.

**Leung, K., Chu, J., & Wu, R. (1999).** Effects of body weight, water temperature and ration size on ammonia excretion by the areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) and mangrove snapper (*Lutjanus argentimaculatus*). *Aquaculture*, 170(3-4), 215-227.

**Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.

**Makori, A. J., Abuom, P. O., Kapiyo, R., Anyona, D. N., & Dida, G. O. (2017).** Effects of water physico-chemical parameters on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth in earthen ponds in Teso North Sub-County, Busia County. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(1), 1-10.

**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(4), 327-343.

**Matos, P., Fontai, A., Peixoto, F., Carrola, J., & Rocha, E. (2007).** Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pesticide biochemistry and physiology*, 89(1), 73-80.

**Mazon, A., Cerqueira, C., & Fernandes, M. (2002).** Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research*, 88(1), 52-63.

**Meknachi, A., Djellali, M., & Badis, A. (2021).** Ecotoxicological Assessment of Three Types of Wastewater Effluents: Catalase as a Biomarker of Oxidative Stress in Marine Bivalves *Water Resources in Arid Lands: Management and Sustainability* (pp. 277-288): Springer.

**Mengistu, S. B., Mulder, H. A., Benzie, J. A., & Komen, H. (2020).** A systematic literature review of the major factors causing yield gap by affecting growth, feed conversion ratio and survival in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 524-541.

**Monteiro, S., Rocha, E., Fontainhas-Fernandes, A., & Sousa, M. (2008).** Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure. *Journal of Fish Biology*, 73(6), 1376-1392.

**Monteiro, S. M., dos Santos, N. M., Calejo, M., Fontainhas-Fernandes, A., & Sousa, M. (2009).** Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*: effects in apoptosis induction and cell proliferation. *Aquatic toxicology*, 94(3), 219-228.

**Monteiro, S. M., Mancera, J. M., Fontainhas-Fernandes, A., & Sousa, M. (2005).** Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(4), 375-383.

**Mulyani, Y. S., & Fitrani, M. (2014).** Pertumbuhan dan efisiensi pakan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang dipuasakan secara periodik. *Jurnal Akuakultur Rawa Indonesia*, 2(1), 1-12.

**Nariswari, S., Yustiati, A., Rostini, I., & Suryadi, I. B. B. (2020).** Effect of stocking density on water quality of tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) in round container with current and venturi aeration system. *World Scientific News*, 145, 397-408.

**Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D., & Fontainhas-Fernandes, A. (2006).** Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 85(2), 91-96.

**Roche, H., Buet, A., & Ramade, F. (2003).** Caractéristiques écophysiologiques d'une population d'anguilles de Camargue exposée à une pollution clandestine par des polluants organiques persistants. *Revue d'Ecologie, Terre et Vie*, 58(1), 103-126.

**Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.-M., & Ait-Aissa, S. (2005).** Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(1), 177-183.

**Shaw, B. J., & Handy, R. D. (2006).** Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 111-121.

**Sidali, K., Nabila, B., Abdellah, M., Bilal, Z., & Ahmed, I. (2020).** Preliminary Study of Catalase Enzyme Activity and Protein Concentrations in the Mediterranean and African Mussels, *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna*, Cohabiting on the Same Natural Coastal Site (Figuier, Boumerdes, Algeria). *Ocean Science Journal*, 55(4), 521-536.

**Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shi, H., & Wang, X. (2006).** Bioaccumulation, depuration and oxidative stress

in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere*, 63(8), 1319-1327.

**Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003).** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.

**Van Gestel, C., & Van Brummelen, T. (1996).** Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5(4), 217-225.

**Wilding, J., & Maltby, L. (2006).** Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: implications for risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(7), 1795-1801.