

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Ecotoxicologie Animale

Intitulé :

**Effet Eco-toxicologique sur les poissons d'élevage  
Tilapia « *Oreochromis niloticus* » après une thérapie  
chimio-Phytologique.**

Présenté Par :

Kartout Rayane

Kedadria Lina

Baiche Ghazlane

Bouhafer Fatma Zohra Zoumrouda

**Membre de Jury:**

Pr. ZAIDI Nedjouda (Prof)

Président

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. BOUCETTA Sabrine (MCA)

Promoteur

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Mr BOUZOUALEGH Raouf

Co-Promoteur

Direction de la pêche -Skikda

Dr. LAIB Imène (MCA)

Examineur

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

**Année universitaire 2022/2023**

## **REMERCIEMENT**

*Avant tout, nous remercions en premier lieu Allah le tout puissant de nous avoir donné la volonté d'entamer et terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement du **Dr Boucetta Sabrina** (MCA, université 20 août 55, Skikda), pour avoir accepté de diriger ce travail, et pour sa disponibilité, sa confiance et pour nous avoir fait bénéficier de son expérience et de précieux conseils.*

*Toute notre gratitude et reconnaissance à **Mr Bouzoualegh Raouf** Qui nous à co,fectionné le bloc experimental et nous à accompagner autant que co-encadreur lors de l'experimentation.*

*Nous remercions et saluons vivement nos membres de jury, Melle. **Pr Zaidi Nedjouda** (Professeur, université 20 août 55, Skikda) d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Melle. **Dr Laib imen** (MCA, université 20 août 55, Skikda), qui a bien voulu examiner ce travail.*

*Ces critiques et remarques nous serons d'une grande utilité.*

*Toute notre gratitude et reconnaissance à **Mr Charef Mohamed Nadjib** Enseignant à l'ITPA Collo, pour sa disponibilité ses conseils pour maintenir les poissons vivants*

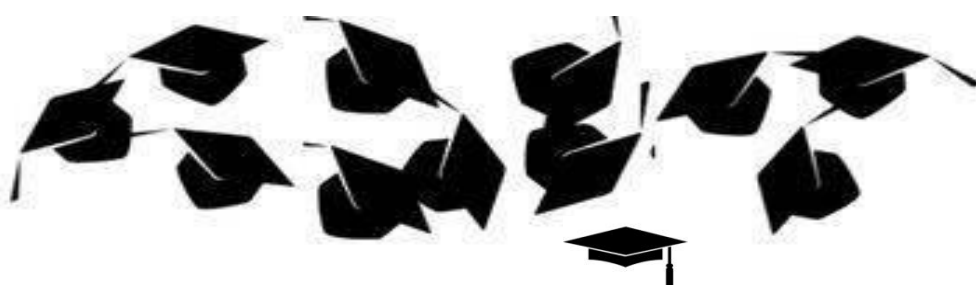
***Dr Aissani Mohammed Taher** Qui nous à aider pour l'interprétation des coupes histologiques. Egalement à **Mme Maatalah hayette**, **Mme Bougguerne Hayette** et **Mme Leksir Fetiha** pour leurs facilités à l'accès à la sonatrach.*

*Nous remercions également **Dr Mahmoudi Abdelghani** (MCA, département de chimie, université 20 août 55, Skikda), qui nous à faciliter la tâche à l'ENS –Kouba et la police scientifique d'Alger pour le protocole expérimental de l'HPLC.*

***Mme Slimen Tich Tich Esmahan /Mme Bouchour Nassira** : Techniciennes de laboratoire de la biologie Animale, Université 20 Aout 55, Skikda. Pour leurs conseils et leur aide, tout au long de notre séjour.*

*Nous remercions d'adresse également à tout nous Enseignants pour leurs générosités et grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

*On tien chaleureusement à remercier tous ceux qui de près ou de loin, nous ont apporté leur sollicitude pour accomplir ce travail.*



## *Dédicace*

Remercie **Allah** de m'avoir donné la force et le courage pour pouvoir réaliser ce modeste travail.

### *A ma chère mère*

*A mon paradis, Aucune dédicace ne serait exprimée mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentie pour mon instruction et mon bien être, je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me partagez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.*

### *A mon cher père*

*Ça été pour moi une bénédiction divine de t'avoir comme père toi qui à tout accepté pour que je sois ce que je suis aujourd'hui, tu m'as inculqué le savoir vivre et savoir-faire, tu m'as insecte à l'école et veille à ma réussite que dieu te garde parmi nous le plus longtemps possible et te bénisse.*

*A ma grande sœur ma moitié **Seloua** qui n'a pas cessé de me conseiller encourager et soutenir tout au long de mes études.*

*A ma très adorée grands mère **Djedjiga** qui ne sait pas vraiment distinguer les lettre des chiffres cependant, elle a rêvé de faire de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*A mes tantes **Malika** et **Nissa** Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutiens et encouragements, Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle.*

*A tout la famille **Abbane** et **Kartout**.*

*A mes chère amies **Khaoula**, **Lina**, **Hiba** En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*A mes collègues, et a tout ce qui ont participé à ma réussite.*

  
*Rayane*





## Dédicace

*C'est avec l'aide et la grâce du dieu que j'ai achevé ce travail modeste que je dédie*

### *À ma mère*

*Ma très chère mère tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne pourra être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Maman, aucuns mots ne seraient exprimés mes sentiments, que dieu te préserve et te procure et langue vie.*

### *À mon père*

*J'ai concrétisé ton souhait...mais tu n'es pas avec moi pour partager ma joie Allah yerhmo.*

### *À mes deux frères*

*Djaber et Raouf et ma chère sœur Maram.*

*A celui qui m'a accompagné tout au long de mes années universitaire...Rayane. «je te souhaite un avenir éclaircissant plant de joie santé et réussite. »*

*A ma chère amie Hadil pour sa sincère amitié, merci pour tout.*

*A mes collègues :Ghazlane et Zomouroda*

### *A celui qui a été à mes côtés en tout temps*

*Qui a partagé ma joie, mon anxiété, ma tristesse, et mes pleurs. Merci de me soutenir et d'essayer de me rendre heureuse, merci pour tous les bons moments, et pour votre aide dans cette période.,*

*À toi ....BÎLÿ.*

*Lina*





# *Dédicace*

## *Au nom de Dieu le Miséricordieux*

*Je voudrais tout d'abord remercier **Dieu Tout-Puissant** de nous avoir de, la force et le courage d'entreprendre ce modeste travail.*

*Avec tous mes sentiments de respect, avec l'expérience de ma reconnaissance. Je dédie ma remise de diplôme et ma joie.*

***Aux** personnes les plus précieuses, mon père "**Ahcen**", ma mère "**Samia**", qui me donnent toujours de l'espoir dans la vie, qui ne cessent de prier pour moi, pour leur amour, surtout pour leurs sacrifices pour arriver à la fin de ma carrière universitaire.*

*A mon cher mari, mon soutien, ma force, qui a toujours été à mes côtés, qui me pousse et me motive toujours dans mes études.*

*Particulièrement, je dédie mon succès à ma petite fille **Sidra**, mon espoir dans la vie, mon amour, qui m'a accompagné tout au long de mon travail, que Dieu me le protège.*

*A mes chers frères, source de joie et de bonheur.*

*Bien sûr, n'oubliez pas ma deuxième famille, en particulier ma belle-mère et mon beau-père "**Amar**", qui m'ont soutenu et travaillé dur avec moi.*

*A tout la famille « **Baiche** » et « **Bouchaour** », en particulier mes grands-parents et ma grand-mère, que Dieu lui fasse miséricorde, et la famille « **Bici** » en particulier.*

*A mon encadreur « **Sabrine Boucetta** », merci d'avoir contribué à ce succès.*

*A mes collègues zomoroda, Rayane, Lina, merci pour tout.*

**Baiche Ghazlane**

# *Dédicace*

*A ma très chère mère **lassoui Souad***

*Quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit.  
T'on affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence a mes cotes a  
toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon très cher père **Djamel***

*Tu as toujours été a mes cotes pour me soutenir et m'encourager. Que ce  
travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A mon cher époux **Medroua Bilel***

*Merci d'être toujours à mes cotes de votre encouragement et surtout pour votre  
patience et votre soutien aux moments difficiles.*

*A mes très chers frères et ma sœur*

***Kamel Abde rahmane Marwan Abde esalem et Zohra***

*Que j'ai trouvés toujours à cotes de moi merci pour votre encouragement et  
votre soutiens, n'oublier pas les chouchous de la famille **Iline et Anes***

*A mes amis*

***HAYATE ZINEB MARWA LOUBNA** merci pour votre encouragement*

*A mes collègues du section **ECOTOXICOLOGI ANIMAL** et surtout **Ghazlane  
Rayane et Lina***

*Je vous exprime tous les bonheurs du monde.*

*A ma belle famille*

*Mes beaux-parents **Salem et Nacira** mes beaux-frères **Lamine et Abde  
alhak** et ma belle sœur **Sara***

*A la fin je remercie mon encadreuse **Bouceta Sabrina***

---

**Intitulée : Effet Eco-toxicologique sur les poissons d'élevage Tilapia « *Oreochromis niloticus* » après une thérapie chimio-Phytologique.**

**Spécialité :** Ecotoxicologie Animale

**Auteurs :** Kartout Rayane ;Kedadria Lina ;Baiche Ghazlane ;Bouhafer Fatma ZohraZoumrouda

**Année :** 2022-2023

---

**Résumé**

La présente étude consiste à un dépistage de résidus d'antibiotique dans les tissus de Tilapia (d'*Oreochromis niloticus*) et l'évaluation l'état de santé des tilapias suite à une antibiothérapie, pour des fins Eco toxicologiques.

Les antibiotiques (AB) ont été largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire pour traiter ou prévenir les maladies. Des résidus d'antibiotiques ont été trouvés dans les milieux aquatiques, mais Leurs effets sur les poissons n'ont pas été correctement étudiés. Ce travail visait à évaluer les Effets sublétaux de l'oxytétracycline (OTC) et l'extrait de l'ail sur les paramètres hématologiques, biochimiques, physiologiques, nutritionnelles, physicochimique, et histologiques développement d'*Oreochromis niloticus*. Les Tilapias ont été exposés pendant 10 jours à l'OTC et l'extrait de l'ail

Globalement, les individus d'*Oreochromis niloticus* ont un poids total (Wt) qui varie ( $33 \leq Wt (g) \leq 117$ ) avec une longueur varie ( $12 \leq Lt(cm) \leq 19$ ). Ces Tilapias ont suivi une antibiothérapie par baignade avec cinq (05) doses différentes de l'OTC (100 ;50 ; 25 ;10 ;0.1) pendant dix (10) jours et une dose orale différents (0.6 ;0.45 ;0.3) (pendant trois (03) jours » avec l'extrait de l'ail.

Les résultats des analyses macroscopiques des poissons, ont montré la présence de divers ses altérations tant sur l'état morphologique. Des poissons ont manifesté des : exophtalmie, perte d'œil érosions, déformations. Que sur l'examen interne (hypoxie et des anémies générales).

Les résultats des tests sanguins ont montré une augmentation hautement significative de la créatinine pour la dose 50 mg/l d'OTC ( $P < 0,01$ ). Chez les poissons traités par l'Ail nous enregistrons une baisse de la créatinine pour le régime de 0,3 g.

Les valeurs maximales de l'acide urique sont enregistrées chez les témoins [(79 ±49,80 g/l], avec l'OTC les tilapias présentent des max d'acide urique avec la concentration de 0,1 et 10 mg/l respectivement (73±39,75 ; 72,33±1,69 g/l). Le Comportement rénal des tilapias avec le régime de 0,3 g d'ail déclenche des maximas allons jusqu'au (315,66±13,65 g/l).

Des effets à court terme des antibiotiques ont été observés pour les Cinq Doses utilisés (0, 1, 10, 25, 50 and 100 mg/l.) indiquant que l'altération physiologique et nutritionnelles et des altérations tissulaires irréversibles au niveau l'hépatopancréas est plausible pour les populations de poissons traités. Cependant, les effets des expositions chroniques à de faibles doses d'AB doivent être étudiés.

Tous les échantillons analysés par HPLC chez les deux structures se sont révélés exemptes en résidus d'antibiotiques. Cette étude a été effectuée sur une colonne C18 réglé à une longueur d'onde de 270 nm. Ils sont donc conformes aux normes réglementaires et considérés comme ne présentant aucun risque sanitaire pour les consommateurs vus qu'ils ne contiennent aucun antibiotique appartenant aux cinq familles testées.

---

**Mots clés :** Tilapia du Nil, d'*Oreochromis niloticus*, *Allium sativum*, Antibiotique, phytothérapie, stress-oxydatif, Tétracycline, Eco toxicologiques

---

**Title:** Eco-toxicological effect on Tilapia "*Oreochromis niloticus*" farmed fish after chemo-phytological therapy.

**Specialty:** Animal Ecotoxicology

**Authors:** Kartout Rayane; Kedadria Lina; Baiche Ghazlane; Bouhafer Fatma Zohra Zoumrouda

**Year:** 2022-2023

---

**Abstract :**

The present study consists of screening Tilapia (*Oreochromis niloticus*) tissues for antibiotic residues and assessing the health status of tilapia following antibiotic therapy, for Eco toxicological purposes.

Antibiotics (AB) have been widely used in human and veterinary medicine to treat or prevent disease. Antibiotic residues have been found in aquatic environments, but their effects on fish have not been properly studied. The aim of this study was to evaluate the sublethal effects of oxytetracycline (OTC) and garlic extract on the hematological, biochemical, physiological, nutritional, physicochemical and histological developmental parameters of *Oreochromis niloticus*. Tilapia were exposed for 10 days to OTC and garlic extract.

Overall, *Oreochromis niloticus* individuals varied in total weight (Wt) ( $33 \leq Wt (g) \leq 117$ ) with length ( $12 \leq Lt(cm) \leq 19$ ). These Tilapias underwent antibiotic therapy by balneation with five (05) different doses of OTC (100 ;50 ; 25 ;10 ;0.1) for ten (10) days and a different oral dose (0.6 ;0.45 ;0.3) (for three (03) days" with garlic extract.

The results of macroscopic analyses of the fish showed the presence of various morphological alterations. Some fish showed: exophthalmos, loss of eye, erosions, deformations. and on internal examination (hypoxia and general anemia).

Blood test results showed a highly significant increase in creatinine for the 50 mg/l OTC dose ( $P < 0.01$ ). In Garlic-treated fish, we recorded a decrease in creatinine for the 0.3 g diet.

Maximum uric acid values are recorded in controls [ $79 \pm 49.80$  g/l], with OTC tilapias present max uric acid with concentration of 0.1 and 10 mg/l respectively ( $73 \pm 39.75$ ;  $72.33 \pm 1.69$  g/l). The renal behavior of tilapia on the 0.3 g garlic diet triggered maxima up to ( $315.66 \pm 13.65$  g/l).

Short-term effects of the antibiotics were observed for all five doses used (0, 1, 10, 25, 50 and 100 mg/l.) indicating that physiological and nutritional alteration and irreversible tissue damage in the hepatopancreas is plausible for treated fish populations. However, the effects of chronic exposure to low doses of AB need to be investigated.

All samples analyzed by HPLC at both facilities were found to be free of antibiotic residues. This study was carried out on a C18 column set at a wavelength of 270 nm. They therefore comply with regulatory standards and are considered to present no health risk for consumers, as they contain no antibiotics belonging to any of the five families tested.

---

**Key words:** Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Allium sativum*, Antibiotic, phytotherapy, oxidative stress, Tetracycline, Eco toxicology

**العنوان:** تأثير السمية البيئية على أسماك البلطي النيلي '*Oreochromis niloticus*' المستزرعة بعد العلاج الكيميائي والنباتي.

**التخصص:** علم السموم البيئية للحيوان

**المؤلفون:** كرتوت ريان؛ قدارية لينة؛ بعيش غزلان؛ بوحافر فاطمة زهرة زمردة

**السنة:** 2023-2022

## **الملخص :**

تتكون الدراسة الحالية من فحص بقايا المضادات الحيوية في أنسجة البلطي (*Oreochromis niloticus*) وتقييم الحالة الصحية للبلطي بعد العلاج بالمضادات الحيوية، لأغراض السمية البيئية.

تستخدم المضادات الحيوية (AB) على نطاق واسع في الطب البشري والطب البيطري لعلاج الأمراض أو الوقاية منها. تم العثور على بقايا المضادات الحيوية في البيئات المائية، ولكن لم يتم دراسة تأثيرها على الأسماك بشكل صحيح. يهدف هذا العمل إلى تقييم التأثيرات شبه المميتة للأوكسي تتراسيكلين (OTC) ومستخلص الثوم على العوامل الدموية والكيميائية الحيوية والفسولوجية والتغذوية والفيزيائية والكيميائية والنسجية لتطور *Oreochromis niloticus*. تم تعريض البلطي لمدة 10 أيام إلى مستخلص الثوم وOTC

بشكل عام، يمتلك الأفراد من *Oreochromis niloticus* وزن إجمالي (Wt) والذي يختلف ( $33 \leq Wt (g) \leq 117$ ) بطول يختلف ( $12 \mu Lt (cm) \leq 19$ ). تلقى هذا البلطي العلاج بالمضادات الحيوية عن طريق الاستحمام بخمس (05) جرعات مختلفة من OTC (100؛ 50؛ 25؛ 10؛ 0.1) لمدة عشرة (10) أيام وجرعة فموية مختلفة (0.6؛ 0.45؛ 0.3) (ثلاثة (03) أيام "بخلصة الثوم.

أظهرت نتائج التحليلات العيانية للأسماك وجود تغيرات مختلفة في كل من الحالة المورفولوجية. أظهرت الأسماك: جحوظ، فقدان عين، تآكل، تشوهات. أما على الفحص الداخلي (نقص الأكسجة وفقر الدم العام).

أظهرت نتائج اختبارات الدم زيادة معنوية عالية في الكرياتينين لجرعة 50 مجم / لتر من OTC ( $P < 0.01$ ) في الأسماك المعالجة بالثوم، نسجل انخفاضاً في الكرياتينين لنظام 0.3 جرام.

تم تسجيل القيم القصوى لحمض اليوريك في الضوابط ( $49.80 \pm 79$  جم / لتر]، مع OTC، يقدم البلطي الحد الأقصى لحمض اليوريك بتركيز 0.1 و 10 مجم / لتر على التوالي ( $39.75 \pm 73$ ؛  $1.69 \pm 72.33$  جم / لتر) يؤدي السلوك الكلوي للبلطي مع النظام الغذائي الذي يحتوي على 0.3 جرام من الثوم إلى زيادة قصوى تصل إلى ( $13 \pm 315.66$ ، 65 جم / لتر).

لوحظت التأثيرات قصيرة المدى للمضادات الحيوية للجرعات الخمس المستخدمة (0، 1، 10، 25، 50، و 100 ملجم / لتر) مما يشير إلى أن التغيير الفسيولوجي والتغذوي وتلف الأنسجة غير القابل للإصلاح في الكبد والبنكرياس أمر محتمل لمجموعات الأسماك المعالجة. ومع ذلك، يجب دراسة آثار التعرض المزمن لجرعات منخفضة من BA.

تم العثور على جميع العينات التي تم تحليلها بواسطة HPLC في الهيكليين خالية من بقايا المضادات الحيوية. تم إجراء هذه الدراسة على عمود C18 بطول موجة 270 نانومتر. لذلك فهي تتوافق مع المعايير التنظيمية ولا تشكل أي مخاطر صحية للمستهلكين لأنها لا تحتوي على أي مضادات حيوية تنتمي إلى العائلات الخمس التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: البلطي النيلي، '*Oreochromis niloticus*'، *Allium sativum*، المضادات الحيوية، الأدوية العشبية، الإجهاد التأكسدي، التتراسيكلين، السمية البيئية.

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des Annexes**

## **Table des matières**

**Résumés**

**Introduction** ..... 1

### ***Chapitre 01 : Synthèse bibliographique***

**1. L'aquaculture**.....4

1.1 Objectifs de l'aquaculture.....4

**2. Définition d'un ATB**.....4

2.1 Pharmacocinétique des antibiotiques.....5

2.2 La toxicité de l'antibiotique.....5

2.3 OTC.....5

2.4 Risques liés à l'utilisation des antibiotiques en aquaculture.....5

2.4.1 Toxicité pour les populations aquatiques.....5.

2.4.2 Risques pour le consommateur.....6

**3. *Allium sativum***.....6.

**4. Les résidus d'antibiotiques**.....6.

4.1 Définition des résidus.....6

...

4.2 LMR des antibiotiques.....6

4.3 Les résidus d'antibiotiques dans les milieux aquatiques.....6

4.4 Risques pour la santé animal.....7

4.5 Risques pour l'homme.....7

### ***Chapitre02 : Matériels & Méthodes***

**1. Choix du Bio-essaie-Poisson *Tilapia Oreochromis niloticus***.....8

1.1 Matériel biologique.....8

**2. Principe De l'antibiothérapie mixte séparée**.....10

2.1.1 L'Antibiotique Chimique : L'Oxytétracycline « OTC ».....	10
2.1.2 Standard de tétracycline.....	11
2.2 L'Antibiotique phytologique à base d'Ail : <i>Allium sativum</i> .....	11
2.2.1 Hydrodistillation.....	12
2.2.2 Préparation de l'antibiotique naturel (l'extrait de l'ail).....	12
<b>3. Diagnostic et examen macroscopique des pathologies des bio-essaies.....</b>	<b>14</b>
3.1.1 Protocole paramètres physicochimique et des bio essais.....	14
3.1.2 Examen externe « ante-mortem et Post-mortem des bio-essaies.....	14
<b>4. Dosage des biomarqueurs hémato-biochimiques du sang de Tilapia.....</b>	<b>15</b>
4.1 Prélèvement sanguin.....	15
<b>5. Composition biochimique de la chair d'<i>O.niloticus</i>.....</b>	<b>17</b>
5.1 Extraction et dosage des constituants.....	17
5.2 Dosage des protéines.....	17
5.3 Dosage des glucides totaux.....	18
5.4 Dosage des lipides totaux.....	19
<b>6. Examen Histopathologies des tissus des Bio-essais <i>Oreochromis niloticus</i> traités. ....</b>	<b>20</b>
6.1 Examen histopathologique.....	21
<b>7. Analyse des résidus de tétracycline dans les bio-essaies de poisson <i>Oreochromis niloticus</i> (HPLC).....</b>	<b>23</b>
7.1 Préparations des solutions pour la gamme d'étalonnage.....	23
7.2 Matériels.....	23
7.2.1 Appareillage et matériels.....	23
7.2.2 Appareillage d'HPLC.....	23
7.2.3 Solvants et produits chimiques.....	24
7.2.4 Diluants et solvants.....	24
7.2.5 Méthode expérimentale et préparation des solutions.....	25
7.3 Solution des échantillons.....	25
7.3.1 Intestin.....	25
7.3.2 Le muscle.....	26
7.4 Conditions chromatographiques.....	27

### ***Chapitre03 :Résultats et discussion***

1. Résultat des examens macroscopique des anomalies externes .....	28
2. Résultats et discussion Biomarqueurs Hémato-biochimiques .....	32
2.1. Bilan renal.....	32
2.1.1. La creatinine.....	32
2.1.2. L'uree.....	35
2.1.3. L'acide urique (g/l).....	37
2.2. Résultats Biochimique du bilan protidique (protéine totale dans le sang) .....	39
2.2.1. TAUX DES PROTIDES T.....	39
3. Variations de la Composition biochimique de la chair d' <i>O. niloticus</i> en après Thérapie (OTC & <i>Allium sativum</i> ).....	45
3.1. Taux de protéines).....	45
3.2. Taux des glucides).....	46
4. Taux de lipides).....	47
Résultats de détection de Résidus OTC par HPLC.....	53
4.1. Conditions optimales pour la détection des antibiotiques en chromatographie liquide.....	53
4.2. Méthode d'extraction des antibiotiques.....	54
4.3. Screening des antibiotiques par HPLC.....	55
4.3.1. Spécificité et sélectivité.....	56
4.3.2. Linéarité.....	56
4.3.3. Limite de détection et limite de quantification.....	57
4.4. Inter-calibration entre les deux méthodes analytiques.....	58
4.5. Analyse des échantillons.....	58
4.6. Analyses statistiques.....	58
4.7. Validation de la méthode analytique (HPLC) pour le dosage de l'OTC.....	59
4.7.1. Spécificité.....	59
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>63</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## *Liste des abréviations*

**µg** : microgramme

**µg** : microgramme

**µg/kg** : microgramme par kilogramme

**µg/l** : microgramme par litre

**Abs** : Absorbance.

**Abs** : Absorbance.

**Abs** : l'absorbance.

**ABTS** : acide 2, 2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

**Acronyme** : The lowest feed conversion ratio (FCR)

**AH** : antioxydant.

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'Aluminium

**ANOVA** : Analyse de variance

**Aq B**: aquarium B

**Aq C**: aquarium C

**Aq D**: aquarium D

**Aq E**: aquarium E

**Aq G**: aquarium G

**Aq H**: aquarium H

**Aq T** : aquarium Témoin

**Aq A** : aquarium A

**Aq F** : aquarium F

**ATB** : antibiotique

**ATB1** : Tétracycline

**ATB2** : antibiotiques naturel (extrait de l'ail)

**AU-BIOLIS** : Acide urique

**CL10** : concentration létale 10

**CL84** : concentration létale 84

**CL90** : concentration létale 90

**CM** : carré moyen

**CREA** : Creatinine sg

**DDL** : degré de liberté

**DL 50** : Dose létale médiane

**Fabs** : test de Fisher

**HEs** : huiles essentielles

**HPLC** : chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression

**HPLC** : La chromatographie liquide à haute performance

**IC50** : Concentration inhibitrice 50 %

**LC-MS** : La spectrométrie de masse par chromatographie en phase liquide

**LD** : la limite de détection

**LMR** : la notion de Limite Maximale de Résidus

**LOEL**: lowest observed effect level

**LQ**: la limite quantification

**NOEL**: no observed effect level

**OTC** : Oxytétracycline

**OTC** : Oxytétracycline

**P** : seuil de signification

**PROT-TT**: Protide T

**RE** : le rendement d'extraction

**SCE** : sommes des carrés des écarts

**SNK** : test de Newmean-keuls

**SPME** : micro-extraction en phase solide

**Tab** : tableau

**TCA** : Les troubles du comportement alimentaire

**UREE-BIO-UV**: Uree

**UV** : ultra-violet

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> L'accumulation des bio-essaies. (Cliché personnel).....	09
<b>Figure 2 :</b> paramètre physicochimique (cliché personnel).....	10
<b>Figure 3 :</b> préparation de l'antibiotique naturel (cliché personnel).....	13
<b>Figure 4 :</b> Examen externe des bio-essaies (cliché personnel).....	14
<b>Figure 5 :</b> Différentes étapes de la prise de sang de <i>Tilapia O. niloticus</i> (cliché personne)....	16
<b>Figure 6 :</b> principal étapes d'extraction des lipides selon le procédé de Shibko et la.(1966).	17
<b>Figure 7 :</b> Différentes étapes de dosage des métabolites. (Cliché personnel).....	19
<b>Figure 8 :</b> Prélèvement tissulaires sous glace (cliché personnel).....	20
<b>Figure 9 :</b> préparation des coupes histologiques (cliché personnel).....	22
<b>Figure 10 :</b> solution de phase mobile.(Photo Personnel-ENS KOUBA) .....	25
<b>Figure 11 :</b> Extraction et préparation des échantillons pour dosage HPLC(photo personnel-skikda Univ).....	26
<b>Figure 12 :</b> La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)-Photo personnel-ENS Kouba.Alger .....	27
<b>Figure 13 :</b> Variations la créatinine (mg/l) chez le Bio -essaie <i>Tilapia</i> du Nil Traité par l'OTC (a) et l'Ail ( <i>Allium sativum</i> ).....	33
<b>Figure 14 :</b> Variations de l'urée (g/l)chez les Bio-essaie <i>Oreochromis niloticus</i> Traité par l'OTC (a) et L'Ail <i>Allium Sativum</i> (b).....	35
<b>Figure 15 :</b> Variations de l'acide urique(g/l)chez les Bio-essaie <i>Oreochromis niloticus</i> Traité par l'OTC (a) et l'Ail <i>Allium Sativum</i> (b).....	38
<b>Figure 16 :</b> Variations de parotides (g/l)chez les Bio-essaie <i>Oreochromis niloticus</i> Traité par l'OTC (a) et l'Ail <i>Allium Sativum</i> (b).....	40
<b>Figure 17 :</b> Taux des protéines (ug/mg de tissu) au niveau la chair d' <i>Quiloticus</i> traités par FOTC(a) et par l'Ail <i>Allium sativum</i> (b) (m+SEM ; n=3) (« significatif, hautement Le suivi dsignificatif*** très hautement significatif, NS Non significatifs .....	45
<b>Figure 18 :</b> Taux des protéines (pg/mg de tissu) au niveau la chair d' <i>O.niloticus</i> traités par POTC(a) et par l'Ail <i>Allium sativum</i> (b) (m± SEM ; n=3). (« : significatif ; ** : hautement significatif ; *** : très hautement significatif ; NS : Non significatifs .....	47
<b>Figure 19 :</b> Taux de lipides (pg/mg de tissu) au niveau la chair d' <i>Oniloticus</i> traités par l'OTC(a) et par L'Ail <i>Allium sativum</i> (b) (m = SEM; n=3). (« significatif. hautement significatif*** très hautement significatif: NS Non significatif».....	49
<b>Figure 20 :</b> procédures de l'HPLC sise la police scientifique d'Alger (Photo personnelle).....	55
<b>Figure 21 :</b> Chromatogramme de l'Oxytetracycline standard (OTC).....	59

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1</b> : Limites de tolérance de certains paramètres physico-chimique <i>O. niloticus</i> (Arrignon,1996) .....	<b>09</b>
<b>Tableau 2</b> :caractéristique chimique de Tétracycline .....	<b>11</b>
<b>Tableau 3</b> : l'examen interne des bio-essaies.(Michel (1989) .....	<b>15</b>
<b>Tableau 4</b> : la gamme d'étalonnage de dosage des protéines Bradford (1976).....	<b>18</b>
<b>Tableau 5</b> : Dosage des glucides totaux réalisation de la gamme d'étalonnage.....	<b>18</b>
<b>Tableau 6</b> : la gamme d'étalonnage de dosage des lipides totaux .....	<b>19</b>
<b>Tableau 7</b> :système chromatographique de l'ENS de Kouba.....	<b>24</b>
<b>Tableau 8</b> :système chromatographique de l de la Police Scientifique (Wilaya d'Alger .....	<b>24</b>
<b>Tableau 9</b> : Désignation des aquariums expérimentaux avec les doses d'ATB <sub>1</sub> "Oxytétracycline"et l'ATB <sub>2</sub> 'Sulfamide' pendant une durée de 10 jours (TA.....	<b>32</b>
<b>Tableau 10</b> :ANOVA à un facteur contrôlé des variations de la créatinine des <i>Tilapia</i> traités par l'OTC (A) et l'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B).....	<b>34</b>
<b>Tableau 11</b> : Résultats des tests de comparaisons multiples (Test de Tukey et test de Dunnett pour la créatinine des <i>Tilapia</i> traités par l'OTC (A) et L'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) .....	<b>34</b>
<b>Tableau 12</b> : ANOVA à un facteur contrôlé des variations de la créatinine des <i>Tilapia</i> traités par l'OTC (A) et l'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B).....	<b>36</b>
<b>Tableau 13</b> : Résultats des tests de comparaisons multiples (Test de Newmean-Keuls (SNK)et test de Dunnett pour L'urée des <i>Tilapia</i> traités par l'OTC (A) et L'Ail ( <i>Allium sativum</i> )(B) .....	<b>37</b>
<b>Tableau 14</b> :ANOVA à un facteur contrôlé des variations de L'acide urique des <i>Tilapia</i> traités par l'OTC (A) et l'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B).....	<b>38</b>
<b>Tableau 15</b> :Résultats des tests de comparaisons multiples (Test de Newmean-Keuls (SNK)et test de Dunnett pour l'acide urique des <i>Tilapia</i> traités par l'OTC (A) et L'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) .....	<b>39</b>
<b>Tableau 16</b> :ANOVA à un facteur contrôlé des variations de protides t (g/l) des <i>Tilapia</i> traités par l'OTC (A) et l'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B).....	<b>40</b>
<b>Tableau 17</b> :Résultats des tests de comparaisons multiples (Test de Newmean-Keuls (SNK)et test de Dunnett pour les protéines totaux des <i>Tilapia</i> traités par l'OTC (A) et L'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) .....	<b>41</b>
<b>Tableau 18</b> :Tests statistiques utilisés pour étudier la linéarité de la méthode d'analyse	
<b>Tableau 19</b> :Calcul des pourcentages de recouvrements pour les <i>O.niloticus</i> traité par l'OTC analysés par HPLC .....	<b>60</b>
<b>Tableau 20</b> :Résultats de Calcul de la teneur en tétracycline trouvée dans les répliques d' <i>O.niloticus</i> Traités .....	<b>61</b>

## *Liste des Annexes*

**Figure A,1 :** Chromatogrammes appliquant les systèmes chromatographiques de labo  
Laboratoire de PLBVB de l'ENS de Kouba.

**Figure A,2 :** Chromatogrammes appliquant les systèmes chromatographiques de labo  
Laboratoire de Police scientifique.



# **Introduction Générale**

## Introduction

L'aquaculture continentale, notamment la pisciculture contribuera largement à la sécurité alimentaire à travers l'amélioration et la diversification de l'alimentation des populations vivant dans les zones rurales et sahariennes du pays. (FAO, 2020).

Le Tilapia (nom commun), poisson blanc des eaux douces, et l'un des plus consommés dans le monde. Car peu exigeant par rapport aux conditions d'élevage et ne nécessitant pas de qualification en matière de conduite, aura plusieurs effets dont : i) La diversification des systèmes de productions agricoles par l'introduction d'activités d'élevages de poissons, ii) La production d'humus pour les sols arables engendré par les excréments des poissons, iii) Une meilleure utilisation de l'espace rural. Enfin, une fixation des populations rurales par la création d'emplois. (FAO, 2020)

L'aquaculture est passée d'une contribution de moins de 10 % de la quantité de produits halieutiques produits dans les années 1970 à environ 50 % à l'heure actuelle (Sorgeloos, 2014). Historiquement, ce sont les Tilapias qui ont fait l'objet des premiers travaux d'expérimentation aquacole en Afrique, principalement au Zaïre et au Congo, en particulier du fait de leur reproduction aisée en captivité (Alliouche, 2010).

En Algérie, les premières introductions du *Tilapia* remontent au début des années 1960, avec des *Tilapia mozombika* et *zillii* en provenance de France qui ont été déversés à Ain Skhouna (wilaya de Saida) et dans les wilayates de Biskra et El Oued. Ces deux espèces restent limitées dans leur développement du point de vue piscicole, car elles n'arrivent pas aux tailles marchandes appréciées par le consommateur (Belakri, 2023).

L'opération d'introduction de *Tilapia* de souche pure (*Oreochromis niloticus*), a eu lieu en mai 2002, dans le cadre de la coopération sectorielle Algéro-égyptienne. Par la suite, ces poissons ont été distribués aux agriculteurs disposant d'infrastructures hydriques à usage d'irrigation agricole. La distribution du *Tilapia* s'est opérée selon le programme national de repeuplement (Alliouche, 2010).

Au début, l'utilisation d'immunostimulants en pisciculture est devenue populaire pour renforcer l'activité des systèmes de défense non spécifiques et conférer une protection contre les maladies. De nombreux antibiotiques sont couramment utilisés pour favoriser la croissance et la santé chez la carpe, la truite et le tilapia du Nil (Essa et al., 1995). En outre, les aliments

artificiels complétés par des antibiotiques ont été utilisés pour prévenir la propagation des maladies et améliorer Le taux de conversion alimentaire le plus bas (FCR) (Reilly et al., 1997).

L'utilisation des antibiotiques et autres agents chimio-thérapeutiques présentent plusieurs inconvénients, dont :i) le risque pathogènes résistants, ii)le problème des résidus de médicaments dans les poissons traités iii)l'impact sur la pollution environnementale et enfin le risque sur la santé public. Par conséquent, l'utilisation d'immunostimulants semble être une alternative attrayante pour contrôler les maladies des poissons (Raa, 1996, Secombes, 1995).

Les antimicrobiens correspondent à une classe de médicaments utilisés à grande échelle en aquaculture qui peuvent être d'origine naturelle ou d'origine synthétique, ayant un effet bactéricide ou bactériostatique qui empêche la croissance d'un agent pathogène (Cabello et al. 2013).

L'oxytétracycline (OTC) est un antibiotique de la famille des tétracyclines groupe et son utilisation est largement répandue dans le traitement des infections bactériennes chez les poissons, en raison de son large spectre, efficacité et faible coût (Rigos et al. 2006). Cet antibiotique a une action bactériostatique et inhibe synthèse protéique chez les bactéries gram-négatives et gram-positives (Rigos et al. 2006). En revanche, son utilisation pendant de longues périodes peut provoquer des dyscrasies sanguines telles que l'anémie aplasique, et elle a récemment été incriminée comme cancérigène.

Des alternatives aux antibiotiques ont été développées, à partir d'extraits de plantes, de manière à renforcer l'immunité des animaux ou à inhiber la croissance des bactéries indésirables (Babu, et al., 2008 ; Immanuel, et al., 2004). En aquaculture, d'autres stratégies de lutte contre les maladies ont également été étudiées, comme la vaccination et l'utilisation de probiotiques (Olivier et al., 2008 ; Qi et al., 2009), mais elles se sont avérées inefficaces dans le cas des crevettes (Deferera , 2000).

*Allium sativum* était utilisé comme promoteur de croissance chez *O. niloticus* (Diab et al.,2002), dans lequel il a augmenté le gain corporel, l'apport alimentaire et efficacité alimentaire (Abdelallatif et al ., 1996). Il a été démontré qu'il avait des activités à large spectre contre les bactéries agents (Gram-positif et Gram-négatif) étudiés in vitro comme in vivo (Abdelallatif et al ., 1996)et la plus grande activité antihelminthique. Ail haché avec d'autres produits biologiques l'extraction (mélange Bio-Gamma) peut être prophylactique contre la plupart des pathogènes des poissons (Heo et al., 1994).

De plus, en tant que remède à base de plantes, il réduit une multitude de facteurs de risque qui jouent un rôle décisif dans la genèse et la progression de l'artériosclérose (Siegel et al., 1999). *Allium sativum* diminue à la fois le cholestérol total et les lipoprotéines de basse densité (LDL-C) en plus de réduire la tension artérielle (Adler et al., 1999). La consommation de sa poudre peut diminuer l'accumulation de lipides dans le foie, augmenter l'excrétion des acides biliaires totaux dans les fèces, et augmenter la capacité antioxydante chez les hamsters (Yaoling et al., 1998).

L'utilisation excessive d'antibiotiques en aquaculture est une préoccupation mondiale pour la santé publique, en raison de la possibilité d'augmenter la résistance. Les effets directs d'une utilisation inadéquate de ces médicaments chez les poissons entraînent une immunosuppression, une néphrotoxicité (Islam et al. 2015), une diminution de l'activité phagocytaire (Reda et al. 2013), du stress oxydatif et des dommages au foie (Guardiola et al. 2012), causant des dommages au système nerveux, la dégradation cellulaire, la mort cellulaire (Rodrigues et al. 2018) et hépatotoxicité (Guardiola et al. 2012). Cependant, l'abus et le non-respect des délais d'attente de ces antimicrobiens pourrait entraîner la présence de résidus de médicaments dans le tissu comestible du poisson. La santé publique pourrait être exposée à de tels résidus via la consommation de tissus contaminés (Morshdy et al. 2019). Seulement, par des méthodes éco-toxicologiques et des études sur plusieurs espèces, déterminant les effets ou la létalité de diverses substances (El-Ghareeb et al., 2019).

Dans cet optique, Cette étude a donc été réalisée pour comparer les effets d'*Allium sativum*, et l'OTC comme antibiotique (Naturel et chimique), sur

- i. Le bilan rénal du sang d'*Oreochromis niloticus* traités y compris le témoin.
- ii. La composition biochimique (Protéines, glucides et lipides)
- iii. Quantification de résidus d'OTC dans la chair de Tilapia du Nil par la méthode HPLC.



Chapitre 01 :

## **Synthèses bibliographiques**

## Synthèse bibliographique

### 1. L'aquaculture

L'aquaculture est définie comme l'art de multiplier et d'élever les animaux et les plantes aquatique (Barnabe, 1991). Selon Barnabe, (1989). L'aquaculture est un secteur en plein essor au niveau mondial. L'aquaculture se développera davantage et progressivement suppléera l'exploitation par la pêche des poissons et autres organismes aquatiques. Un tel développement appelle forcément un développement des problèmes spécifiques de ce type d'élevage (intensif) et notamment l'apparition de nouvelles maladies (essentiellement bactériennes) responsables de nombreuses pertes.

Les moyens disponibles en pisciculture pour faire face à ces maladies bactériennes sont principalement la quarantaine, la prévention par une bonne régie de production, les pratiques de biosécurité, la vaccination et en dernier lieu l'utilisation des antibiotiques.

#### 1.1 Objectifs de l'aquaculture

Le but fondamental, au sens commun, des activités aquacoles est de produire de la matière vivante à partir de l'élément aquatique, c'est-à-dire la production pour la consommation humaine d'aliments riches en protéines. Elle consiste en fait à manipuler les milieux aquatiques, naturels ou artificiels, pour réaliser la production d'espèces utiles à l'homme. (FAO,2020)

### 2. Définition d'un ATB

L'ATB C'est une substance antibactérienne d'origine biologique, produite par des microorganismes, ou de synthèse chimique, capable d'inhiber la vitalité d'autres microorganismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux de germe (Gogny et al., 2001 ; Morin et al., 2005).

Fleming Alexander a découvert les ATB en 1929, ils sont aussi préparés en 1935, les sulfamides et par la suite de nombreux antibiotiques ont été aussi préparés à partir de champignons inférieurs, aussi des bactéries telluriques les plus productrices d'ATB. Les tétracyclines sont découvertes dans les années 1950 (Duval et Soussy, 1990 ; Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

## 2.1 Pharmacocinétique des antibiotiques

Il doit parvenir à son site d'action pour éradiquer une infection. Le passage du lieu d'administration jusqu'au site(s) d'action se fait en quatre phases différentes (Potel et al., 2006) :

- L'absorption
- La distribution
- Les transformations
- L'excrétion

## 2.2 La toxicité de l'antibiotique

Est un point fondamental. Le produit utilisé doit présenter un indice thérapeutique élevé (au moins égal à 5) du fait de la difficulté d'apprécier la quantité du produit réellement absorbée par le poisson. En effet, le dosage relatif au « poids de poisson » dans un bassin ou une cage ne peut être qu'approximatif et la quantité d'aliment médicamenteux consommée (lors de traitement per os) peut varier d'un individu (dominant) à l'autre (dominé ou malade). (Potel et al., 2006)

## 3. L'antibiotique chimique l'oxytétracycline « OTC »

Les oxytétracyclines sont les antibiotiques les plus utilisés en pisciculture bien qu'elles tendent à être remplacées, pour des raisons de résistances, par les quinolones. Ces dernières sont des molécules synthétiques à propriétés anti biomimétiques, dont les principaux antibactériens couramment utilisés en pisciculture sont l'acide oxolinique et la fluméquine. (Potel et al., 2006).

### 3.1 Risques liés à l'utilisation des antibiotiques en aquaculture

#### 3.1.1 Toxicité pour les populations aquatiques

Les effets toxiques des quinolones sont en général faibles. La dose létale (DL50) serait de 4000 mg/kg, dose qui n'est pas utilisable en thérapeutique. Par contre, un état d'affolement a été noté chez les truites arc-en-ciel triploïdes après administration de l'acide oxolinique à des

doses thérapeutiques normales (observation de terrain). Son utilisation chez toute autre espèce de Poissons triploïdes est donc fortement déconseillée. L'oxytétracycline se lie au calcium et se trouve dans les arêtes et les écailles. Sa toxicité peut se manifester par des déformations chez les larves de poisson, à une dose de 100 ppm. (Potel et al., 2006)

### 3.1.2 Risques pour le consommateur :

Le risque pour le consommateur est représenté par les résidus d'antibiotiques dans la chair des poissons. Les effets comportent des risques non négligeables pour la santé du consommateur. En outre, l'absorption non intentionnelle d'antibiotiques favorise l'installation d'une résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes pour l'homme. (Gogny et al., 2001 ; Morin et al., 2005).

## 4. L'antibiotique phytologique l'Ail « *Allium sativum* »

L'ail cultivé, ou *Allium sativum*, est une plante monocotylédone, vivace, donnant des caïeux (gousses d'ail, bulbilles) appréciés dans le domaine culinaire pour leur goût et leur odeur caractéristiques. La partie souterraine se compose d'un bulbe composé pourvu de nombreuses racelles fibreuses. (Miean et al, 2001).

L'ail contient différents composés antioxydants tels que des flavonoïdes et, en plus des composées sulfurées qui contribuent aussi à son action anti-oxydante (Miean et al, 2001 ; Gorinstein et al, 2005 ; Leelarumgrayub et al, 2006).

## 5. Résidus d'antibiotiques

### 5.1 Définition des résidus

Les résidus d'antibiotiques ce sont toutes les substances pharmaco logiquement actives, qu'il s'agisse des principes actifs, d'excipients ou de produits de dégradation, ainsi que leurs métabolites restant dans des denrées alimentaires obtenues à partir d'animaux aux quels le médicament vétérinaire en question a été administré, (Article 1, point 1, du règlement (CEE) n°2377/90) (Milhaud et Pinault, 1999 ; Pouliquen et Le Bris, 2001 ; Kolbener et al.,2005).

## 5.2 LMR des antibiotiques :

La notion de la limite maximale des résidus (**LMR**), et la notion du temps d'attente. LMR des antibiotiques : Limite maximale de résidus, permet d'établir des seuils acceptables pour les substances contenues dans des médicaments vétérinaires pour toutes les denrées alimentaires d'origines animales. En tenant compte de la toxicité de la substance et de l'exposition possible du consommateur de denrées. Au-delà, la commercialisation de la denrée n'est pas autorisée (Laurentie et Sanders, 2002).

## 5.3 Résidus d'antibiotiques dans les milieux aquatiques

Les résidus d'antibiotiques rejetés dans l'environnement sans être transformés peuvent rester biologiquement actifs et présenter des risques pour l'environnement, d'autant plus qu'ils peuvent se concentrer dans la chaîne alimentaire, ils peuvent influencer les biomasses bactériennes de l'environnement que ce soit dans les eaux, les sols, les stations de traitement des eaux, ou les réseaux de distribution d'eau potable. Quant à la sélection de bactéries antibiorésistantes, elle a été mise en évidence autour d'établissements d'élevage, de fermes, de cliniques. Ce phénomène concerne toutes les eaux (Jean-Marie, 2010).

## 5.4 Risques pour la santé animale

Certains ATB présentent une forte toxicité générale qui empêche leur emploi dans beaucoup d'espèces animales. C'est le cas des **ATB** ionophores qui présentent une toxicité cardiaque majeure. En dehors des toxicités directes d'organe spécifique à chaque ATB. (Potel et al., 2006)

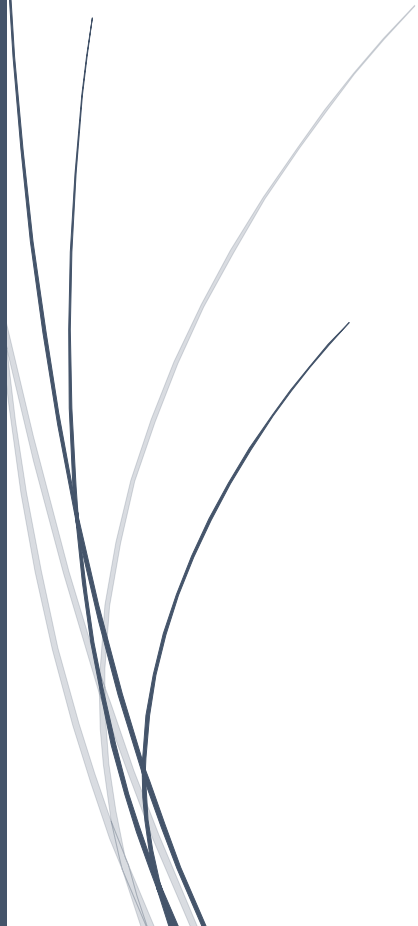
## 5.5 Risques pour l'homme

Des études in vivo sur des modèles animaux visant à évaluer les effets de doses thérapeutiques et de résidus de **OTC** sur la flore intestinale humaines ont mis en évidence les modifications engendrées sur la flore intestinale. Il y a eu une sélection de bactéries résistantes à la OTC, ainsi qu'un effet sur les populations fécales aérobies et anaérobies, sans compter les modifications de certains paramètres métaboliques de la microflore (Châtaigner et Stevens, 2005). On note aussi une action cancérigène. L'ingestion répétée et prolongée de ces produits peut induire le développement de tumeurs cancéreuses (Châtaigner et Stevens, 2005).



Chapitre 02 :

## **Matériels et Méthodes**



## 1. Choix du Bio-essai-Poisson Tilapia *Oreochromis niloticus*

Les modèles biologiques sont des espèces chez qui les paramètres biologiques sont mesurés lors des études éco toxicologiques. Le tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* a été l'organisme modèle utilisé dans le cadre de notre étude. De façon générale, le choix de l'organisme modèle lors des études de manipulation en milieu naturel est guidé par trois critères primordiaux que respectent *Oreochromis niloticus* :

- L'organisme doit être représentatif pour l'écosystème étudié.
- L'organisme doit être euryèce.
- L'écophysiologie de l'organisme doit être maîtrisée.

En effet, *Oreochromis niloticus* est l'espèce présente des potentialités éco toxicologiques déjà signalées par plusieurs auteurs (Lacroix, 2004). Ainsi, elle

- Supporte des manipulations et est facilement manipulable.
- A des techniques d'échantillonnages faciles.
- A des techniques de reproduction en captivité maîtrisées et très documentées.
- Supporte la nourriture artificielle.
- Est disponible en toute saison.
- A l'entièreté de son cycle de développement en eau douce.
- A une croissance rapide.

C'est donc clair que notre espèce modèle répond théoriquement à des critères que doivent avoir des espèces sentinelles selon (Rivière ,1993 ; Amiard-Triquet ,2008).

### 1.1 Matériel biologique

Dans cette étude le Tilapia de Nil *Oreochromis niloticus* a été choisi comme organisme d'essai.

Le Tilapia du Nil est un Cichlidae Cette expression est d'origine africaine du mot «thiape » qui veut dire poisson (CHAPMAN, 2003) appartenant au groupe des poissons incubateurs buccaux uni-parentaux maternels. Il est caractérisé par : une coloration grisâtre avec poitrine et flancs rosâtres et une alternance de bandes verticales claires et noires (Trewavas, 1983).

La position systématique de Tilapia du Nil adoptée ici est inspirée de (Bailly, 2009) :

- Règne : Animalia
- Embranchement : Chordata
- Sous-embranchement : Vertebrata
- Super-classe : Gnathostomata Classe : Actinopterygii
- Ordre : Perciformes Sous-ordre : Labroidei
- Famille : Cichlidae
- Sous-famille : Pseudocrenilabrinae
- Genre : Oreochromis
- Espèce : *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Tableau 1: Limites de tolérance de certains paramètres physico-chimique *O. niloticus* (Arrignon,1996)

Paramètres	Limites de tolérances
T (°C)	21 - 30
O2 (mg/l)	> 5
S (%°)	< 29
PH	5 - 11

Les Tilapias, sont obtenus du service aquaculture département des ressources vivantes (Aqua IZAK-BISKRA). Ils ont été transférés dans des aquariums au laboratoire pour employer comme model biologique pour cette étude. (Fig 1)



Figure 1: L'accumulation des bio-essais. (Cliché personnel)

Lorsque les poissons sont arrivés nous les avons acclimatés dans un bassin de 600L pour se calme, alimentés en eau propre. Les poissons ont été alimentés en air comprimé via des pompes à air, et à un cycle lumière obscurité de 10 h / 14 h et la température de l'eau ambiante 21 à 26 ° C, le pH et l'oxygène dissous 4,8 à 7,4 mg/L respectivement. (Fig 2)

Nous avons rempli 9 aquariums avec l'eau et une cuillère de bleu de méthylène (solution aqueuse a 5 % efficace contre les points blancs, les mycoses et comme léger désinfectant pour les pontes) pendant 24h pour stériliser les aquariums.

Les poissons ont été nourris à la main avec un régime commercial (ALLUER TIL-PRO PREA EX 3MM – Goissen-Germany).



Figure 2 : paramètre physicochimique (cliché personnel).

## 2. Principe De l'antibiothérapie mixte séparée

### 2.1.1 L'Antibiotique Chimique : L'Oxytétracycline « OTC »

L'Oxytétracycline a été préparées avec soin par dilution d'AB dans l'eau et été conservé a l'obscurité, l'extrait de l'ail a été préparer et mélangé avec la nourriture des poissons et conservé dans une boîte fermée et sèche.

Nous avons préparé 9 aquariums de 50L avec poids totale approximatif. Les essais ont été réalisés dans des conditions contrôlés ou laboratoire.

45 individus de tilapias de poids (33 à 117g) et une longueur varie (12 à 19 cm) ont été exposés 5 Aquariums (Aq A, Aq B, Aq C, Aq D, Aq E) par voie de Balnéation au ATB1 (OTC) Les concentrations nominales suivantes d'OTC ont été Utilisé : 0,1 ;10 ; 25 ; 50 et 100 mg/l (OCDE, 2020). Le test a été effectué sous conditions d'essai semi-statiques.

Trois autres aquariums (Aq F, Aq G, Aq H) ont été exposés par voie orale (alimentaire) au l'extrait de l'ail de l'ordre de concentration (0.6g ;0.45g ;0.3g) et un aquarium témoin. (Militz et al., 2013).

Les poissons ont été nourris deux fois par jours pendant 10 jours l'exposition aigue et le milieu d'exposition a été renouvelé a 80% après 48 heures d'exposition.

À la fin de Test (30jours), les poissons vivants ont été rapidement sacrifiés par décapitation. Plusieurs des échantillons d'intestins, des muscles, du foie et des reins, par Traitement, pour chaque antibiotique, ont été isolés.

### 2.1.2 Standard de tétracycline

Sont des dérivés hydrogénés du cycle naphtacène produits par les Actinomycètes. Est un antibiotique. Il est utilisé non seulement pour traiter les infections bactériennes chez les poissons, il est généralement considéré comme un traitement pour les maladies locales de la peau, telles que les ulcères ou la pourriture des nageoires. (Tab. 2).

Tableau 2: caractéristique chimique de Tétracycline.

Nom du produit	Tétracycline
Famille	Cyclines
Formule	$C_{22}H_{24}N_2O_8$
Poids moléculaire	444,435 g/mol
Solubilité	Soluble dans l'eau

## 2.2 L'Antibiotique phytologique à base d'Ail : *Allium sativum*

Notre étude a porté sur les bulbes d'*Allium sativum* récoltés de la région d'El Harrouche de la wilaya de Skikda Algérie durant le mois de février de l'année 2023.

A partir des bulbes d'*Allium sativum* nous avons extrait l'huile essentielle par la méthode d'hydrodistillation. L'extraction a été effectuée au niveau du Laboratoire de Chimie Analytique au Département de Biologie à l'Université de 20 aout 1955 Skikda.

Avant l'hydrodistillation nous avons procédé à faire macérer notre matériel végétal de 2 Kg dans de l'eau distillé, chaque 200g de bulbes d'*Allium sativum* ont été coupés en petits morceaux puis homogénéisés dans 1L de l'eau distillé à l'aide d'un mélangeur pendant une minute à vitesse moyenne, l'homogénat obtenu est gardé pendant une heure en macération.

### 2.2.1 Hydrodistillation

Après une heure de macération l'homogénat est versé dans une fiole rondet de 1L puis porté à l'ébullition pendant 3 heures dans l'hydrodistillateur. Les extractions ont été répétées 7 fois.

Sous l'action de la chaleur, les cellules sécrétrices de l'huile essentielle éclatent et libèrent des composés organiques volatils. La vapeur d'eau formée va entraîner avec elle les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant où ils vont se condenser et chutent dans un bécher. L'eau et l'huile essentielle se séparent par différence de densité en deux phases : huile essentielle, eaux aromatiques.

Nous avons versé la totalité du distillat dans une ampoule à décanter et le laisser reposer. Lorsque les phases sont bien séparées, la phase organique a été récupérée dans des petits flacons. Les HE obtenues ont été stockées mises dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation pour les tests de l'activité antioxydante.

### 2.2.2 Préparation de l'antibiotique naturel (l'extrait de l'ail)

Dans notre étude nous avons utilisé la technique d'extraction de l'ail à l'aide d'un solvant pour préparer notre antibiotique naturel. **(Fig 3)**

Extraction de Ail :

Avant de commencer l'extraction nous avons procédé à macérer 500g d'*Allium sativum* dans 500ml solvants Méthanol, la durée de macération est de 48 heures, avec une agitation magnétique au cours de la première heure et à température ambiante. Après filtration sur papier Wattman, le solvant été évaporé au Rotavapor pendant 30 minutes.

### Principe de Rotavapor :

Un évaporateur rotatif (ou rotavap, ou Rotavapor) est un appareil de laboratoire utilisé généralement en chimie organique pour évaporer rapidement des solvants après avoir été utilisés dans une extraction ou dans un milieu réactionnel. Le plus souvent, l'évaporation du solvant est menée sous pression réduite (afin d'accélérer l'étape) que l'on obtient au moyen d'une trompe à eau ou d'une pompe à vide. L'évaporateur rotatif est souvent appelé, par abus de langage, Rotavapor ou "Büchi" (noms de deux marques très courantes) (Figure 3). Il est composé de plusieurs parties :

- Un réfrigérant en spirale, équipé d'une prise de vide et d'un robinet pour casser le vide, un ballon de recette pour le distillat, situé dans la partie basse du réfrigérant.
- Un moteur, qui assure la rotation du ballon évaporateur (en forme de poire), par l'intermédiaire d'un tube rotatif d'admission des vapeurs. Le ballon évaporateur contient la solution dont on doit chasser le/les solvant(s).
- Un bain marie, chargé de chauffer le ballon évaporateur (car l'évaporation est un processus endothermique).

L'évaporateur rotatif permet de réaliser une distillation rapide et efficace du solvant, sans exposer les molécules synthétisées (parfois fragiles) à un chauffage trop important grâce à une diminution de la pression. En effet, plus la pression diminue, plus la température d'ébullition du solvant diminue. Après en met l'entrer résultant dans les boîtes de Pétri et après à l'étuve jusque à sécher.

Le mélange sec a été retiré des boîtes de Pétri et mélangé avec l'alimentation des poissons « Tilapias » selon trois doses différentes (0,3g ; 0,45g ; 0,6g).

**Figure 3 :** préparation de l'antibiotique naturel (cliché personnel).



### 3. Diagnostic et examen macroscopique des pathologies des bio-essaies.

#### 3.1.1 Protocole paramètres physicochimique et des bio essais

À la fin de l'expérience, tous les poissons survivants ont été à jeun pendant 24h, Ils ont été collectés à l'aide d'une épuisette et de leurs poids individuels déterminé pour le gain de poids et les estimations de poids finales. Tout décès de poissons pendant l'expérience a été enregistré pour la détermination du taux de survie. Nous avons examiné les poisson et comparé à un poisson normal, pour nous assurons qu'ils sont à l'abri de toute condition anormale. Ensuite nous avons mesuré les paramètres biométriques. (Fig. 4 )



Figure 4 : Examen externe des bio-essaies (cliché personnel).

#### 3.1.2 Examen externe « ante-mortem et Post-mortem des bio-essaies

Nous avons examiné l'état extérieur des bio essais « Tilapias » identifié les changements survenus notre objectif était de déterminer (Fig 4): Ce qui est étrange au poisson (parasites) ; Changement de caractère (agité, stress); Changement de couleur (pale, tachez) ; Changement de paramétra physicochimique (la taille, le pois) ; Les lésions en relief (tumeurs, gonflement).

L'Autopsie a permis de rechercher les lésions au niveau du tissu conjonctif sous-cutané, des muscles, des viscères abdominaux et thoraciques, à l'éosine et à l'hématoxyline. Nous ouvrants la cavité abdominale de chaque poisson et examiné ce qui est anormal gonflement, aspect hémorragique, tumeur .... Nous avant résumer notre examinassions dans le **tableau 3** ci-dessous.

Tableau 3: l'examen interne des bio-essais.(Michel (1989))

Maladie	Définition	Agent	Type
<b>Septicémie (Hémorragie)</b>	On appelle hémorragie l'effusion plus ou moins considérable de sang hors d'un vaisseau sanguin. (Garnier, 2000)	<i>Aeromonas, Hydrophila, et aspèces voisines.</i>	Bactérie.
<b>Anémie</b>	L'anémie est l'appauvrissement du sang caractérisé par la diminution d'un de plusieurs, où de tous ses éléments. (Garnier, 2000)	<i>Aeromas.</i>	Bactérie.
<b>Maladie soculaires</b>	L'exophtalmie est une pathologie qui met en danger l'intégrité oculaire des poissons de l'aquarium. Endophtalmie est l'inflammation de tissu internes de l'œil. (Garnier, 2000).	<i>Pseudomonas et Aeromoas.</i>	Bactérie.
<b>La pourriture des nageoires Columnaris.</b>	La pourriture des nageoires d'un poisson est un symptôme très fréquent dans les aquariums. Cette pourriture molle est maladie très mortelle si elle n'est pas prise en charge rapidement.	Flavobactérium columnare.	Bactérie.
<b>Atteintes causées par une infection à Pseudomonas</b>	Les affections les plus graves touchant des poissons d'aquarium d'eau douce. Elles sont dues à des mycobactéries (comme la tuberculose de l'homme ou des bovins, mais les espèces sont différentes).	Streptococcus Enterococcus sp.	Bactérie.
<b>Congestion (Hyperémie)</b>	La congestion est l'excès de sang dans les vaisseaux d'un organe ou d'une partie d'organe (Garnier, 2000).		

## 4. Dosage des biomarqueurs héмато-biochimiques du sang de Tilapia

### 4.1 Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin a été réalisés après le traitement des bio essais « Tilapias » des (Aq A; Aq B; Aq C; Aq D; Aq E) par le premier ATB1 « OTC » et les bio-essais des (Aq F; Aq G; Aq H) par l'exposition aux le second ATB2 « L'extrait d'ail »

Nous avons préparé un bain d'anesthésie dans un petit aquarium en verre par mettent quelques clous de girofle dans l'eau et laissez agir pour quelques min, avec un filet en transférant les poissons dans le bain d'anesthésie pendant 2 à 5 min, Au fur et à mesure que le temps passe, observez les poissons arrêtez enfin de nager. L'utilisation d'un anesthésique général, le méthane sulfonate de tricaine (MS-222 ; Sandos) a été recommandé avant la ponction cardiaque (Snieszko, 1960). (Fig.05).

Nous avons utilisé plusieurs techniques de prélèvement sanguin : ponction cardiaque, ponction veineuse et sectionnement du pédoncule caudal. Les paramètres étudiés lors de notre étude sont les paramètres hématologiques (GB, GR, HB, PLT) et les paramètres biochimiques glycémie (GLY) et paramètres biochimiques (CHOL TOTAL, TGR, PRTS) (Hrubec *et al.*, 2000). L'anticoagulant de choix est l'EDTA, car il permet de conserver les composants sanguins sur une plus longue période, Les tubes ont été conservé dans une glacière et transféré chez le l'laboratoire DOS-SONATRACH-SKIKDA pour être analysé.



**Figure 5:** Différentes étapes de la prise de sang de *Tilapia O. niloticus* (cliché personnel)[1.Le bain d'anesthésie avec les clous de girofle. 2. Ponction de l'aorte dorsale. 3. ponction cardiaque. 4.Prélèvement branchial. 5. conserver les composants sanguins. 6. La circulation sanguine simple boucle chez les poissons.].

## 5. Composition biochimique de la chair d'*O.niloticus*

### 5.1 Extraction et dosage des constituants

L'extraction des différents constituants (protéines, glucides, lipides) est réalisée selon le procédé de [Shibko et al. \(1966\)](#) à partir de la chair d'*O.niloticus* traités par l'Ail et par l'OTC. conservées dans 01 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20 % [ 20 g TCA, 100 ml eau distillée ]. Après broyage mécanique (HEIDOLPH RZR 2100) puis homogénéisation aux ultrasons (SONIFER B-30), une première centrifugation (5000 trs / mn, 10 mn) est effectuée et le surnageant I récupéré servira au dosage des glucides totaux. Le culot I reçoit 1 ml du mélange éther/chloroforme (v/v) et après une seconde centrifugation (5000 trs / mn, 10 mn) le surnageant II sera destiné au dosage des lipides totaux, alors que, le culot II est repris dans 1 ml de NaOH (0,1 N) et sera utilisé pour la quantification des protéines totales (Fig. 8).

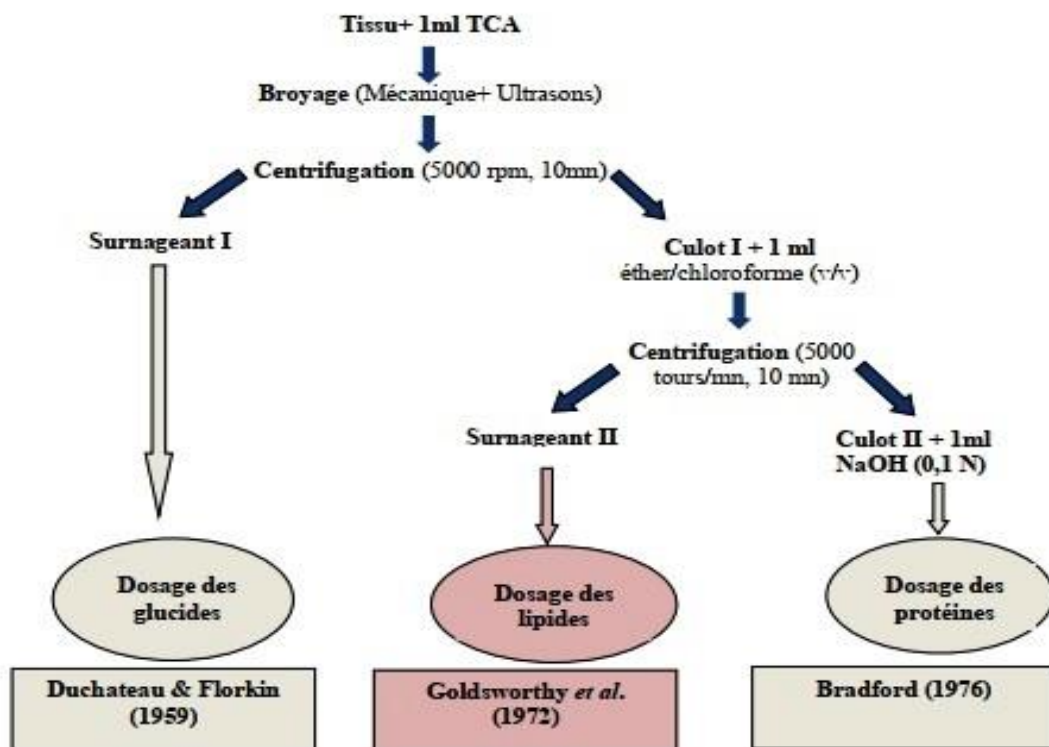


Figure 6: Principales étapes d'extraction des lipides selon le procédé de [Shibko et al. \(1966\)](#)

### 5.2 Dosage des protéines

La quantification des protéines a été faite selon [Bradford \(1976\)](#) sur une fraction aliquote de 0,1 ml de l'homogénat, avec le bleu brillant de coomassie ( G 250, Merck ) comme réactif ( 50 mg de bleu brillant de coomassie, 25 ml d'éthanol ( 95% ) , 50 ml d'acide orthophosphorique (85%) et complété à 500 ml avec l'eau distillée). L'albumine de sérum de bœuf (Sigma, France) a été utilisé comme standard. Les absorbances ont été lues à une longueur

d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, et la gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution d'albumine à 1 mg/ml selon le **Tableau 04**.

**Tableau 4:** la gamme d'étalonnage de dosage des protéines *Bradford (1976)*

Tubes	1	2	3	4	5	6
<b>Solution albumine (µl)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Eau distillé (µl)</b>	100	80	60	40	20	0
<b>Réactif BBC (ml)</b>	4	4	4	4	4	4

### 5.3 Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été effectué selon Duchateau et Florkin (1959). Cette méthode utilise l'anthrone comme réactif (150 mg d'anthrone 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose (1g/l) comme standard. (**Tableau 5**).

**Tableau 5:** Dosage des glucides totaux réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
<b>Solution mère de glucose (µl)</b>	0	20	40	60	80	100
<b>Eau distillé (µl)</b>	100	80	60	40	20	0
<b>Réactif d'anthrone(ml)</b>	4	4	4	4	4	4

La méthode consiste à additionnée à une fraction aliquote de 100 µl de surnageant, 4 ml de réactif d'anthrone et après chauffage du mélange dans un bain marie (80°C pendant 10 min) une coloration verte se développe, dont l'intensité mesurée à une longueur d'onde de 620 nm est proportionnelle à la concentration des glucides présentent dans l'échantillon.

## 5.4 Dosage des lipides totaux

La concentration des lipides totaux a été estimée selon Glodsworthy et Al.,1972 utilisant le réactif sulfophosphovanillinique (0,38 g de vanilline, 55 ml d'eau distillée et 195 ml d'acide orthophosphorique à 85 %). La solution mère des lipides est préparée en utilisant l'huile de table (Cevital) selon la procédure suivante : 25 mg d'huile de table pesés dans un tube Eppendorf ; cette quantité est ensuite reprise dans 10 ml du mélange (éther / chloroforme) (V/V) Selon **le tableau 06**.

**Tableau 6** : la gamme d'étalonnage de dosage des lipides totaux.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant éther chloroforme(µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif de vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Après évaporation des prises aliquotes de 100 µl de surnagent II dans un bain à sec à 40°C, on additionne 1 ml d'acide sulfurique concentré (96%), les tubes fermés sont agités et chauffés dans un bain à sec à 100°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, on prélève 200 µl de chaque tube auxquels on ajoute 2,5ml de réactif sulfophosphovanillinique et on agite. Après 30 minutes à l'obscurité, le complexe se colore en rose. La densité optique est lue dans un spectrophotomètre (Jenway 6300 ) à une longueur d'onde de 530 nm .



**Figure 7**: Différentes étapes de dosage des métabolites. (Cliché personnel).

## 6. Examen Histopathologies des tissus des Bio-essais *Oreochromis niloticus* traités.

Nous avons réalisé des prélèvements d'organe pour l'ensemble des poissons après la thérapie par l'AOTC et le régime D'Ail « *Allium sativum* ».

Le corps du poisson a été examiné à la recherche d'anomalies (le cas échéant) et placé sur une planche à dissection. La cavité corporelle a été ouverte à l'aide de ciseaux et le mésentère et le tissu conjonctif reliant les anses de l'intestin et du foie se coupent et les organes se séparent. Les organes ont ensuite été placés dans une boîte de Pétri, en enlevant soigneusement le tissu musculaire sur le côté de chaque poisson. (Fig 8)

Les échantillons ont été emballés dans des sacs stériles et conservés à -18 °C jusqu'à leur analyse (Mukota et al., 2020).

Le fois la ratte et la bille de chaque poisson a été conservés dans une solution de formol 4% pour la fixation des tissus, puis nous l'avons emmenée au service anapath CHU Skikda pour réaliser les coupes histologiques.



Figure 8: Prélèvement tissulaires sous glace (cliché personnel).

## 6.1 Examen histopathologique

Les organe (Foie, Bille, Ratte) ont été sélectionnée et disséqués pour la préparation histopathologique, la technique histopathologique assure la description des détails des modifications des cellules. La réalisation de ces coupes a été effectuée suivant le Protocoll optimisé **fig 11**:

- **Fixation** : La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Les liquides fixateurs les plus utilisés en pratique courante sont le formol, la durée de fixation et le volume du fixateur utilisé varient selon le volume des prélèvements.
- **Déshydratation** : Le but de cette technique est d'éliminer l'eau contenue dans les organes, par un passage du prélèvement dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (de l'alcool à 50° jusqu'à l'alcool absolu 100°) puis dans des bains de xylène ou de toluène.
- **Inclusion (Enrobage)** : Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines, le prélèvement baigne dans de la paraffine fondue (chauffée à 56° C) donc devenue liquide et qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve un bloc.
- **Coupe : (Microtomie)** Le passage du bloc de paraffine dans un microtome qui permet de réaliser des tranches de section de 2 à 5 µm d'épaisseur, les coupes sont recueillies sur des lames de verre.
- **Déparaffinage** : Les lames sont placées sur une plaque chauffante (à 45-60°C) pendant 15 min, afin d'obtenir la liquéfaction. Éliminer la paraffine en passant les lames dans des bains de xylène.
- **Réhydratation** : En immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool 50°), puis dans l'eau distillée.
- **Coloration** : Le but de la coloration est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires.
- **Montage et observation microscopique** : Les lame ainsi colorées sont couvert de lamelles et sont alors prête à l'observation microscopique.



Figure 9: préparation des coupes histologiques (cliché personnel)

## 7. Analyse des résidus de tétracycline dans les bio-essais de poisson *Oreochromis niloticus* (HPLC):

Afin d'étudier le rendement de la méthode pour le tetracycline, nous avons préparé des solutions des échantillons de muscle et intestin des poissons exposé (AqA, AqB, AqC, AqD, AqE et Aqt) de Trtracycline standard. Chaque solution d'échantillon a été analysée au PLBVB de l'ENS de Kouba (Alger) et le Laboratoire central de la police scientifique

### 7.1 Préparations des solutions pour la gamme d'étalonnage :

Des solutions de concentrations croissantes ont été préparées à partir de la poudre du standard d'érythromycine qui nous a été fourni. Le protocole appliqué à la linéarité nécessite des dilutions successives dans un intervalle de 5 concentrations de 0.1 à 100 µg/ L. Chaque solution a été préparée et testée.

### 7.2 Matériels :

#### 7.2.1 Appareillage et matériels :

- **Balance analytique :** C'est une balance très sensible dont les caractéristiques sont : FA2004B, Max : 220 g, D : 0,1mg, Tare : 0,00000.
- **Agitateur vibrant :** De type VORTEX.
- **Flacons stériles :** Nous avons mis les solutions mères des standards ainsi que les différentes dilutions réalisées.
- **Flacon Agilent 2 ml Chromoptic.**
- **Macro-pipette digitale :** Cette macro-pipette à volume Réglable est de type EUROSMART. Elle a une capacité volumique de 1 à 10 ml.
- **Filtre millipore** Le papier filtre utilisé pour filtrer les solutions de la phase mobile est de type Millipore GS (0,22µm). (Milford, MA, USA).
- **Filtres pour seringues (ISOLAB PTFE 0.22 µm).**
- **Filtre sous vide**
- **HPLC :** (Agilent Technologique 1260 infinity)

#### 7.2.2 Appareillage d'HPLC

Les essais chromatographiques de cette étude ont été réalisés dans deux laboratoires différents à savoir ; le Laboratoire de PLBVB de l'ENS de Kouba (Alger) et le Laboratoire central de la police scientifique (Wilaya d'Alger). Par conséquent, deux systèmes chromatographiques en phase liquide (HPLC) ont été utilisés, l'un est de modèle HPLC-Agilent,

Série de 1260 (CAUSA) et l'autre système est de modèle Merck-Hitachi (Darmstadt, Germany). Les composants caractéristiques de chaque système sont regroupés dans le tableaux 7 suivants :

Tableau 2 : système chromatographique de l'ENS de Kouba

<b>Laboratoire de PLBVB de l'ENS de Kouba</b>	
<b>Chromatographe d'HPLC de type</b>	Agilent HPLC, Série de 1260
<b>Dégazeur de type</b>	1260 Infinity High Performance Degasser
<b>Une pompe à haute pression</b>	1260 Infinity II Binary Pump
<b>Un détecteur</b>	1260 Infinity II Diode Array Detector HS
<b>Colonne analytique en phase inverse</b>	C18 de type Zorbex (150 mm X 4.6 mm, 5 µl
<b>Vanne d'injection</b>	60 Infinity II Manual Injector (CC, USA) a boucle d'échantillonnage d'une capacité de 20 µl
<b>Système de contrôle (intégrateur)</b>	Agilent 1260 Infinity II LC System
<b>Un logiciel pilote</b>	Lab Advisar software, version B.02.10

Tableau 8 : système chromatographique de l de la Police Scientifique (Wilaya d'Alger)

<b>Laboratoire Central de la Police Scientifique (Wilaya d'Alger)</b>	
<b>Chromatographe d'HPLC de type</b>	Agilent HPLC, Série de 1100
<b>Dégazeur de type</b>	1100 Infinity High Performance Degasser
<b>Une pompe à haute pression</b>	1100 Infinity II Binary Pump
<b>Un détecteur d'UV-Vis modèle</b>	1100 Infinity II Diode Array Detector HS
<b>Colonne analytique en phase inverse nommée</b>	C18 (150 mm X 4,6 mm, 5 µm).
<b>Vanne d'injection modèle</b>	1100 Infinity II Manual Injector (CC, USA) à boucle échantillonnage d'une capacité de 20µl.
<b>Système de contrôle (intégrateur) Modèle</b>	Agilent 1100 Infinity II LC System
<b>Un logiciel pilote</b>	Lab Advisor software, version B.02.10

### 7.2.3 Solvants et produits chimiques

Les réactifs et les solvants utilisés pour cette analyse étaient de qualité analytique ou de la plus haute pureté disponible. L'eau était dé-ionisée.

### 7.2.4 Diluants et solvants

- Méthanol pour HPLC (Honeywall).
- Acétonitrile pour HPLC gradient grade  $\geq 99.9\%$  (Sigma-Aldrich).
- Acide formique 98-100% (BIOCHEM Chemopharma)
- Eau bidistillée : eau déminéralisée bouillie 2 fois et exposée à des rayons UV.

Tous les solvants et standard étaient de catégorie analytique. L'acétonitrile et le méthanol sont le plus souvent utilisés. Les réactifs utilisés sont de qualité analytique et l'eau utilisée est pure.

## 7.2.5 Méthode expérimentale et préparation des solutions

### 7.2.5.1 Solutions mères tétracycline

Nous avons mélangé 10mg standard pur de tétracycline avec 10 ml de méthanol afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 1 mg/ml.

### 7.2.5.2 Solution de phase mobile Oxytétracycline

Sous une hotte nous avons diluée 20 ml d'acide formique dans 180 ml d'eau bidistillée afin d'obtenir une solution de 200ml, en mélange 160 ml de cette dernière (Acide formique 0.1%) avec 240 ml d'acétonitrile. Ensuite nous filtrons la solution à l'aide d'un filtra sous vide. (Fig 12)



Figure 10 : solution de phase mobile.(Photo Personnel-ENS KOUBA)

## 7.3 Solution des échantillons

### 7.3.1 Intestin

Dans des tubes à essai nous avons mélangé deux grammes (2g) de filets (intestin) hachés des bio essai avec 32ml de méthanol et 10 ml de HCL. Après homogénéisation l'extractions ont été agités pendant 5 min. Les échantillons ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 15 min (SIGMA), le surnageant a été filtré à travers un filtre en nylon avec un diamètre de pore de 0,45  $\mu$ m. Ensuite 0,25 ml du filtrat été placé dans une fiole jaugée (5 ml) de l'eau

contenant 0,1% d'acide formique a été ajoutée jusqu'à 5 ml, puis filtrée pour une deuxième fois à l'aide d'un filtre en nylon de 0,45 ml.

### 7.3.2 Le muscle

Dans un tube à essai nous avons mélangé 2 ml d'homogénat d'échantillons de muscle avec 1 ml d'acide nitrique (30%), 0.1 ml d'acide citrique, 4 ml de méthanol et 1 ml d'eau déionisée. Les échantillons ont été centrifugés à 5300 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été filtré à travers un filtre en nylon avec un diamètre de pore de 0,45 ml. ( Jevinova et al.,2003)

Avons l'analyse chromatographiques, tous les échantillons sont filtrés une dernière fois avec un filtres pour seringues (ISOLAB PTFE 0.22  $\mu$ m), en verse le filtre dans des flacon Agilent 2 ml (Chromatique).

Ensuite, 20  $\mu$ l de chaque solution a été injectés dans le système HPLC (une pompe de chromatographie à liquide constant équipée d'un échantillonneur automatique et d'un Surveyor, Thermoscientific Company,USA) pour l'analyse.



*Figure 11: Extraction et préparation des échantillons pour dosage HPLC(photo personnel-skikda Univ)*

## 7.4 Conditions chromatographiques

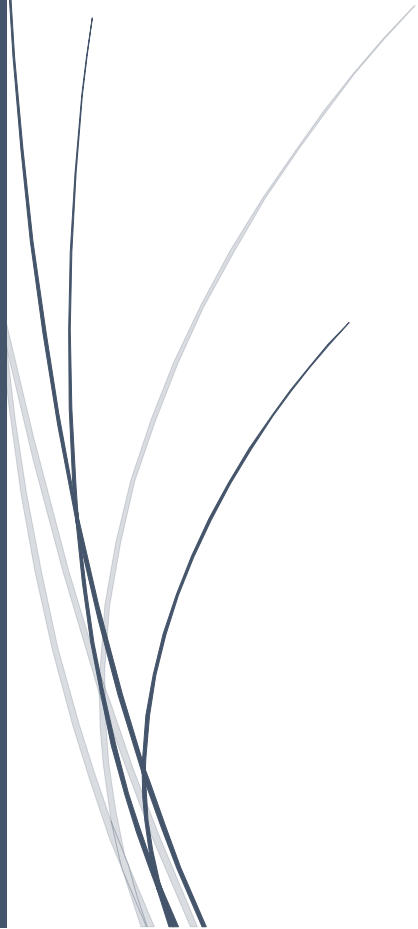
Une phase mobile d'0,1 % d'acide formique : acétonitrile ; Isocratique : 40 % 0,1 % d'acide formique (A) : 60 % d'acétonite (B) et utilisant une méthode de gradient avec un débit de 0,5 ml/min à 40 °C a été utilisée. La séparation a été effectuée sur une colonne hypersil gold C18 (5  $\mu$ m, 150  $\times$  4,6 mm i.d.) avec phase mobile. La détection a été effectuée avec un détecteur à réseau de photodiodes (PDA) réglé à une longueur d'onde de 270 nm. La quantification des résidus dans les échantillons a été obtenue et calculée à partir des aires sous courbes extrapolées automatiquement.



**Figure 12:** La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)-Photo personnel-ENS Kouba.Alger.

Chapitre 03 :


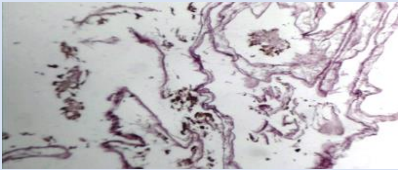

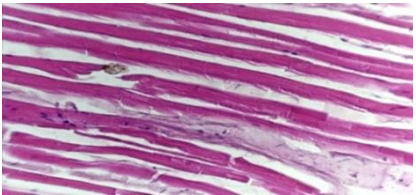

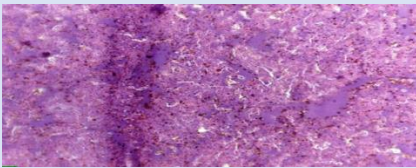
## **Résultats et Discussion (A)**



## 1. Résultat des examens macroscopique des anomalies externes

L'examen macroscopique nous a permis de diagnostiquer les pathologies de nos individus, énuméré dans le tableau 8

Tableau 8 : Résultats des examens macroscopiques et Histopathologique

Maladie	Syndrome	Agent	Traitement	Photo	Résultats Histo pathologiques
<b>Septicémie (Hémorragie)</b>	léthargié, Métanose, exophthalmie, Couleur pâle des branchies.	<i>Aeromonas, Hydrophila, et aspèces voisines.</i>	K <sub>n</sub> O <sub>4</sub> , antibiotique		A3, intestines : paroi intestinale nécrosée 
<b>Anémie</b>	Branchies pâles, l'éthargie augmentation de la respiration, flottabilité négative.	<i>Aeromas.</i>			B1, muscle : Aspect en faveur de dystrophie musculaire. 
<b>Maladie soculaires</b>	Un œil bombé enflé et d'apparence étrange, une couleur blanchâtre dans l'environnement oculaire.	<i>Pseudomonas et Aeromonas.</i>	Antibiotique		F2, Foie: Une nécrose assez étendue avec une stéatose focale et ballonnisation des hépatocytes, 

<p><b>La pourriture des nageoires Columnaris.</b></p>	<p>La pourriture des nageoires d'un poisson est un symptôme très fréquent dans les aquariums.</p>	<p><i>Flavobacterium columnare</i></p>	<p>Antibiotique CuSO4</p>		<p>G1,Bille :Parois vésiculaires hérissée de villosités</p> 
<p><b>Atteintes causées par une infection à Pseudomonas</b></p>	<p>Les affections les plus graves touchant des poissons d'aquarium d'eau douce. Elles sont dues à des mycobactéries (comme la tuberculose de l'homme ou des bovins, mais les espèces sont différentes</p>	<p><i>Streptococcus entrecoccus sp</i></p>	<p>Antibiotique non résistants (chloramphénicol ou tétracycline)</p>		<p>H2,Bille :Paroi biliaire totalement nécrosée avec des reliefs méconnaissables</p> 
<p><b>Ich / taches blanches</b></p>	<p>Des taches blanches couvrant le corps du poisson</p>	<p><i>Ichthyophthirius multifiliis</i></p>	<p>Bain de sel ou bain de formol</p>		<p>T4,Témoins :Pulpe rouge imbibé d'œdème</p> 

Les causes qui peuvent toucher la morphologie et la physiologie des poissons et qui sont à l'origine de la perturbation de ses différentes fonctions biologiques. L'interprétation de chaque situation d'anomalie diffère d'un auteur à un autre et d'une espèce de poisson à l'autre. Néanmoins, tous les auteurs s'accordent sur des infestations par des agents biologiques (algues, parasites, champignons, bactéries et virus) comme causes principales, ce qui est expliqué par le manque d'hygiène dans le milieu suite à la propagation de différents types de pollution. Dans notre étude les cas les plus documentés sont synthétisés ainsi :

- Il a été lié la pathologie d'exophtalmie chez les poissons à différents agents biologiques, tels que les virus et les bactéries (FAO), les parasites, les champignons (Schäperclaus, 1962).
- L'hémorragie oculaire peut être liée à des maladies bactériennes causées par *Acromonas Pseudomonas*. (Bellet, 1962 ; Uhland et al., 2000), parasitaires (Girard et Elie, 2007).
- L'hémorragie observée également sur le corps et les nageoires pelviennes et pectorale ont été la conséquence d'attaque bactérienne par l'espèce *Aeromonas Hydrophila* et espèces voisines (Uhland et al., 2000 ; Girard et Elie, 2007), et aussi à d'autres genres : vibrio, streptococci et micrococci (Paperna, 1982).
- Altération de la couleur peut être causée par des infections virales, bactériennes Parasitaires (Mysosporidies, microsporidies) (Girard et Elie, 2007).

Plusieurs facteurs internes et plus souvent externes, sont à l'origine de telles atteintes. Selon Richard et al (2016), Elles peuvent être causées par de nombreux agents, dont les biphenyles polychlorés et les pesticides organochlorés. Les insecticides (organophosphorés) et les métaux (cadmium, zinc, mercure, plomb).

Girard et Elie (2007), ont lié l'apparition de cette anomalie aux carences nutritionnelles, notamment en vitamines (A, C et D). Les facteurs physiques tels que : une sursaturation gazeuse, hypoxie, température trop faible, salinité, radioactivité, chocs électriques, la présence de Virus, bactéries, toxines algales, Parasitisme à Myxosporidies ou de traumatisme (capture, prédation) sont aussi à l'origine de l'apparition de ces déformations.

L'érosion des nageoires est fréquente chez les poissons qui vivent en eaux polluées. Les sulfites, les métaux, les hydrocarbures chlorés, les acides et les alcalis considérés comme étant substances toxiques, généralement présents dans les sédiments et les rejets municipaux ou industriels peuvent provoquer une dégradation du mucus à la surface des nageoires. Dépourvu de leur couche protectrice, ces organes sont par la suite envahis par des bactéries (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*), des champignons et des parasites qui provoquent la destruction des

tissus (Richard et al.,2016). Carences nutritionnelles ou vitaminiques et est aussi à l'origine de cette érosion (Girard et Elie.,2007).

Selon la FAO (2000), cette anomalie est causé un endoparasite le Myxozoaire (Myxobolus ssp) qui est un protozoaire cnidosporidie; Et selon (Uhland et al.,2000) elle est d'origine bactérienne ou due à un traumatisme.

Les lésions sont souvent causées par des agents infectieux, tels que les bactéries, les virus et les protozoaires. Beaucoup de ces organismes prolifèrent en présence de pollution organique, ce qui augmente la susceptibilité des poissons aux infections (Richard et Elie.,2007)

L'exophtalmie peut être d'origine traumatique ou liée à des infectieuse et septicémies virales et bactériennes ainsi qu'au parasitisme oculaire, ou être liée à une sursaturation de l'eau en gaz (Girard et Elie,2007)

Énucléation de l'ail peut être d'origine cannibalisme ou liée à des infectieuse bactériennes ainsi qu'au ecto-parasitisme oculaire, ou être liée à une sursaturation de l'eau en gaz (Girard et Elie,2007).

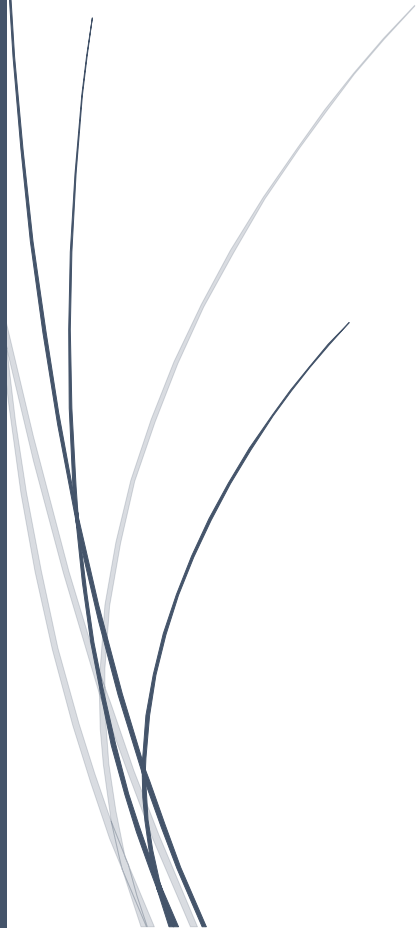
La nécrose chez le poisson sont des infectieuses d'origines bactériennes (Flavobactériose, Vibriose, Pseudomonose), virales et/ou parasitaires externes. Il est possible également Brûlures (UV), traumatismes, cannibalisme induisant des nécroses, La Pollutions chimiques de milieu par le cadmium, chrome, mercure, effluents de pâte à papier, peut être à l'origine d'une nécrose chez les poissons (Girard et Elie, 2007).

Le succès thérapeutique dépend de la façon dont le médicament est employé. Il faut respecter les doses, la précocité du traitement, la fréquence. Afin de permettre l'établissement d'un diagnostic basé sur l'étiologie, il faut toujours laisser un lot d'une cinquantaine de sujets sans traitement de façon à constater l'efficacité du traitement et conserver des poissons pour un examen complémentaire.



Chapitre 03 :

## **Résultats et Discussion (B)**



## 2. Résultats et discussion Biomarqueurs Hémato-biochimiques

Les paramètres hématologiques et biochimiques des bio-essais *Tilapia Oreochromis niloticus* exposé aux l'OTC (Oxytétracycline) et l'extrait de l'Ail (*Allium sativum*) avec le groupe témoin sont présentés ci- dessous. (Tab. 9).

**Tableau 9** : Désignation des aquariums expérimentaux avec les doses d'ATB<sub>1</sub> "Oxytétracycline" et l'ATB<sub>2</sub> 'Sulfamide' pendant une durée de 10 jours (TA).

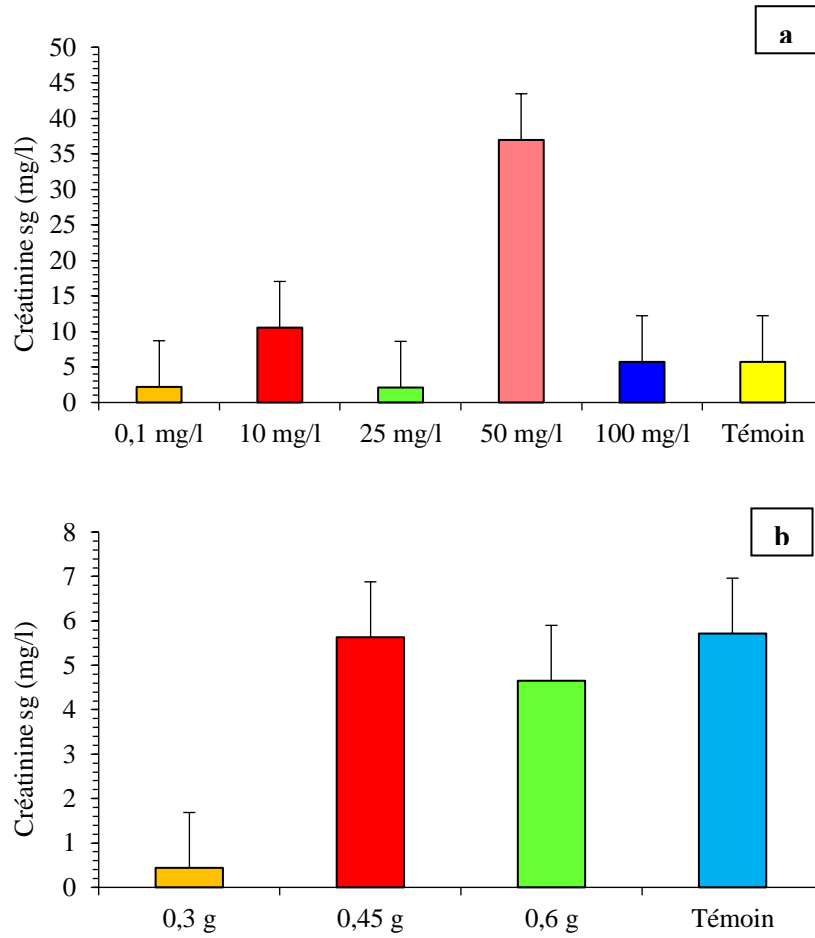
Aquarium	Durée	Aq 1	Aq 2	Aq 3	Aq 4	Aq 5	Aqt
Dose OTC (OCDE 2003) Guso et al 2021	10 jours	0,1 CL10	10 CL84	25 NOEL	50 LOEL	100 L90	(Témoin)
Régime à base d'extrait d'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) Militz et al 2013	10 jours	0,3 g		0,45	0,6g		(Témoin)

### 2.1. Bilan rénal

#### 2.1.1. La créatinine :

Les variations de la créatinine dans le sang des bioessais traitées par L'OTC et par l'Ail « *l'Allium sativum* » sont représentées dans **la figure 13**. Les valeurs maximales et minimales sont variées entre [(36,95 ±0,85 mg/l)] et de [(5,63±2,27) mg/l] respectivement observées dans 50mg/l d'OTC et 0,45g d'*Allium sativum*, chez le témoin la créatinine est de (5,71±2,24) mg/l.

La figure (13) montre une augmentation hautement significative de la créatinine pour la dose 50 mg/l d'OTC (P<0,01). Chez les poissons traités par l'Ail nous enregistrons une baisse de la créatinine pour le régime de 0,3 g.



**Figure 13 :** Variations la créatinine (mg/l) chez le Bio -essaie Tilapia du Nil Traité par l’OTC (a) et l’Ail (*Allium sativum*).

L’analyse de la variance à un seul critère de classification a montré une différence très hautement significative entre les cinq (05) aquariums d’OTC pour les créatinines à (**Tab. 10**).

**Tableau 10:** ANOVA à un facteur contrôlé des variations de la créatinine des Tilapia traités par l’OTC (A) et l’Ail (*Allium sativum*) (B).

OTC (A)					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	2654,9436	530,9887	418,3063	< 0,0001***
Erreur	12	15,2325	1,2694		
Total corrigé	17	2670,1761			
<i>Allium sativum</i> (B)					
Model	3	55,9981	18,6660	4,4273	0,0411*
Error	8	33,7286	4,2161		
Corrected Total	11	89,7267			

**DDL:** Degré de liberté; **SCE:** Sommes des carrées des écarts; **CM:** Carré moyen; **F<sub>obs</sub>:** Test de Fisher; **P:** Seuil de signification. « \*: significatif; \*\*: hautement significatif; \*\*\*: très hautement significatif ».

En outre, pour l’OTC les tests de comparaison multiple (Test de tukey,  $p \leq 0,05$ ), montrent l'existence de quatre (04) groupes homogènes en fonction des créatinines y compris le témoin. Le test de *Dunnnett* décrit des différences très hautement significatives entre les cinq concentrations par rapport au bio essai témoin (**Tab. 11a**).

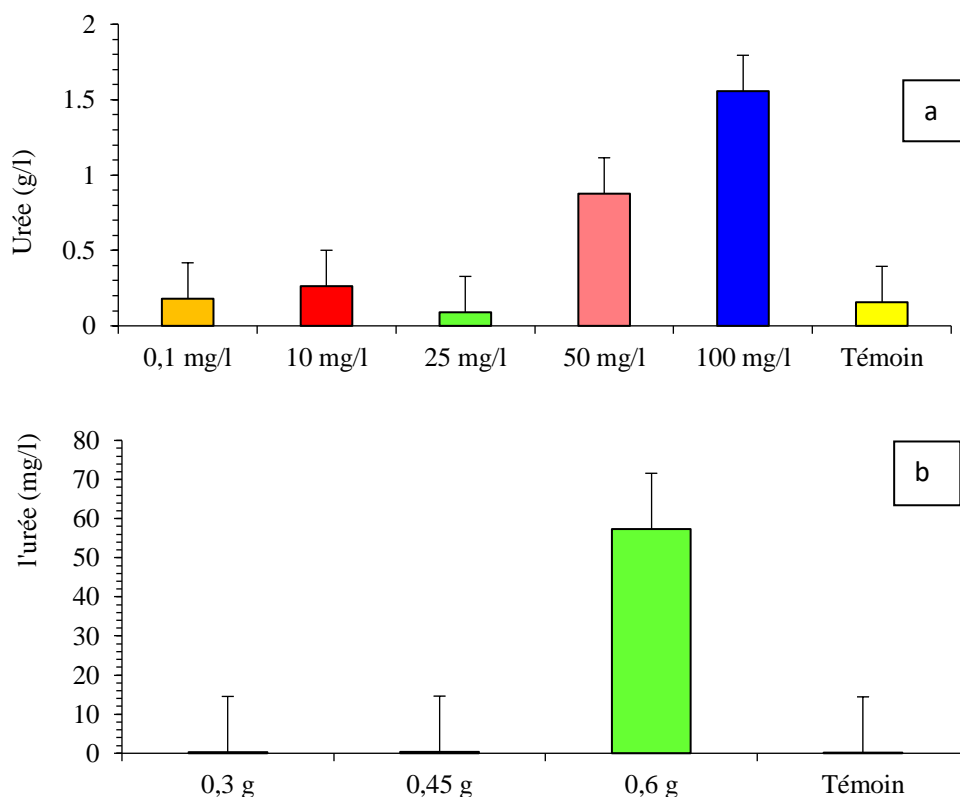
Pour l’Ail « *Allium sativum* », le test de comparaison multiple (test de tukey,  $p \leq 0,05$ ), montrent un seul groupe homogène en fonction de la créatinine compris le témoin. Le test de *Dunnnett* décrit des différences hautement significatives entre les trois régimes alimentaires par rapport au bio essai témoin (**Tab. 11b**).

**Tableau 11:** Résultats des tests de comparaisons multiples (Test de Tukey et test de *Dunnnett* pour la créatinine des Tilapia traités par l’OTC (A) et L’Ail (*Allium sativum*)).

L’OTC(A)		
Category	LS means	Groups
50 mg/l	36,9533	A
10 mg/l	10,5400	B
Témoin	5,7167	C
100 mg/l	5,7167	C
0,1 mg/l	2,1933	D
25 mg/l	2,1067	D
L’Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B)		
Category	LS means	Groups
Témoin	5,7167	A
0,45 g	5,6333	A
0,6 g	4,6533	A
0,3 g	0,4400	A

### 2.1.2. L'urée :

Les variations des valeurs de l'urée (g/l) dans le sang des bio essais traités par l'OTC et par l'Ail (*Allium sativum*) sont représentés dans la figure 14. Les valeurs maximales sont enregistrées chez les sujets de (100mg/l et (0,6g) avec ( $1,55 \pm 1,25$  g/l) respectivement de  $[(1,55 \pm 1,25) ; (57,33 \pm 6,65)]$  g/l, en revanche des minimas l'urée sont enregistrées chez les tilapias traités par 25mg/l d'OTC. Chez les témoins nous avons enregistré des taux de l'urée de ( $0,15 \pm 0,04$  g/l) (Fig. 14).



**Figure 14 :** Variations de l'urée (g/l) chez les Bio -essaie *Oreochromis niloticus* Traité par l'OTC (a) et l'Ail *Allium sativum* (b).

L'analyse de la variance à un seul critère de classification a montré une différence significative entre les doses de l'OTC et mais une différence très hautement significative avec le régime à base d'extrait d'*Allium sativum* (**Tab. 12**).

**Tableau 12** : ANOVA à un facteur contrôlé des variations de la créatinine des Tilapia traités par l'OTC (A) et l'Ail (*Allium sativum*) (B).

OTC (A)					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	5,1008	1,0202	2,9617	0,05
Erreur	12	4,1335	0,3445		
Total corrigé	17	9,2343			
Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B)					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	7328,8471	2442,9490	220,3977	< 0,0001***
Erreur	8	88,6742	11,0843		
Total corrigé	11	7417,5213			

**DDL**: Degré de liberté; **SCE**: Sommes des carrées des écarts; **CM**: Carré moyen; **F<sub>obs</sub>**: Test de Fisher; **P**: Seuil de signification. « \*: significatif; \*\*: hautement significatif; \*\*\*: très hautement significatif ».

Les tests de comparaison multiple (*Test de Newmean-Keuls (SNK)*,  $p \leq 0,05$ ), montrent l'existence de trois (03) groupes homogènes en fonction de l'urine y compris l'aquarium témoin. Le test de *Dunnnett* décrit une seule différence très hautement significative avec la dose de 100mg/l d'OTC par rapport au bio essai témoin (**Tab. 13a**).

Pour le régime à base d'*Allium sativum*, les tests de comparaison multiple (*Test de Newmean-Keuls (SNK)*,  $p \leq 0,05$ ), montrent l'existence de deux (02) groupes homogènes en fonction de l'urine y compris l'aquarium témoin. Le test de *Dunnnett* décrit une seule différence très hautement significative avec la dose de 0,6 g/l d'Ail par rapport au bio essai témoin (**Tab. 13b**).

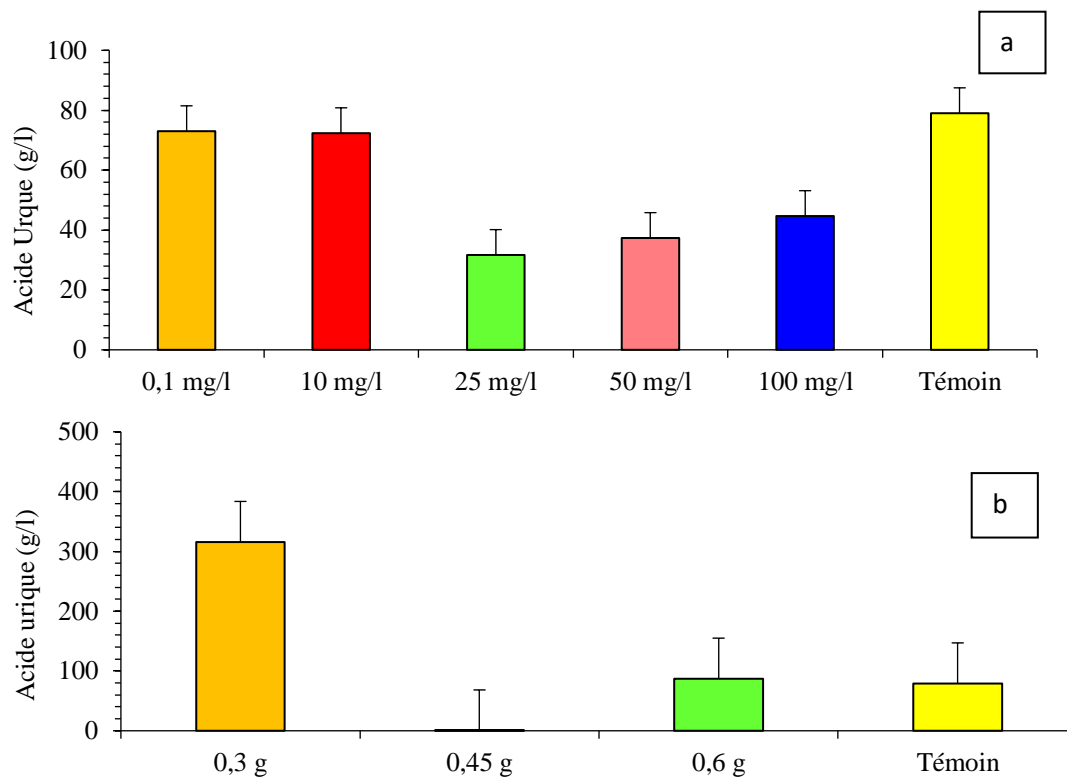
**Tableau 13:** Résultats des tests de comparaisons multiples (Test de Newman-Keuls (SNK) et test de *Dunnnett* pour L'urée des Tilapia traités par l'OTC (A) et L'Ail (*Allium sativum*)(B).

L'OTC(A)		
Category	LS means	Groups
100 mg/l	1,5567	A
50 mg/l	0,8767	A B
10 mg/l	0,2633	B
0,1 mg/l	0,1800	B
Témoin	0,1567	B
25 mg/l	0,0900	B
L'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B)		
Category	LS means	Groups
0,6 g	57,3333	A
0,45 g	0,3567	B
0,3 g	0,2700	B
Témoin	0,1567	B

### 2.1.3. l'acide urique (g/l) :

Les variations l'acide urique dans le sang des bioessais traitées par l'OTC et l'*Allium* sont représentées dans la figure 15.

Les valeurs maximales de l'acide urique sont enregistrées chez les témoins [(79 ±49,80 g/l)], avec l'OTC les tilapias présentent des max d'acide urique avec la concentration de 0,1 et 10 mg/l respectivement (73±39,75 ; 72,33±1,69 g/l). Le Comportement rénal des tilapias avec le régime de 0,3 g d'ail déclenche des maximas allons jusqu'au (315,66±13,65 g/l).



**Figure 15 :** Variations de l'acide urique (g/l) chez les Bio-essaie *Oreochromis niloticus* Traité par l'OTC (a) et l'Ail *Allium sativum* (b).

L'AV1 montre le profil d'acide urique qui présente une différence très hautement significative avec l'*Allium sativum* ( $P < 0,01$ ). Aucune signification n'est résulté avec l'OTC. (Tab.14)

**Tableau 14 :** ANOVA à un facteur contrôlé des variations de L'acide urique des Tilapia traités par l'OTC (A) et l'Ail (*Allium sativum*) (B).

OTC (A)					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	6459,3333	1291,8667	1,1654	0,3806N.S
Erreur	12	13302,6667	1108,5556		
Total corrigé	17	19762,0000			
Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B)					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	166135,6840	55378,5613	55,2771	< 0,0001***
Erreur	8	8014,6895	1001,8362		
Total corrigé	11	174150,3735			

**DDL:** Degré de liberté; **SCE:** Sommes des carrés des écarts; **CM:** Carré moyen; **F<sub>obs</sub>:** Test de Fisher; **P:** Seuil de signification. « \*: significatif; \*\*: hautement significatif; \*\*\*: très hautement significatif ».

En outre, les tests de comparaison multiple (Newmean-Keuls (SNK),  $p \leq 0,05$ ), montrent l'existence d'un seul groupe (01) groupes homogènes en fonction des l'acide urique (OTC)y compris l'aquarium témoin. Le test de *Dunnnett* décrit des différences très hautement significatives entre les cinq concentrations par rapport au bio essaie témoin (**Tab. 15a**). La SNk a fait ressortir quatre (04) group.

**Tableau 15:** Résultats des tests de comparaisons multiples (Test de Newmean-Keuls (SNK)et test de *Dunnnett* pour l'acide urique des Tilapia traités par l'OTC (A) et L'Ail (*Allium sativum*)).

L'OTC(A)		
Category	LS means	Groups
Témoin	79,0000	A
0,1 mg/l	73,0000	A
10 mg/l	72,3333	A
100 mg/l	44,6667	A
50 mg/l	37,3333	A
25 mg/l	31,6667	A
L'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B)		
Category	LS means	Groups
0,3 g	315,6667	A
0,6 g	87,0000	B
Témoin	79,0000	B C
0,45 g	0,3167	C

## 2.2. Résultats Biochimique du bilan protidique (protéine totale dans le sang)

### 2.2.1. Taux des protides T:

Les variations des protides totaux dans le sang des bioessais traités par l'OTC et par l'Ail sont représentées dans la figure 16 a et b. Les valeurs maximales sont enregistrées chez la concentration de 50mg/l (OTC) [  $20,66 \pm 38,68$  g/l]et le régime de 0,3 g (*Allium sativum*) avec un taux de ( $206,33 \pm 1,2$  g/l) , en revanche des minimas des «protéines totaux » sont enregistrées chez les tilapias traités par les différentes doses des deux régimes.

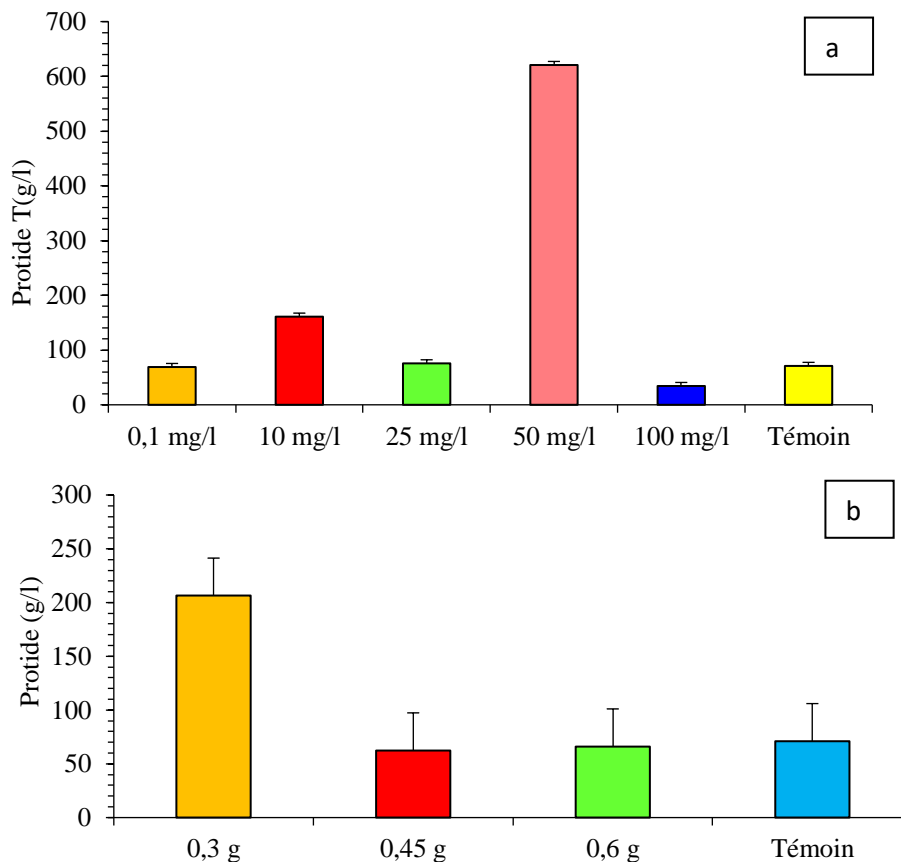


Figure 16 : Variations de des protides (g/l) chez les Bio -essaie *Oreochromis niloticus* Traité par l'OTC (a) et l'Ail *Allium sativum* (b).

L'AV1 montre le profil protidique qui présente une différence hautement significative avec l'OTC et une autre différence très hautement significative avec l'*Allium sativum* ( $P < 0,01$ ). (Tab. 16).

Tableau 16 : ANOVA à un facteur contrôlé des variations de protides t (g/l) des Tilapia traités par l'OTC (A) et l'Ail (*Allium sativum*) (B).

OTC (A)					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	5	751394,9444	150278,9889	4,3943	0,0166**
Erreur	12	410384,0000	34198,6667		
Total corrigé	17	1161778,9444			
Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B)					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	44143,5833	14714,5278	57,3293	< 0,0001***
Erreur	8	2053,3333	256,6667		
Total corrigé	11	46196,9167			

DDL: Degré de liberté; SCE: Sommes des carrés des écarts; CM: Carré moyen;  $F_{obs}$ : Test de Fisher; P: Seuil de signification. « \*: significatif; \*\*: hautement significatif; \*\*\*: très hautement significatif ».

En outre, les tests de comparaison multiple (Newmean-Keuls (SNK),  $p \leq 0,05$ ), montrent l'existence de trois groupes (03) groupes homogènes en fonction des protéines totaux (OTC et Ail) y compris l'aquarium témoin. Le test de *Dunnnett* décrit des différences très hautement significatives entre les cinq concentrations par rapport au bio essai témoin (**Tab. 17aet b**).

**Tableau 17:** Résultats des tests de comparaisons multiples (Test de Newmean-Keuls (SNK)et test de *Dunnnett* pour les protéines totaux des Tilapia traités par l'OTC (A) et L'Ail (*Allium sativum*).

L'OTC(A)		
Category	LS means	Groups
50 mg/l	620,6667	A
10 mg/l	161,0000	A B
25 mg/l	75,6667	B
Témoin	71,0000	B
0,1 mg/l	69,0000	B
100 mg/l	34,3333	B
L'Ail ( <i>Allium sativum</i> ) (B)		
Category	LS means	Groups
0,3 g	206,3333	A
Témoin	71,0000	B
0,6 g	66,0000	B
0,45 g	62,3333	B

Dans la présente étude, le tilapia du Nil (poids moyen de  $65,75 \pm 22,76g$ ) a été utilisé pour étudier l'effet du de l'OTC et l'*Allium sativum* sur les fonctions rénales. Un bilan rénal soit (Les niveaux de créatinine, d'urée de l'acide urique) dans du sérum sanguin ont été analysés chez des poissons après exposition à diverses concentrations de ces deux antibiotiques (OTC et *Allium sativum*). Pendant la période expérimentale, certains aspects morphologiques et des changements de comportement ont également été enregistrés chez les sujets exposées poissons et les résultats sont en accord avec [Beauvais et al. \(2000\)](#).

Ces changements morphologiques, comme le renflement yeux, sécrétion excessive de mucus, l'hémorragie des yeux et corps, l'érosion des écailles, la pourriture de la queue et la mortalité ont été remarqué au cours de l'étude (Tableau 8: de pathologie). Ces symptômes étaient plus prononcés lors du traitement par l'OTC et rehaussés avec la concentration de la dose et du temps, comme également rapporté par [Hussain et al. \(2016\)](#). De plus, les changements de comportement ont été remarqués en ce qui concerne la mobilité des bio-essais traités par l'OTC.

Il a été observé que les tilapias exposés à l'OTC souffraient d'un choc au début en montrant une détresse respiratoire, y compris l'hyper-excitabilité par erratique mouvements et natation active. De même, l'effet de différents produits chimiques sur les fonctions physiologiques et comportementaux des poissons ont été rapportées par (Kavitha et Rao, 2008 ; Ullah et al., 2014 ; Zeid et halil, 2014 ; Sharafeldin et al., 2015).

L'analyse de la créatinine permet d'avoir des informations sur le fonctionnement des reins et sur la masse musculaire des poissons. La créatinine est produite après la dégradation par les reins de la créatine, une protéine musculaire. Un taux de créatinine élevé est souvent le signe d'une insuffisance rénale. Un taux bas de créatinine peut être le signe d'une myopathie (atrophie musculaire sévère). Zulfikkar et al, (2020) Nos résultats ont montré que le lot des tilapia témoin présente des concentrations moyennes d'urée et de la créatinine était respectivement de  $(15 \pm 0,4)$  et  $(0,571 \pm 0,22)$  mg/dl. Nos résultats pour l'urée sont largement supérieur avec ceux trouvé par Zulfikkar et al, (2020) chez *O. niloticus*  $(9,0 \pm 0,1)$  mg/dl et  $0,62 \pm 0,2$ . En revanche nos résultats de la créatinine sont similaire avec Zulfikkar et al, (2020) .

Pour les bio essais exposés à l'OTC de 0,1, 10 et 25mg/L respectivement et les concentrations maximales d'urée et de créatinine ont été enregistrées dans chaque groupe.

Les valeurs maximales et minimales de la créatinine dans le sérum de l'*Oreochromis niloticus* sont variées entre  $[(36,95 \pm 0,85)$  mg/l] et de  $[(5,63 \pm 2,27)$  mg/l] respectivement observées dans 50 mg/l d'OTC et 0,45g d'*Allium sativum*,

La tendance à la hausse de l'urée et de la créatinine était également rapportée par Zeid et Khalil, (2014) qui ont traité tilapia avec le pesticide *phthalate de di-N-butyle (DBP)* pendant 8 semaines et observé l'augmentation de l'urée et de la créatinine.

L'altération de l'urée sanguine chez les poissons d'eau douce, *Mystus vittatus* a été étudié après une exposition chronique à metasytox et sevin et on a remarqué que l'urée sanguine dans la présente étude a montré une tendance à la hausse similaire. Les conclusions de John, (2007) étaient également en accord avec la présente étude. De plus, Ahmad et Gautam (2014) ont traité le poisson-chat d'eau (*Heteropneustes fossilis*) avec des doses sublétales de nuvan(insecticide) et une augmentation significative a été constatée pour la créatinine. Ces résultats ont également été soutenus par Soufy et al. (2007) qui ont travaillé sur le mono-sexe tilapia en le traitant au cabofuran. Épuisement du sérum la créatinine a été observée chez *Clarias gariepinus* après toxicité du dichlorure de paraquat (Ogamba et al., 2011).

Cependant, des niveaux élevés d'urée sérique ont été enregistrés chez *Clarias albo punctatus* en raison de la toxicité du roundup Okonkwo et al. (2013). Ces résultats sont en accord avec les observations actuelles.

Cependant, l'effet des produits chimiques peut être réduit comme l'ont rapporté Kandiel et al. (2014) et le pollen d'abeille et la propolis ont été utilisés comme additifs alimentaires. Les deux (pollen d'abeille et propolis) ont bien fonctionné pour contrôler les effets génotoxiques et perturbateurs endocriniens du malathion chez *Oreochromis niloticus*.

La protéine totale du sang fait référence à la quantité de protéines dans le sang, y compris la globuline et l'albumine (Faggio et al., 2014 ; Trichet, 2010). Il est fortement proposé que la baisse observée de la protéine totale et de l'albumine soit attribuée à la transcription génique aux protéines formant des adduits protéiques ainsi que via l'effet dommageable direct des ROS générées (Coppock et al., 2012 ; Matejova et al., 2017). Cependant, les poissons nourris par l'allium sativum présentaient une augmentation des protéines totales et de l'albumine, ce qui peut être attribué à l'immunité accrue du tilapia, nos résultats sont similaire avec les travaux de (Dawood et al., 2020a ; Dawood et al., 2020c) trouvés chez *Oreochromis niloticus*.

L'augmentation des protéines totales et de l'albumine chez les poissons nourris par l'Ail (*Allium sativum*) indiquent une immunité renforcée pour contrecarrer les impacts de l'OTC. Nos résultats sont en accord avec, le tilapia nourri au Spiruline qui a révélé une augmentation des protéines sanguines totales et le taux d'albumine (Abdel-Daim et al., 2020b; Abdelkhalek et al., 2017).

L'ail (*Allium sativum*) a plusieurs composés actifs Asdaq et Inamdar ont rapporté que la consommation fréquente d'ail favorise les antioxydants internes activités et réduit les effets indésirables oxydatifs soit en augmentant l'antioxydant endogène la synthèse ou la réduction de la production d'oxydants tels que les espèces de radicaux libres d'oxygène (ROS). OTC est un antibiotique qui a été utilisé pour traiter plusieurs types d'infections bactériennes et a été signalé à favoriser les lésions hépatiques en augmentant les enzymes aspartate transaminase et alanine aminotransférase en plus d'abaisser le taux d'albumine plasmatique. Il a été démontré que l'ail protège contre l'hépatotoxicité induite par l'oxytetracycline en améliorant le statut antioxydant, et régulation du stress oxydatif.

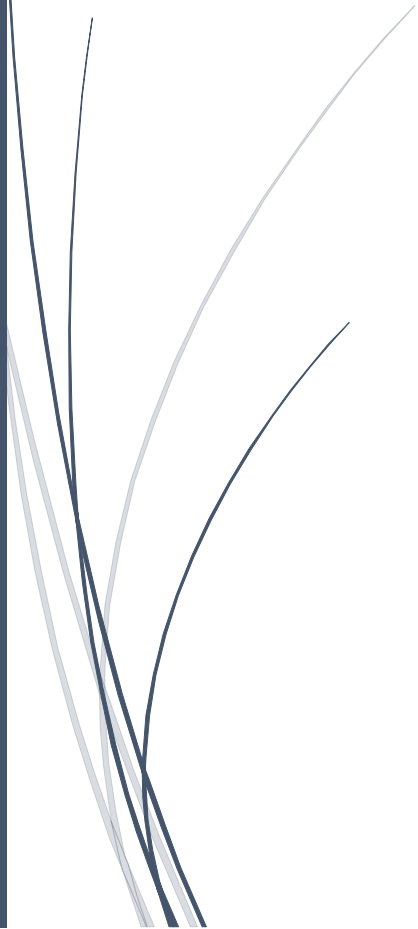
L'augmentation des protéines totales et de l'albumine chez les poissons nourris au SP indiquent une immunité renforcée pour contrecarrer les impacts de l'AFB1.

Le présent document a montré une augmentation des niveaux d'urée ainsi qu'une augmentation de la créatinine sanguine chez les tilapias exposés à OTC, qui sont associés à un dysfonctionnement rénal. Le rein est un organe gourmand en énergie contient une énorme abondance de mitochondries qui sont vulnérables aux dommages oxydatifs. Une production excessive de ROS dans les cellules rénales provoque un dysfonctionnement mitochondrial, une déplétion de l'ATP, des dommages aux transporteurs membranaires et interfère avec la protéine cytoplasmique (Abdel-Daim et al., 2019b). Tous ces événements se sont soldés par une altération de la fonction tubulaire rénale observée dans cette étude. Cela pourrait également être une autre raison de la perte accrue de protéines qui diminue les niveaux totaux de protéines sanguines. Ces résultats sont cohérents avec notre enquête précédente où une augmentation de l'urée et de la créatinine sanguines ainsi qu'une diminution des taux de protéines totales ont été signalées chez les sujets atteints de lésions rénales oxydatives. Cellules en réponse à une intoxication aux nanoparticules d'oxyde de zinc chez le tilapia du Nil (Abdel-Daim et al., 2019a). En revanche, le régime d 'Allium sativum alimentaire a réduit les niveaux d'urée et de créatinine chez les poissons Parrapport a ceux exposé exposés à OTC. Le rôle potentiel antioxydant de l'Ail est également corrélé à la régulation de la fonction du foie et les reins diminuant les effets néfastes de l'OTC. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour révèlent les modes d'action possibles de la l'Ail *Allium sativum* pour atténuer la toxicité induite de l'OTC sur le foie et la fonction rénale.

La protéine du sérum sanguin est un système biochimique assez fragile, reflétant précisément l'état de l'organisme et les changements qui s'y produisent sous l'influence de facteurs internes et externes. La teneur en protéines totales dans le sérum était significativement élevée chez les poissons nourris avec un régime contenant n'importe quelle source d'ail, ce qui concorde avec les résultats de Metwally (2009) qui a montré que le taux de protéines totales sérique était élevé chez les *Oreochromis niloticus* après l'administration d'huile d'ail. L'augmentation du taux de protéines totales chez tilapia traités avec l'huile d'*Allium sativum* pourrait être attribuée à l'augmentation du taux d'immunoglobulines et de la concentration de globulines totales Metwally (2009). Des taux élevés de protéines sériques ont été signalés en raison de l'amélioration du foie et d'autres niveaux ont été signalés en raison de l'amélioration des fonctions du foie et d'autres organes qui synthétisent les protéines plasmatiques. Metwally (2009)

Chapitre 03 :

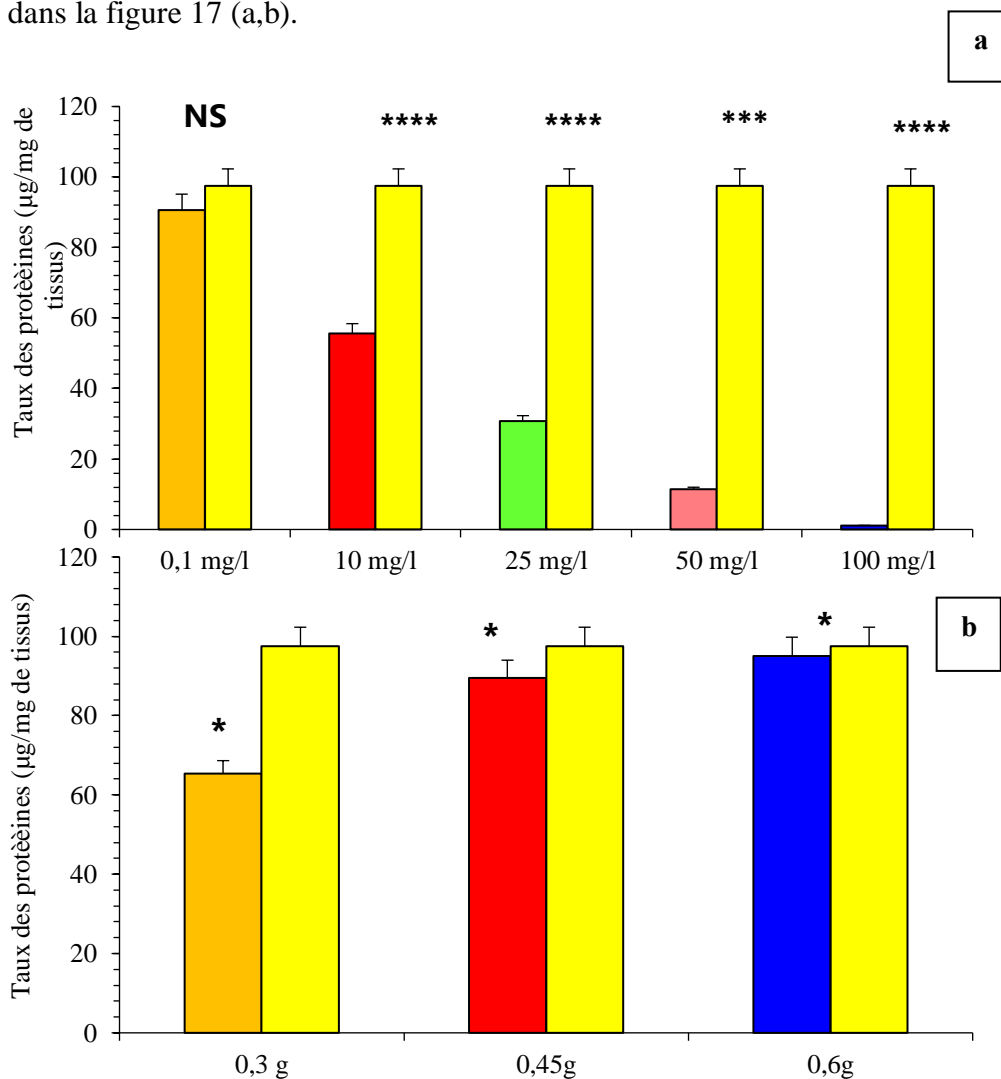
## **Résultats et Discussion (C)**



### 3. Variations de la Composition biochimique de la chair d'*O. niloticus* en après Thérapie (OTC & *Allium sativum*)

#### 3.1. Taux de protéines

La teneur des protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu) quantifiée selon la méthode de Bradford (1976) au niveau de la chair des tilapia de Nil par l'OTC et l'*Allium sativum* donne les résultats mentionnés dans la figure 17 (a,b).



**Figure 17** :Taux des protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu) au niveau la chair d'*O.niloticus* traités par l'OTC(a) et par l'Ail *Allium sativum* (b) ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n=3$ ). (« \* : significatif ; \*\* : hautement significatif ; \*\*\* : très hautement significatif ; \*\*\*\* : très hautement significatif ; NS : Non significatif »).

Le suivi des taux des protéines montre des variations au cours des différents doses au sein des deux thérapies avec des valeurs maximales de  $90,06 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'OTC et  $95,02 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'*Allium sativum* enregistrées respectivement aux doses (0,1 mg/l

et 0,6g). Les valeurs minimales sont enregistrées à la dose de 100 mg/l avec  $1,28 \pm 0,2$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'OTC et  $65,7 \pm 14,19$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour L'*Allium sativum* (Fig. 16 a et b). L'analyse de la variance à un seul critère de classification (dose) démontre une différence très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) pour l'OTC et significatif pour le régime à base d'Ail ( $P \leq 0,01$ ).

### 3.2. Taux des glucides

Les taux des glucides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu) sont quantifiés selon la méthode de **Goldsworthy et al. (1972)** au niveau de la chair des tilapia de Nil par l'OTC et l'*Allium sativum* donne les résultats mentionnés dans la figure 18(a,b).

Le suivi des taux des protéines montre des variations au cours des différents doses au sein des deux thérapies avec des valeurs maximales de  $75,06 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'OTC et  $94,26 \pm 0,80$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'*Allium sativum* enregistrées respectivement aux doses (0,1 mg/l et 0,45g). Les valeurs minimales sont enregistrées à la dose de 100 mg/l avec  $3,55 \pm 0,01$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'OTC (Fig. 18a et b).

L'analyse de la variance à un seul critère de classification (dose) démontre une différence très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) pour l'OTC. Aucune signification n'est enregistrée pour les taux lipidique de la chair tilapias à base d'*Allium*.

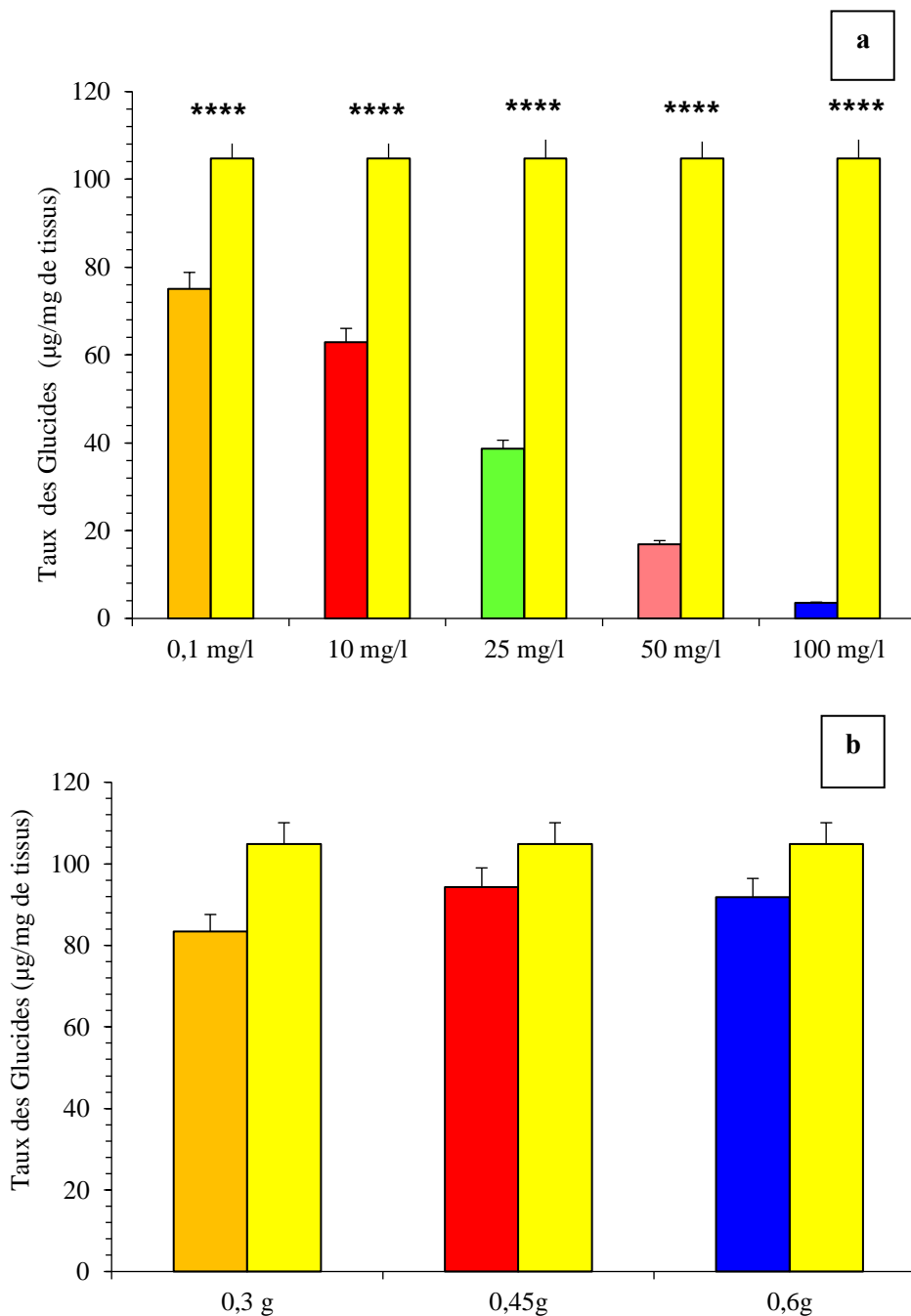


Figure 18 : Taux des protéines ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu) au niveau la chair d'*O. niloticus* traités par l'OTC(a) et par l'Ail *Allium sativum* (b) ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n=3$ ). (« \* : significatif ; \*\* : hautement significatif ; \*\*\* : très hautement significatif ; NS : Non significatif »).

### 3.3. Taux de lipides

Les taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu) sont quantifiés selon la méthode de **Goldsworthy et al. (1972)** au niveau de la chair des tilapia de Nil par l'OTC et l'*Allium sativum* donne les résultats mentionnés dans la **figure 19(a,b)**.

Le suivi des taux des protéines montre des variations au cours des différents doses au sein des deux thérapies avec des valeurs maximales de  $77,92 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'OTC

et  $100,43 \pm 1,61 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'*Allium sativum* enregistrées respectivement aux doses (0,1 mg/l et 0,6g). Les valeurs minimales sont enregistrées à la dose de 100 mg/l avec  $1,73 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tissus pour l'OTC (Fig. 19 a et b).

L'analyse de la variance à un seul critère de classification (dose) démontre une différence très hautement significative ( $P \leq 0,001$ ) pour l'OTC. Aucune signification n'est enregistrée pour les taux lipidique de la chair tilapias à base d'*Allium*.

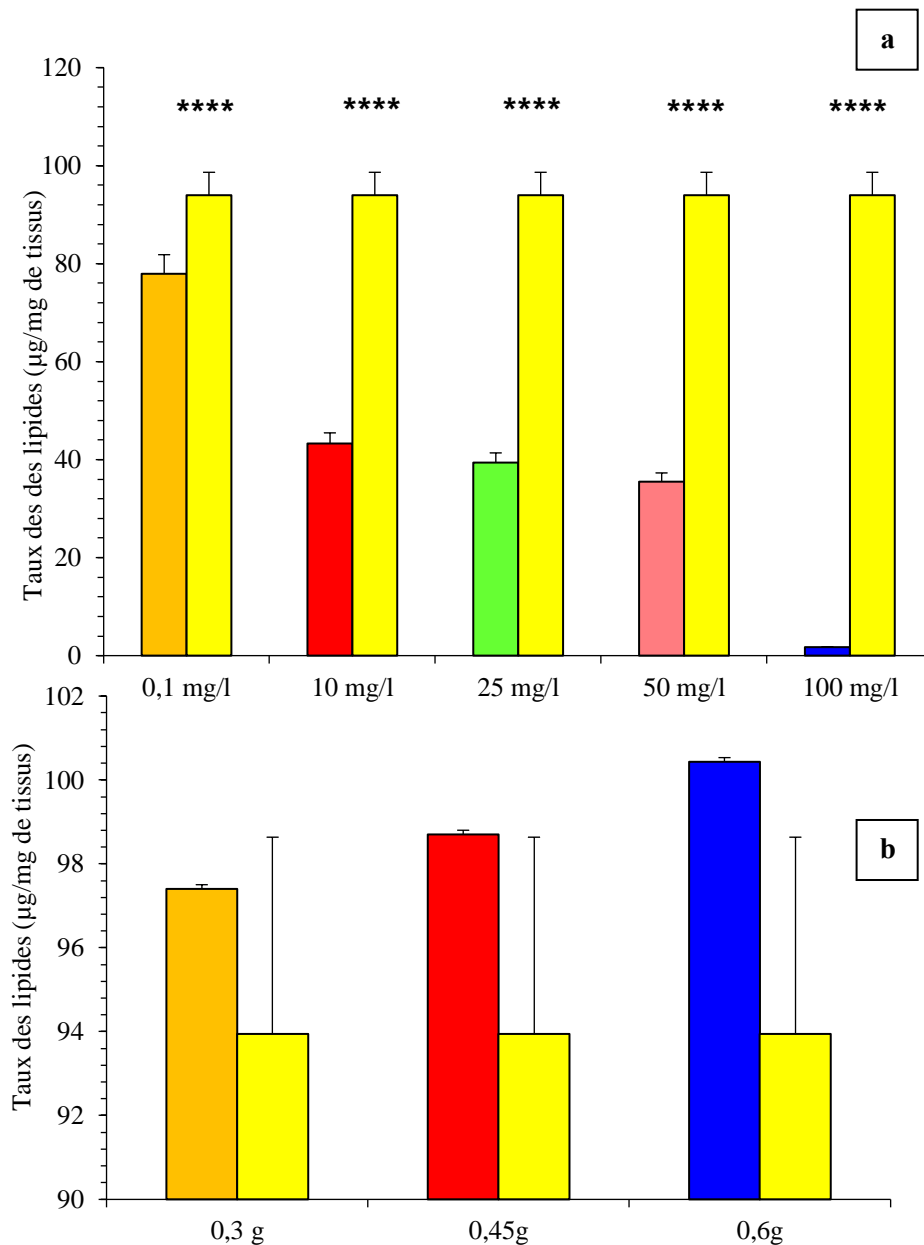


Figure 19:Taux de lipides ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tissu) au niveau la chair d'*O. niloticus* traités par l'OTC(a) et par l'Ail *Allium sativum* (b) ( $m \pm \text{SEM}$  ;  $n=3$ ). (« \* : significatif ; \*\* : hautement significatif ; \*\*\* : très hautement significatif ; NS : Non significatif».)

Il est généralement admis que les situations de stress induisent une augmentation des dépenses énergétiques des individus mobilisant les réserves énergétiques (Van, 2002 ; Sepulveda et al., 2003 ; Wintermyer & Cooper, 2003). L'augmentation des dépenses énergétiques associées, si elle n'est pas compensée par une production d'énergie, va induire une diminution de l'énergie disponible pour les autres fonctions physiologiques. En effet, l'énergie va être allouée essentiellement aux processus de maintenance et ne sera donc pas disponible pour la croissance ou la reproduction, ce qui influencera la capacité de ces organismes à survivre et à transmettre leurs gènes (Durou et al., 2008).

Les réserves métaboliques énergétiques donnent des informations sur la capacité de l'organisme à faire face à un stress naturel ou anthropogénique ( smolders et al., 2005). En effet, le statut énergétique et son impact sur d'importants processus physiologiques tels que la croissance et la reproduction qui peuvent être perturbés par une pollution de l'environnement, est largement utilisé dans les recherches écotoxicologiques (Smolders et al., 2005). Ces réserves énergétiques peuvent donc être de bons biomarqueurs de l'état de santé de l'organisme et de son environnement (Molven & Goksoyr, 1993), puisqu'elles peuvent être affectées après quelques heures voire quelques jours d'exposition et leurs variations peuvent se maintenir pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines (Gimeno et al., 1995). En revanche, l'inconvénient est qu'elles varient en fonction des saisons, l'âge ainsi que l'état nutritionnel des individus (Le Gal et al., 1997).

Il existe trois types de réserves énergétiques : les glucides, les lipides et les protéines. La première source d'énergie immédiate, utilisée lors d'un stress correspond généralement aux glucides, et plus particulièrement au glycogène (Umminger, 1977), puisqu'ils sont beaucoup plus simples à métaboliser que les lipides ou les protéines. Lorsqu'un jeûne survient, une diminution du glycogène hépatique et musculaire est généralement observée dans l'organisme et ceci permet aux cellules d'avoir un apport en glucose, via le processus de la glycolyse (Black et love, 1986).

Les lipides sont la seconde source d'énergie utilisée lors d'un stress ( Bhuvan et Geraldine, 1997). Les lipides peuvent aussi être mobilisés en premier lorsque la nourriture devient rare (Hashemi et al., 2008). Une diminution des concentrations en lipides est généralement observée quand la concentration en glucides devient faible ou quand la demande énergétique est trop forte. Ils peuvent être stockés dans le foie, le tissu adipeux autour des intestins et les muscles. Les lipides ont plusieurs fonctions, notamment de fournir un haut niveau d'énergie. Ils sont donc essentiels pour maintenir un bon état de santé. Ils facilitent aussi

l'absorption des vitamines liposolubles, sont utilisés pour la croissance vitelline des ovocytes et participent à l'architecture membranaire en maintenant une fluidité appropriée des membranes biologiques (Blem, 1992). La reproduction joue un rôle primordial dans la concentration lipidique musculaire chez les poissons, puisque les lipides diminuent généralement durant cette période (Johnson, 2009).

Les protéines sont la dernière source d'énergie utilisée lors d'un stress. Face à un stress, les organismes ont besoin de beaucoup d'énergie pour lutter et se maintenir, et cette énergie peut être stimulée par le catabolisme des protéines (Ribeiro et al., 2001). Une diminution de la concentration en protéines peut être due à la formation de lipoprotéines utilisées pour réparer les dommages causés aux organites des cellules et des tissus (Sancho et al., 1998) ou peut être attribuée à une diminution de l'activité métabolique générale (Geret et al., 2003). Cette diminution indique donc une protéolyse qui permet la production d'acides aminés libres. Ces acides aminés vont pouvoir être utilisés par le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie ou par gluconéogenèse pour fournir du glucose.

Pour les taux de protéines il est admis que les protéines musculaires sont une importante réserve énergétique chez les poissons (Pawar & Sonawane, 2013). Ces réserves sont généralement les dernières utilisées en cas de stress. En effet, le catabolisme des protéines peut fournir de l'énergie lors d'une forte demande énergétique (Ribeiro et al., 2001). Plusieurs études ont montré qu'une diminution de la concentration en protéines pouvait être considérée comme une adaptation physiologique pour venir compenser le stress induit par les Contaminants chimiques (Begum, 2004). La mesure de la concentration en protéines a déjà été utilisée comme indice général de l'état de santé des organismes (Giacomin et al., 2014).

Nos résultats des taux de protéines au niveau de la chair d'*O. niloticus* révèle des effets DOSES-OTC, très hautement significatifs. En effet, les individus exposés à des doses élevées d'OTC (50mg/l et 100mg/l) présentent des taux de protéines significativement inférieurs à ceux traités par les doses inférieures. Des résultats similaires sont rapportés au niveau de la chair du gardon *Rutilus rutilus* suite à une exposition à l'éthofumésate (Maes, 2014). La diminution de la concentration des protéines observée dans un site pollué indique que le muscle réalise une protéolyse, ce qui permet une production d'acides aminés libres dans le muscle. Les acides aminés libres peuvent produire du glucose, via la gluconéogenèse pour fournir de l'énergie requise pour la défense de l'organisme durant une exposition aux polluants (Vijayavel et al., 2006). Elle est aussi probablement due à une utilisation rapide des protéines par les cellules

sous des conditions de stress (Vajayavel & Balasubramanian, 2008), ou un blocage de la synthèse protéique et la dénaturation des protéines (Auffret et al., 2006).

Les réserves glucidiques varient selon le niveau de stress environnemental et de dégradation du milieu (Smolders et al., 2004). Les glucides sont considérés comme les premiers nutriments organiques dégradés en réponse au stress (Clarke, 1975), particulièrement le glycogène qui joue un rôle important dans le métabolisme énergétique des organismes marins (Zandee et al., 1980) et constitue la majeure partie du matériel de réserve destiné à l'élaboration des produits génitaux (Chalabi, 2001).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Maes, (2014) a attribué la diminution de la concentration en glucides totaux chez le gardon *Rutilus rutilus* contaminé par des produits phytosanitaires aux processus de détoxification. Ces processus induisent une forte demande énergétique aux niveaux des cellules à laquelle l'utilisation des glucides pourrait répondre en premier lieu. Une forte exposition au cadmium provoque une réduction des réserves glucidiques, des niveaux d'ATP intracellulaires et perturbe les fonctions mitochondriales des organismes marins (Hemelraad et al., 1990).

Les lipides jouent un rôle important comme réserves énergétiques chez de nombreux groupes d'animaux (Begum & Minar, 2012). Ils peuvent être utilisés comme indicateur précoce d'un stress aux polluants chez les organismes marins (Raeisi et al., 2015). Les taux de lipides quantifiés au niveau de la chair d'*O. niloticus* exposés à l'OTC montrent le même profil que celui des protéines et glucides. Les réserves en lipides et protéines dans les poissons dépendent de leurs stress environnementale (Convey, 1992.).

Lors de notre étude, le bilan biochimique (Protéine, glucide et lipide) des tilapias traités par l'ail *Allium sativum* offre un embonpoint pour nos poissons. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenu par Abdelhamid et al. (2001) et Khattab et al. (2004), qui ont constaté que l'inclusion de Biogen® dans l'alimentation a augmenté la teneur en protéines de poisson et diminué la graisse corporelle totale dans poisson. En revanche, Diab et al. (2002) ont signalé qu'il n'y avait pas de changements dans la composition corporelle des poissons causés par différents niveaux d'ail.

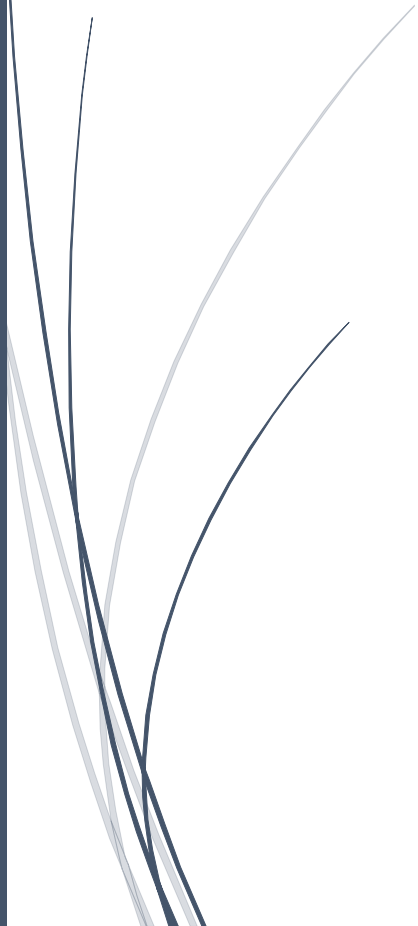
Enfin, à partir des résultats obtenus, il pourrait être recommandé que l'ail (*Allium sativum*) peut être utilisé comme promoteur de croissance et antibiotique pour le traitement ou la prévention des maladies et pour améliorer la tolérance des poissons au stress environnemental

(Sivam, 2001); par conséquent, la poudre d'ail doit être ajoutée au régime alimentaire des poissons d'eau douce.



Chapitre 03 :

## **Résultats et Discussion (D)**



## 4. Résultats de détection de Résidus OTC par HPLC

### 4.1. Conditions optimales pour la détection des antibiotiques en chromatographie liquide

Dans le présent travail, nous utilisons des techniques en chromatographie liquide (UV-Visible et HPLC). Ainsi, une recherche bibliographique a été consacrée aux conditions optimales pour la détection des antibiotiques en chromatographie liquide. Parmi les revues les plus extensives, celle d'Oka et al. (2000) a recensé 120 méthodes pour le dosage des tétracyclines et celle d'Hernandez-Arteseros et al. (2002) a rapporté 93 méthodes pour le dosage des quinolones. Ces revues permettent de dégager des tendances sur les phases stationnaires utilisées. Les phases inverses représentent 90 % des méthodes citées dans la littérature, avec une majorité pour les silices greffées par un groupement octadécyle. Dans ces conditions, il est possible de considérer que les colonnes de type C (carbone greffé) sont les plus adaptées au dosage de l'oxytétracycline, de la fluméquine et de l'acide oxolinique quelle que soit la matrice. Les tétracyclines forment des chélates avec les ions métalliques présents dans la phase stationnaire et s'adsorbent sur les sites silanols résiduels (Walsh et al., 1992; Hernandez-Arteseros et al., 2002).

La conséquence de ces phénomènes est un pic chromatographique traînant. Pour éviter cette traînée, les acides phosphorique, citrique, tartrique ou éthylène-diamino-tetra-acétique (EDTA) ont été utilisés (Oka et al., 2000; Hernandez-Arteseros et al., 2002). L'utilisation d'acide oxalique dans la phase mobile est un moyen d'obtenir des pics chromatographiques symétriques lorsque la phase stationnaire est une silice greffée contenant des impuretés. Les phases récentes de type <end-capped>, synthétisées à partir de silices pures à 99,99 %, permettent de s'affranchir de l'utilisation d'acide oxalique car elles ne contiennent plus de traces d'ions métalliques ni de sites silanols résiduels. D'autres phases stationnaires récentes sont des copolymères de styrène et divinyl-benzène.

Le pH aussi joue un rôle prépondérant dans la séparation chromatographique des oxytétracyclines; sa valeur optimale pour la phase mobile est située à 2,0 (Oka et al., 2000). Un tel pH provoque une hydrolyse acide du greffage du groupement octadécyle sur la silice. Afin de conserver la phase stationnaire dans un état satisfaisant, il est nécessaire de remonter

quotidiennement le pH (Bryan et Stewart, 1993) en rinçant la colonne par un mélange d'acétonitrile et d'eau par exemple.

La spectrométrie UV-visible est le mode de détection habituel des tétracyclines. Sur les 120 méthodes listées par Oka *et al.* (2000), 103 utilisent un détecteur UV-visible. La fluorescence naturelle des tétracyclines ne permet pas une limite de détection suffisamment faible. La chélation des tétracyclines avec des ions magnésium, calcium ou zirconium est utilisée pour améliorer les capacités de fluorescence des tétracyclines (Oka *et al.*, 2000). Cette chélation permet d'améliorer la sensibilité de 50 à 100 fois. Une dégradation alcaline permet également d'augmenter la fluorescence des tétracyclines (Oka *et al.*, 2000).

Malgré leurs avantages, ces deux méthodes chromatographiques (HPLC et UV-Visible) présentent quelques limites qui sont: la faible détection des acides faibles (peu dissociés), la difficulté de reconnaître dans le signal global, la part due aux ions de l'échantillon faiblement concentrés, le besoin de systèmes thermostatés car forte variation de la conductivité avec la température et d'éluants ayant une faible conductivité mais une forte affinité pour la phase stationnaire (Rosset *et al.*, 1991). Un autre inconvénient lié à l'utilisation de la phase mobile: lorsque la concentration d'ions compensateurs de la phase mobile est forte, les ions de l'échantillon sont moins retenus.

Dans le présent travail, la méthode de référence utilisée pour la recherche des antibiotiques dans la chair des poissons est la HPLC qui est une méthode accréditée et conventionnelle pour réaliser ce type d'analyse au laboratoire de chimie analytique à l'ENS - Kouba (Agilent HPLC, Série de 1260) et à la police scientifique d'Alger (Agilent HPLC, Série de 1100).

## 4.2. Méthode d'extraction des antibiotiques

Pour extraire les antibiotiques à partir des échantillons de chair de poisson le protocole standardisé utilisé à l'IZSSI(2015) a été adopté afin de disposer des meilleures conditions d'inter-calibration entre les laboratoires. Cette méthode consiste à prendre 2 g de chair de poisson, d'ajouter 0,4 ml EDTA (0,1 M ; pH=7), de laisser le contenu reposer pendant 15 min puis d'ajouter du méthanol (3,6 ml) et agiter pendant 30 sec avec un vortex. Le mélange obtenu est centrifugé pendant 10 min à 5000 rpm (rotation par minute). Enfin l'extrait est filtré avec

un filtre de 0,45 $\mu$ m et injecté dans le système chromatographique. Les extraits sont conservés à l'abri de la lumière et stockés dans le congélateur à (-40°C ou -80°C).

### 4.3. Screening des antibiotiques par HPLC

Dans le laboratoire de l'ENS-Kouba, la méthode analytique utilisée pour détecter la tétracycline dans les échantillons de poissons est la chromatographie liquide haute (HPLC) (**figure 20**). Le système HPLC (*Agilent Technology Infinity better*) est équipé d'une pompe quaternaire, d'un four à colonne, et d'un détecteur à barrette de Diode (DAD Detector). Avant d'effectuer les analyses, des standards de tétracycline chlorhydrate dissous dans du méthanol sont préparés dans la gamme de concentration 0,025 mg/ml. Un spectre UV a été utilisé permettant d'évaluer la pureté de la tétracycline chlorhydrate (190 et 650 nm) sachant que les tétracyclines sont détectables en UV/visible à 350 nm. Deux types d'éluant ont été utilisés (éluant A : l'eau, éluant C : le méthanol) selon un gradient binaire. Le type de colonne utilisée est une colonne C18 Agilent Infinity (50 mm, 21 mm, 1,9 mm). La température du four à colonne est de 30 °C. Le débit et le volume d'injection correspondent respectivement à 1 ml/min et 20  $\mu$ l.



Figure 20: procédures de l'HPLC sise la police scientifique d'Alger (Photo personnelle).

### 4.3.1. Spécificité et sélectivité

Une méthode est spécifique si elle produit une réponse uniquement pour l'analyte d'intérêt (oxytétracycline). Dans cette étude, il s'agit de comparer le signal provenant de la tétracycline seule et de la tétracycline dans la matrice biologique (*O. niloticus* traité par l'OTC). Le jugement de ce critère se base sur la comparaison des temps de rétentions trouvés. La spécificité de la méthode analytique est étudiée en comparant le signal provenant de la tétracycline seule et de la tétracycline dans l'extrait de la chair de poisson.

Une méthode est sélective si elle est capable de différencier et quantifier la tétracycline cible en présence d'interférents dans l'échantillon. La spécificité et la sélectivité sont déterminées par comparaison des chromatogrammes obtenus après injection dans le système chromatographique :

- ✓ Du ou des solvants utilisés pour préparer les solutions standards vs des solutions standards,
- ✓ De l'extrait issu de la matrice non supplémentée vs de l'extrait issu de la matrice supplémentée en la substance à analyser,
- ✓ De l'extrait issu de la matrice supplémentée en d'autres composants (standard interne).

La concentration du standard interne ajoutée aux échantillons est de 0,01 mg/ml.

### 4.3.2. Linéarité

La linéarité d'une méthode d'analyse se définit comme sa capacité, à l'intérieur d'un certain intervalle de concentration, d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en substance à examiner dans l'échantillon. L'intervalle de concentration à valider dans cette étude est couvert par une série de cinq concentrations, régulièrement positionnées et espacées allant de 0,02 à 100 mg/ml . Le même protocole étant appliqué à la tétracycline seule et à la tétracycline dans la chair de poisson. L'ensemble des standards sont utilisés pour former la droite de linéarité. Un ensemble de test statistiques a été effectué afin d'étudier la capacité de la méthode à donner des résultats directement proportionnels à la concentration en substance à examiner dans l'échantillon (Caporal-Gautier et al., 1992b, a) (tableau 18).

Tableau 18 : Tests statistiques utilisés pour étudier la linéarité de la méthode d'analyse

Critère	Tests utilisés	Formules
Linéarité	Test d'homogénéité des variances ( <i>Test de Cochran</i> )	$C_{calculé} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{j=1}^k S_j^2}$
	Test de comparaison des ordonnées à l'origine avec 0	$\frac{ a }{S_a}$
	Comparaison des pentes des droites D1 et D2 ( <i>Test de Student</i> )	$t = \frac{ b_1 - b_2 }{\sqrt{S_{b_1}^2 + S_{b_2}^2}}$
	Comparaison des ordonnées à l'origine des droites D1 et D2 ( <i>Test de Student</i> )	$t = \frac{ a_1 - a_2 }{\sqrt{S_{a_1}^2 + S_{a_2}^2}}$

### 4.3.3. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte (OTC) pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode (Caporal-Gautier *et al.*, 1992b, a). Elle est déterminée en se basant sur l'enregistrement graphique de la ligne de base donnée par le logiciel, suivant la formule suivante :

$$LD = 3 * h_{max} * R \text{ avec } R : \text{Quantité / signal}$$

La limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte (OTC) pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Elle est déterminée suivant la formule suivante :

$$LQ = 10 * h_{max} * R$$

#### 4.4. Inter-calibration entre les deux méthodes analytiques

Dans le but de valider les résultats trouvés par la méthode HPLC développée dans le présent travail avec la méthode conventionnelle et accréditée, les mêmes échantillons d'*O.niloticus* traités lors de notre phase expérimentale ainsi qu'une solution de 'OTC standard ont été préparés et injectés sur HPLC à l'ENS et l'HPLC-Police scientifique Alger. L'ensemble des résultats obtenus ont ensuite été comparés.

#### 4.5. Analyse des échantillons

Après validation de l'inter-calibration entre les deux méthodes, l'ensemble des échantillons de loup et de daurade (n=24) a été utilisé pour la recherche de la oxytétracycline avec la méthode HPLC. Les teneurs retrouvés dans la chair de poisson sont quantifiées dans chaque échantillon et comparées avec les limites de détection et de quantification et après correction par le taux de recouvrement par rapport à la limite maximale résiduelle (LMR).

#### 4.6. Analyses statistiques

Les données concernant la validation de la méthode HPLC ont été analysées à l'aide des tests de Student et de Cochran à l'aide du logiciel EPI-INFO6.3<sup>®</sup>. Les données concernant la recherche de résidus de la tétracycline chlorhydrate dans les échantillons de poissons sont comparées par ANOVA (analyse de variance) après vérification de la normalité (test de Lilliefors) et l'homogénéité (test de Fisher) des données. Le logiciel XL-STAT a été utilisé. Comme attendu, le test d'analyse de variance (ANOVA) a permis de confirmer l'homogénéité entre les cinq doses d'OTC.

## 4.7. Validation de la méthode analytique (HPLC) pour le dosage de l'OTC

La méthode utilisée dans le présent travail pour le dosage de l'OTC était la même appliquée au pour le dosage des autres antibiotiques (macrolides, sulfamides) dans notre axe de recherche ; ainsi elle a été soumise à une validation en adoptant les critères qui sont nécessaires.

Les résultats concernant la vérification de la spécificité, la linéarité, la fidélité intermédiaire et les limites de détection et de quantification de la méthode développée sont présentés dans les paragraphes suivants.

### 4.7.1. Spécificité

Le jugement de ce critère se base sur la comparaison des temps de rétentions trouvés en utilisant une solution de 10mg/ml. L'OTC apparait après un temps de rétention (TR) de 2,7 min et une aire de pic de 3402.2 mAU (Figure 21).

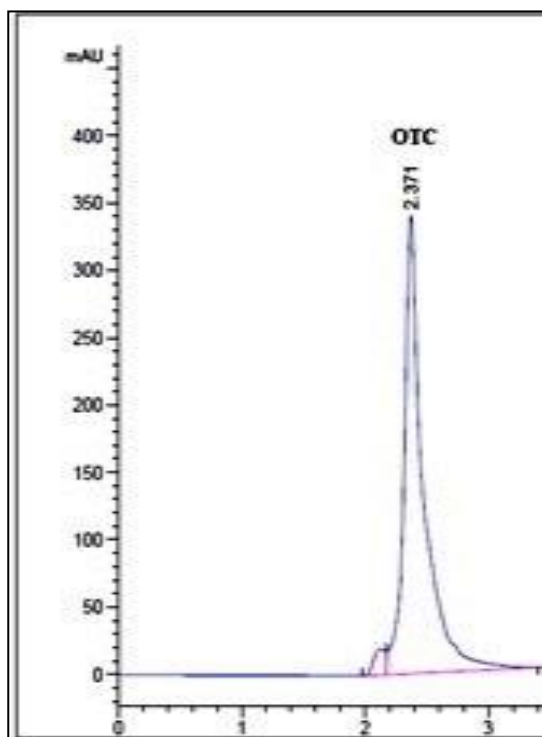


Figure 11: Chromatogramme de l'Oxytétracycline standard (OTC).

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) à permis d'obtenir des taux de recouvrement de la L'OTC de 37,03% et 89,99 % pour l'analyse par HPLC-ENS-Kouba (muscle *O.niloticus*) et de 40,41% et 90,9% pour l' analyse par HPLC-La police scientifique

d'Alger (tableau 18). Par contre nous avons remarqué un très faible pourcentage de rendement au niveau des intestins d'*O.niloticus*, Le problème est lié au rendement d'extraction qui nécessite une meilleure optimisation.

Tableau 19 : Calcul des pourcentages de recouvrements pour les *O.niloticus* traité par l'OTC analysés par HPLC.

Échantillon	Poids d' <i>O,niloticus</i> (w)	OTC(%) HPLC ENS Kouba	OTC(%) HPLC ENS KouPolice scientifique d'Alger
<b>Muscle d'<i>O,niloticus</i></b>			
<b>A3</b>	36	30,57	64,69
<b>B1</b>	95	50,09	16,63
<b>C1</b>	92	66,11	49,37
<b>D1</b>	75	42,95	20,01
<b>E1</b>	89	76,51	82,88
<b>Témoin</b>	96	80,34	6,62
<b>Intestin d'<i>O,niloticus</i></b>			
<b>A3</b>	36	48,88	6,62
<b>B1</b>	95	44,30	6,21
<b>C1</b>	92	90,78	5,48
<b>D1</b>	75	94,77	5,40
<b>E1</b>	89	91,41	6,27
<b>Témoin</b>	96	30,57	6,81

Pour les échantillons analysés donnent des résultats en dessous de la limite de détection à l'exception de deux échantillons qui ont néanmoins des résultats inférieurs à la limite de quantification (tableau 20). La limite réglementaire (100 µg/kg), tous les échantillons analysés sont conformes à la norme.

Tableau 20: Résultats de Calcul de la teneur en tétracycline trouvée dans les répliques d'*O.niloticus* Traités.

Échantillon	Poids d' <i>O.niloticus</i> (w)	Résidus OTC (µg/kg)	Limite réglementaire (µg/kg)
<b>Muscle d'<i>O.niloticus</i></b>			
<b>A3</b>	36	55,439	100
<b>B1</b>	95	29,024	100
<b>C1</b>	92	24,620	100
<b>D1</b>	75	25,067	100
<b>E1</b>	89	13,677	100
<b>Témoin</b>	96	0	100
<b>Intestin d'<i>O.niloticus</i></b>			
<b>A3</b>	36	20,223	100
<b>B1</b>	95	19,259	100
<b>C1</b>	92	9,564	100
<b>D1</b>	75	6,623	100
<b>E1</b>	89	0,522	100
<b>Témoin</b>	96	0	100

La méthode utilisée pour la screening des antibiotiques dans la chair d'*O.niloticus* a permis la recherche de cinq familles d'antibiotiques à la fois (pénicillines, quinolones, macrolides, sulfamides et tétracyclines) dans les échantillons sans recourir à plusieurs extractions. Cette méthode est très sensible car elle permet la recherche des quantités très faibles « de résidus d'antibiotiques » dans les échantillons. Elle est aussi très spécifique, elle permet de détecter chaque antibiotique à part avec l'absence de risque d'interférence avec les autres composés existants dans l'échantillon, vue qu'elle utilise des standards internes spécifiques.

Tous les échantillons analysés par HPLC chez les deux structures se sont révélés exempts en résidus d'antibiotiques. Ils sont donc conformes aux normes réglementaires et considérés comme ne présentant aucun risque sanitaire pour les consommateurs vus qu'ils ne contiennent aucun antibiotique appartenant aux cinq familles testées.

Les taux de récupération obtenus pour la tétracycline sont proches de 100% (>95%) pour les échantillons traités par l'OTC. [Horie et al. \(2003\)](#) ont trouvé des taux de récupération pour les macrolides allant de 70% à 93% dans les échantillons de poissons analysés par LC-MS tandis que [Chafer-Pericas et al. \(2011\)](#) ont obtenu des taux de récupération des antibiotiques (sulfamides et tétracyclines) allant de 78% jusqu'à 108%. [Gbylik et al. \(2013\)](#) ont trouvé des taux de récupération des antibiotiques de 96% à 111%. Pour les quinolones, [Wagil et al. \(2014\)](#) rapportent des taux de récupération > à 96%. Cela témoigne que les taux que nous avons

obtenus sont conformes à ceux de la littérature et montre que le protocole expérimental utilisé pour l'analyse de cet antibiotique est approprié et que la technique utilisée « HPLC » est performante.

Le protocole expérimental utilisé pour le dosage des antibiotiques dans la chair de poisson et en particulier les tétracyclines par HPLC est un protocole adéquat car il répond à tous les critères de validation méthodologique. De plus les résultats obtenus pour les échantillons analysés montrent que la variation est faible, (excellente répétabilité et reproductibilité), que les pourcentages de récupération trouvés sont élevés (>95%) avec des coefficients de variation < 10%.

Cependant, le rendement d'extraction (RE) obtenu au niveau des intestins d'*O. niloticus* traités par l'OTC n'a pas permis d'obtenir un bon (RE= 1%). Le problème est lié au rendement d'extraction qui nécessite une meilleure optimisation. Les pertes d'extraction peuvent être dues à la complexité de la matrice biologique utilisée, Il est aussi possible qu'il soit nécessaire de réaliser une double extraction ou de modifier les ratios stœchiométriques (chair/solvant). Des travaux devraient être poursuivis pour le vérifier.

Les limites de détection et de quantification obtenus pour la méthode HPLC développée dans le présent travail sont faibles. Cela permet de considérer que la méthode est adaptée pour la recherche des résidus dans la chair de poisson et la vérification de leur conformité par rapport à la limite réglementaire. [Wen et al. \(2006\)](#) ont travaillé avec une autre méthode d'extraction (SPME : micro-extraction en phase solide) et d'analyse HPLC. Ils ont trouvé des limites de détection et de quantification respectivement de 22 µg/kg et 73 µg/kg. La méthode développée dans le présent travail est donc beaucoup plus sensible et apporte une notable amélioration.

Les échantillons d'*Oreochromis niloticus* trait et analysés par HPLC ont tous révélés des teneurs inférieures à la limite de quantification (13,14 µg/kg). La limite maximale résiduelle (LMR) réglementaire fixée pour l'oxytétracycline étant de 100 µg/kg, tous les échantillons analysés sont conformes à la norme. Ils ne présentant aucun risque sanitaire pour les consommateurs et que les producteurs concernés étaient respectueux des normes.

[Malvisi et al. \(1996\)](#) ont effectué une étude de la distribution tissulaire et des résidus de l'oxytétracycline chez des daurades médicamenteuses élevées en cage avec des aliments commerciaux contenant l'antibiotique. Ils ont observé une grande variation dans l'absorption des antibiotiques (Oxytétracycline) et de l'accumulation tissulaire entre les différents

spécimens. Dans une autre étude concernant des poissons médicamenteux avec un antibiotique appartenant à la famille des tétracyclines les résultats ont révélé des concentrations supérieures à la LMR à 12 jours post-traitement (Romero-González et al., 2007) ayant analysé des daurades d'élevage de taille commerciale produites en Grèce et en Espagne pour rechercher les résidus d'antibiotique, Chefer- Pericas et al. (2011) ont suggéré d'avoir une période d'interdiction de vente d'au moins 37 après administration des antibiotiques. Alors que Won et al. (2011) ont montré que 99% des poissons échantillonnés sur le marché (poissons plats et daurades d'élevage produites en Korea) sont conformes. Tous les échantillons d'*O.niloticus* traités par l'OTC dans le cadre de ce travail se sont révélés conformes aux normes mais il faudrait poursuivre les travaux par un suivi régulier et amélioration des protocoles expérimentales.



## **Conclusion et Perspectives**



## **Conclusion et Perspectives**



## **Références bibliographiques**

337 pp.

**ABD-ELALLATIF A., EBRAHEEM K.** Studies on the effects of Hibiscus subdariffa, Allium sativum and Negella sativa on some bacterial isolates of chickens. Fac. Vet. Med. Assut. Univ. Egypt, 1996, 17, 245-51.

**Abdel-Daim, M.M., Dawood, M.A.O., Elbadawy, M., Aleya, L., Alkahtani, S., 2020b.** *Spirulina platensis* reduced oxidative damage induced by chlorpyrifos toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Animals. 10, 473.

**Abdelhamid am., Khalil ff., El-barbery mi., Zaki vh., Husien hs.,2002.** Feeding Nile tilapia on biogen to detoxify aflatoxin diet. In: annual scientific conference of animal and fish production, 1, Mansoura, Proceedings... Mansoura: Mansoura university, 2002. P.207-30.

**Abdelkhalek, N.K.M., Eissa, I.A.M., Ahmed, E., Kilany, O.E., El-Adl, M., Dawood, M.A.O., Hassan, A.M., Abdel-Daim, M.M., 2017.** Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 54, 99-104.

**ADLER AJ., HOLUB BJ.** Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemia men. Am. J. Clin. Nutr., 1997, 65, 445-50.

**Ahmad, S.I. and R.K. Gautam (2014).** Effect of organophosphate pesticide, nuvan on serum biochemical parameters of fresh water catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Int. Res. J. Environ. Sci. 3(10): 1-6.

**Alan, D.K; Nossaman, B.D; Ibrahim, I.N, Feng, C.J Mc Namara, D.B; Agrawal, K.C and P.J Kadpwitz (1995):** Analysis of responses of allicin, a compound from garlic, in the pulmonary vascular bed of the cat and in the rat. Euro. J. Pharmacology 276,21-26

**Alliouche, F. (2010, Décembre).** Efficience De Certains Aliments Sur La Biomasse Du Tilapia De Nil " *Oreochromis Niloticus* " Au Niveau De L'animalerie (These De Magistere). Usthb.

**Amiard J-C., Amiard-Triquet C., 2008.** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques, Lavoisier, Paris, 372 p.

**Apitz-Castro, R; S. Cabrera: M.R. Cruz: E. Ledezma and M.K. Jain (1983).** Effects of garlic extracts and of these pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction and platelet ultrastructure. Thromb Res. 32. 155

**Arrignon, J., 1996.** L'élevage de *Tilapia mossambica* comme animal de laboratoire. Verh. Int. Ver. Theor. Angew Limod. 17, 650–661.

**Babu, M. M., Sivaram, V., Immanuel, G., Citarasu, T., & Punitha, S. M. J. (2008).** Effects of Herbal Enriched Artemia Supplementation over the Reproductive Performance and Larval Quality in Spent Spawners of the Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8, 301-307.

**Bailly N., 2009.** *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). In: Froese, R. and D. Pauly. Editors. (2017). FishBase. World Register of Marine Species. À l'adresse: <http://www.fishbase.us/summary/Oreochromis-niloticus.html>.

**Barnabe G. 1989.** L'aquaculture. Volume1, 2 ème édition (Tech et Doc. Laveisres 1989).564p.

**Barnabe G. 1991.** Base biologique et écologique de l'aquaculture 1991.

**Beauvais, S.L., S.B. Jones, S.K. Brewer and E.E. Little (2000).** Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and Malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures. Environ. Toxicol. Chem.: Int. J. 19(7): 1875-1880.

**Begum, G. (2004).** Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. *Aquat. Toxicol.*, **66**: 83- 92.

Begum, G. (2004). Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. *Aquat. Toxicol.*, 66: 83- 92.

**Belakri N, 2023.** دليل ارشادي لتربية سمك البلطي النيلي في الاحواض. ص 42

**Bellet R., 1962 :** La furunculose de la truite ou " septicémie hémorragique " bulletin français de pisciculture trente-cinquième année. n° 207.

**Bentabet Lasgaa N., 2015.** Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes *Fredoliaaretioides* et *echiumvulgare* de l'ouest algérien. Thèse de doctorat, P 20-21. Available on : [www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue2/.../6-1-53-637.pdf](http://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue2/.../6-1-53-637.pdf)

**Bhuyan H.R., Chowdhury M.B., Nath K.K., Seal P., Hag M.A., 2003.** Studies on the biochemical parameters of *Cynoglossids* in the Kutuboha Channel, Bangladesh. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.*, 38: 91-96

**Black D., Love R.M., 1986.** The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol. B.*, **156**: 469–479 .

**Blem C.R., 1992.** Lipid reserves and body composition in postreproductive anurans. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 103: 653–656.

**Brand-Williams W., Cuvelier M. & Berset C., 1995:** Use of free radical méthode to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30

**Bryan, P., Stewart, J., 1993.** Separation of tetracyclines by liquid chromatography with acidic mobile phases and polymeric columns. *J Pharmaceut Biomed* 11 (10), 971-976.

**Buchmann K., Jensen P.B., Kruse K.D., 2003.** Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: in vitro experiments. *North American Journal of Aquaculture*, 65, 21-24.

**Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A, Buschmann AH (2013)** Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environm Micr* 15:1917–1942. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>  
*Canal Vet. Med.* J745-75.

**Caporal-Gautier, J., Nivet, J., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J., Russotti, R., 1992 a.** Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. I. Méthodologie. S.T.P. *Pharma Prat* 2 (4), 205-226.

**Caporal-Gautier, J., Nivet, J., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J., Russotti, R., 1992b.** Guide de validation analytique. Rapport d'une commission SFSTP. II. Exemples d'application. S.T.P. *Pharma Prat* 2 (4), 227-239.

**Chafer-Pericas, C., Maquieira, A., Puchades, R., Miralles, J., Moreno, A., 2011.** Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. *Food Control*, 22, 993-999.

**Chafer-Pericas, C., Maquieira, A., Puchades, R., Miralles, J., Moreno, A., 2011.** Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. *Food Control*, 22, 993-999.

**Chafer-Pericas, C., Maquieira, A., Puchades, R., Miralles, J., Moreno, A., 2011.** Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. *Food Control*, 22, 993-999.

**Chalabi I., 2001.** Cycle de reproduction et composition biochimique de la palourde *Ruditapes decussatus* dans la baie d'Alger. *Rapp. Com. Int. Mer. Medit.*, 36 : 370 p.

**CHAPMAN A., 2003.** Culture of hybrid Tilapia: reference profile. IFAS extension. University of Florida. Edis. 86 p.

**Convey P., 1992.** Seasonal lipid contents of Antarctic microarthropoda. *Exp. Appl. Acarol.*, **15** : 219-231.

**Coppock, R.W., Christian, R.R.G., Jacobsen, B.J., 2012.** Aflatoxins. Pages 1181–1199 in R. Gupta, editor. *Veterinary Toxicology: Basic & Clinical Principles*, 2nd edition. Elsevier, Inc., San Diego, California, USA.

**Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000).** GC-MS analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2576-2581.

Darlan Gusso, Stefani Altenhofen, Pâmella Moreira Fritsch, Gabriel Rübensam, Carla Denise Bonan, Oxytetracycline induces anxiety-like behavior in adult zebrafish, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 426, 2021,

**Dawood, M.A.O., 2016.** Effect of various feed additives on the performance of aquatic animals. Kagoshima University.

**Dawood, M.A.O., Abdo, S.E., Gewaily, M.S., Moustafa, E.M., SaadAllah, M.S., AbdEl-kader, M.F., Hamouda, A.H., Omar, A.A., Alwakeel, R.A., 2020c.** The influence of dietary  $\beta$ -glucan on immune, transcriptomic, inflammatory and histopathology disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*. **98**, 301-311.

**Dawood, M.A.O., Eweedah, N.M., Khalafalla, M.M., Khalid, A., Asely, A.E., Fadd, S.E., Amin, A.A., Paray, B.A., Ahmed, H.A., 2020b.** *Saccharomyces cerevisiae* increases the acceptability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to date palm seed meal. *Aquaculture Reports*. **17**, 100314.

**Dawood, M.A.O., Moustafa, E.M., Gewaily, M.S., Abdo, S.E., AbdEl-kader, M.F., SaadAllah, M.S., Hamouda, A.H., 2020a.** Ameliorative effects of *Lactobacillus plantarum* L-137 on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to deltamethrin toxicity in rearing water. *Aquatic Toxicology*. **219**, 734571.

**Deka, C and K. Dutta (2015).** Effect of cypermethrin on blood glucose and urea levels of *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Biolife*. **3(3)**: 717-721

**DIAB AS., EL-NAGAR GO., ABD-EL-HADY YM.** Evaluation of *Nigella sativa* L (black seeds; baraka), *Allium sativum* (garlic) and BIOGEN as feed additives on growth performance and immunostimulants of *O. niloticus* fingerlings. *Suez Canal Vet. Med. J.*, **2002**, 745-75.

DIAB AS., EL-NAGAR GO., ABD-EL-HADY YM., 2002, Evaluation of *Nigella sativa* L (black seeds; baraka), *Allium sativum* (garlic) and BIOGEN as feed additives

**Durou C., Mouneyrac C., Pellerin J., Pery A., 2008.** Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. In: Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Amiard J. C., Amiard-Triquet C., Lavoisier Tec et Doc., Paris, pp. 273-294.

**Durou C., Mouneyrac C., Pellerin J., Pery A., 2008.** Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. In: Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Amiard J. C., Amiard-Triquet C., Lavoisier Tec et Doc., Paris, pp. 273-294.

**Duval . J, Soussy. C-J (1990)** Antibiothérapie (4ème édition), page 3-58.

El-Ghareeb WR, Mulla ZS, Meligy AM, Darwish WS, Edris AM (2019) Antibiotic residue levels in camel, cattle and sheep tissues using LC-MS/MS method. J Anim Plant Sci 29(4):943–952

**ESSA AA., HADY AM., MAHA M., MARZOUK MS.** Effect of virginiamycin on performance and susceptibility of *O. niloticus* to *A. hydrophila* infection. J. Egypt Vet. Med. Ass., 1995, 55, 109-21.

**Faggio, C., Fedele, G., Arfuso, F., Panzera, M., Fazio, F., 2014.** Haematological and biochemical response of *Mugil cephalus* after acclimation to captivity. Cahiers de Biologie Marine.55, 31-36.

**FAO (2020)** Fishery and aquaculture statistics. Global production by production source 1950-2018 (FishstatJ). Retrieved from FAO Fisheries and Aquaculture Department [online] website: [www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en](http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en). Accessed 11 May 2022

**Gbylik, M., Posyniak, A., Mitrowska, K., Bladek, T. et Zmudzki, J., 2013.** Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Additives & Contaminants: Part A. Vol. 30, No. 6, 940–948.

**Gbylik, M., Posyniak, A., Mitrowska, K., Bladek, T. et Zmudzki, J., 2013.** Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Additives & Contaminants: Part A. Vol. 30, No. 6, 940–948.

**Gbylik, M., Posyniak, A., Mitrowska, K., Bladek, T. et Zmudzki, J., 2013.** Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Additives & Contaminants: Part A. Vol. 30, No. 6, 940–948.

**Geret F., Serafim A., Bebianno M.J. 2003.** Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus* ? Ecotoxicology, 12: 417–426.

**Giacomin M., Jorge M.B., Bianchini A., 2014.** Effects of copper on the energy metabolism in juveniles of the marine clam (*Mesodesma mactroides*). *Aquat. Toxicol.*, **152** : 30-37.

**Gill L.S. (1992).** Ethnomedical uses of plants in Nigeria. Uniben press.

**Gimeno L., Ferrando M.D., Sanchez S., Gimeno L.O., Andreu E., 1995.** Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotox. Environ. Safe.*, **31**: 153-157.

**Gimeno L., Ferrando M.D., Sanchez S., Gimeno L.O., Andreu E., 1995.** Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotox. Environ. Safe.*, **31**: 153-157.

Gogny . M, Puyt . J-D, Pellerin . J-L (2001) Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, page 165- 168. Editions le point vétérinaire 2001.

**Guardiola FA, Cerezuela R, Meseguer J, Esteban MA (2012)** Modulation of the immune parameters and expression of genes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by dietary administration of oxytetracycline. *Aquaculture* 334–337:51–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.003>

**Guerrida H., 2017.** Etude de situation d'aquaculture dans le sud – est en Algérie. Mémoire de Master. Université Kasdi Merbah, Ouargla.

**Haciseferogullari H., Ozcan M., Demir F., Calisir S., 2005.** Some nutritional and Technological properties of garlic. *Journal of Food Engineering*; 68: 463-469.

**Harabawy A.S., and A.T.A. Ibrahim (2014).** Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): hematological, biochemical and cytogenetic response. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 103: 61-67.

**Hashemi S., Blust R., De Boeck G., 2008.** The effect of starving and feeding on copper toxicity and uptake in Cu acclimated and non-acclimated carp. *Aquat. Toxicol.* **86** : 142–147.

**Hemelraad J., Herig H.J., Van Donselaar E.G., Holwerda D.A. & Zandee D.I., 1990.** Effects of cadmium in freshwater clams. III. Interaction with energy metabolism in *Anodonta cygnea*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19** : 699-703.

**HEO GJ., KIM BG., YEH JG., KIM JH.** Study on efficacy and safety of bio-gammamix by oral administration to cultured fish. *Korean J. Vet. Research*, 1994, 34,627-33.

**Hernandez, S.P., 2005.** Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 469, Rome, 97p.

**Hernandez-Arteseros, J., Barbosa, J., Compano, R., Prat, M., 2002.** Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J Chromatogr A* 945 (1-2), 1-24.

- Horie, M., Takegami, H., Toya, K., Nakazawa, H., 2003.** Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid Chromatography- electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 492,187–197.
- Horie, M., Takegami, H., Toya, K., Nakazawa, H., 2003.** Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid Chromatography- electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 492,187–197.
- Hrubec, T.C. Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000.** Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis Hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.* 29, 7–12.
- Hussain, M.I., B. Kumar and M. Ahmad (2016).** Effect of organophosphate insecticide, Dimethoate on physiology of common carp, *Catla catla* (Hamilton) and *Labeo rohita*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appli. Sci.* 5: 322-341
- Immanuel, G., Vincybai, V. C., Sivaram, V., Palavesam, A., & Marian, M. P. (2004).** Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*, 236, 53–65.
- Islam MJ, Rasul MG, Kashem MA, Hossain MM, Liza AA, Sayeed MA, Hossain MM (2015)** Effect of oxytetracycline on Thai silver barb (*Barbonymus gonionotus*) and on it's culture environment. *J FishAqua Sc* 10:323–336.  
<https://doi.org/10.3923/jfas.2015.323.336>
- John, P.J (2007).** Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to *Metasystox* and *Sevin*. *Fish Physio. Biochem.* 33(1): 15-20
- Johnson L., Casillas E., Mistitano D., Collier T., Stein J.E.B., Cain M.C. & Varanasi V., 1989.** Bioindicators of reproductive impairment in female English sole (*Parophyrus vetulus*) exposed to environmental contaminants. In : *Oceans 89*, vol. 2, Ocean Pollution Marine Technology Society, Oceanic Engineering Society of the IEEE Seattle, Washington, DC, 391-396 pp.
- Kandiel, M.M., A.M. El-Asely, H.A. Radwan and A.A. Abbass (2014).** Modulation of genotoxicity and endocrine disruptive effects of malathion by dietary honeybee pollen and propolis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Advanc. Res.* 5(6): 671-684.
- Kavitha, P., and J.V. Rao (2008).** Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environ.Toxicol. Pharmacol.* 26(2): 192-198.

**Khattab ya., shalaby ame., sharaf sm., el-marakby hi., rizkallaeh., 2004.** The physiological changes and growth performance of the Nile tilapia

**Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y.A., Millet J., Chaumont J.P., 2005.** Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois *Cymbopogon* Sp. Africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Ann.Méd.Vét*; 148: 202-206.

**Kolbener P. 2005.** Résidus de médicaments vétérinaires, page1-2. Manuel suisse des denrées alimentaires. Chapitre 55.

**Kümmerer, K., 2009.** The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* 90(8), 2354–2366

**Lacroix E. ,2004.** Pisciculture en Zone Tropicale, GTZ, 225p.

**Laurentie M. & Sanders P., 2002.** Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 15 (3) : 197- 201.

**Le Gal Y., Lagadic L., Le Bras S., Ramade F., 1997.** Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J. C., Ramade F. *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux.* Masson, Paris, pp. 241-285.

**Le Gal Y., Lagadic L., Le Bras S., Ramade F., 1997.** Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In: Lagadic L., Caquet T., Amiard J. C., Ramade F. *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux.* Masson, Paris, pp. 241-285.

**Leaver M.J., Clarke D.J. & George S.D., 1992.** Molecular studies of the phase II xenobiotic conjugative enzymes of marine pleuronectid flatfish. *Aqua. Toxicol.*, **22** : 265-278.

**Liu, L., Su, JQ, Guo, Y., Wilkinson, DM, Liu, Z., Zhu, YG et Yang, J., 2018.** Schémas biogéographiques à grande échelle du résistome antibiotique bactérien dans les plans d'eau de Chine. *Environnement international*, 117 , 292-299.

**MAATAOUI et al., 2006.** Activités antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du Figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). 2006. *Lebanese Science Journal.* 7(1) : 3-8.

**Madsen H.C.K., Buchmann K., Mellergaard S., 2000.** Treatment of trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark: Alternatives to formaldehyde. *Aquaculture*, 186, 221-231.

**Maes V., 2014.** Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus* : vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires. Thèse de Doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

**Maes V., 2014.** Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus* : vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires. Thèse de Doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

**Malvisi, J.; Dellarocca, G.; Anfossi, P.; Giorgetti, G., 1996.** Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration. *Aquaculture*, 3-4,147, 159 – 168.

**Malvisi, J.; Dellarocca, G.; Anfossi, P.; Giorgetti, G., 1996.** Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration. *Aquaculture*, 3-4,147, 159 – 168.

**Malvisi, J.; Dellarocca, G.; Anfossi, P.; Giorgetti, G., 1996.** Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration. *Aquaculture*, 3-4,147, 159 – 168.

**Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. & Kefalas P., 2005:** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89: 411–420.

**Matejova, I., Svobodova, Z., Vakula, J., Mares, J., Modra, H., 2017. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review.** *Journal of the World Aquaculture Society*. 48, 186- 200.

**McMahon, F.G and R.Vargas .,1993.** Can garlic lower blood pressure? A pilot study. *Pharmacotherapy* 13(4), 406.

**Metwally, M. A. A. (2009).** Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of fish and marine sciences*, 1(1), 56-64.

**Milhaud .G, Pinault . L.,1999.** Législation de la pharmacie vétérinaire. Editions le point vétérinaire. Chapitre III : évaluation des médicaments vétérinaires : Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), limites maximales de résidus (LMR), page 25-40. Editions Le point vétérinaire 2001.

**Militz, T. A., Southgate, P. C., Carton, A. G., & Hutson, K. S., 2013.** Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in aquaculture. *Aquaculture*, 408, 95-99.

**Molven A. & Goksoyr A., 1993.** Biological effects and biomonitoring of organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in the marina environment. *Ecotoxicologie Monitoring*. Richardson M., Weinheim, Germany, VCH : 137-162 pp.

**Molven A. & Goksoyr A., 1993.** Biological effects and biomonitoring of organochlorines and polycyclic aromatic hydrocarbons in the marina environment. *Ecotoxicologie Monitoring*. Richardson M., Weinheim, Germany, VCH : 137-162 pp.

**Morin R., Uhland C. & Lévesque G., 2005.** L'utilisation des antibiotiques en pisciculture au Québec. *Aquicole*, 9 (3) : 06

**Morshdy AEMA, Darwish WS, Daoud JRM et al (2019)** Estimation of metal residues in *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus* intended for human consumption in Egypt: a health risk assessment study with some reduction trials. *J Consum Prot Food Saf* 14:81–91. <https://doi.org/10.1007/s00003-018-1198-1>.

**Mukota Aziz Kimera, Gondam Melanie Flore Kamini, Tsafack Julie Murray, R.K., 1991.** *Harpers Biochemistry*. 22nd ed. Prentice Hall, International Inc., USA.

*Oerochromis niloticus* after feeding with Biogen® as growth promoter. *Egypt J. Aquat. Biol. & Fish*, 8, 145-58.

**Ogamba, E.N., Inyang, I. R and I.K. Azuma., 2011.** Effect of paraquat dichloride on some metabolic and enzyme parameters of *Clarias gariepinus*. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 3(3): 186-190.

**Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M., Harada, K., Suzuki, M., 1987.** Improvement of chemical analysis of antibiotics. XII. Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey. *J Chromatogr* 400, 253-261.

**Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H., 2000.** Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A* 882 (1-2), 109-133.

**Okonkwo, F.O., C.E.C.C. Ejike, A.N. Anoka and I.N.E. Onwurah (2013).** Toxicological studies on the short term exposure of *Clarias albus punctatus* (Lamonte and Nichole 1927) to sub lethal concentrations of Roundup. *Pakistan J. Biol. Sci.* 16: 939-944.

**Olivier, D., David, J. W. M., & Patrick, L. (2008).** Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*, 39(4), 334-338

on growth performance and immunostimulants of *O. niloticus* fingerlings. *Suez*

**Paperna I., 1982 :** parasites, infections et maladies du poisson en Afrique. CPCA, Doc Tech., (7) : 202p.

**Pawar S.M., Sonawane S.R., 2013.** Fish muscle protein highest source of energy. *International Journal of Biodiversity Conservation*, 5 (7): 433-435.

**Potil G, Caillon J, Jacqueline C, Navas D, Kergueris MF, Batard E.,2006.** Pharmacocinétique et modalités d'administration des antibiotiques, page 2-4. Laboratoire de Pharmacocinétique et de Pharmacie Clinique EA 525 Université V. Segalen Bordeaux 2 et Pharmacie centrale hôpital Haut-Lévêque CHU de Bordeaux.

**Pouliquen . H et Le Bris . H.,2001.** Residues of antibacterial drugs in foodstuff of fish origin: risk assessment, page 676-677. *Revue Méd. Vét.*, 2002, 153, 10, 675-678.

**Puyt . J-D, Guérin-Faubleé . V.,2006.** Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire. Bases de l'antibiothérapie. Edition 2006, page 1-27.

**Qi, Z., Zhang, X.-H., Boon, N., & Bossier, P. (2009).** Probiotics in aquaculture of China -- Current state, problems and prospect. *Aquaculture*, 290(1-2), 15-21.

**RAA J.** The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish. Sci.*, 1996, 4, 229-88. **SECOMBES CJ.** Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol.*, 1994, 4, 421-36.

**Raeisi S., Alishahi A.R., Shaban-Pour B., Ojagh S.M., Sharifi-Rad J., Iriti M., 2015.** Nutritional Composition and Antioxidant Activity of Vobla-roach (*Rutilus rutilus caspicus*) Muscle Tissue Exposed to Heavy Metals. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, 4(2) : 83-90. **Raeisi S., Alishahi A.R., Shaban-Pour B., Ojagh S.M., Sharifi-Rad J., Iriti M., 2015.** Nutritional Composition and Antioxidant Activity of Vobla-roach (*Rutilus rutilus caspicus*) Muscle Tissue Exposed to Heavy Metals. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, 4(2) : 83-90.

**Reda RM, Ibrahim RE, Ahmed ENG, El-Bouhy ZM (2013)** Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *The Egyp J Aqua Res* 39:241–248.

<https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.12.001>

**REILLY A., KÄFERSTEIN F.** Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) for their control in aquaculture production. *Aquac. Res.*, 1997, 28, 735-52

**Ribeiro S., Sousa J.P., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M., 2001.** Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotox. Environ. Safe.* **49** : 131–138.

**Richard Y., Baillargeon J.P., Masse H., 2016** : Guide de classification des anomalies externes des poissons d'eau douce du Québec. ENSEMBLE : 186 p.

**Rigos G, Nengas I, Alexis M (2006)** Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 261:1151–1155.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.023>

**Rivière J., 1993.** Les animaux sentinelles. *Courrier de l'environnement* 20 :59-67.

**Rodrigues S, Antunes SC, Correia AT, Nunes B (2018)** Oxytetracycline effects in specific biochemical pathways of detoxification, neurotransmission and energy production in *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environm Saf* 164:100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.124>

**Romero-González, R., López-Martínez, J. C., Gómez-Milan, E., Garrido-Frenich, A., & Martínez-Vidal, J. L., 2007.** Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead sea bream (*Sparus Aurata*) by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 857, 142-148.

**Romero-González, R., López-Martínez, J. C., Gómez-Milan, E., Garrido-Frenich, A., & Martínez-Vidal, J. L., 2007.** Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead sea bream (*Sparus Aurata*) by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 857, 142-148.

**Rosset, R., Caude, M., Jardy, A., 1991.** *Chromatographies en Phase Liquide et Supercritique*. Ed. Masson, Paris.

**Saleh, G.A., E.G. Nobi, A.S. Ahmed and A.E. Bary.,2007.** Study on the effect of reldan (Chlorpyrifos methyl) on health and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Zag. Vet. J.* 35: 110-121.

**Sand J. K, S. Y. Nam, H. C. Chung, S. Y. Hongand, K. H. Jung.,1995:** Enhanced effectiveness of dimethyl-4,4 dimethoxyl-5,6,5,6,-dimethyl-2,2-dioxybiphenyl-2,2-dicarboxylate in combination with garlic oil against experimental hepatic injury in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 7: 678 - 682

**Sand J. K, S. Y. Nam, H. C. Chung, S. Y. Hongand, K. H. Jung.,1995:** Enhanced effectiveness of dimethyl-4,4 dimethoxyl-5,6,5,6,-dimethyl-2,2-dioxybiphenyl-2,2-dicarboxylate in combination with garlic oil against experimental hepatic injury in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 7: 678 – 682

**Sang, G.K; S.Y.Nam; H.C. Chung; S.Y. Hongand K.H Jung,1995.** Enhanced effectiveness of dimethyl-4,411-dimethoxy – 5,6,51,61,-dimethylene dioxybiphenyl – 2,21 – dicarboxylate in combination with garlic oil against experimental hepatic injury in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol* 47, 678-682 .

**Sayed, A.E and H.S. Hamed,,2017.** Induction of apoptosis and DNA damage by 4-nonylphenol in African catfish (*Clarias gariepinus*) and the antioxidant role of *Cydoniaoblonga*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139: 97-101.

**Schàperclaus P.W., 1962 :** les maladies des poissons « maladies non parasitaires » BULLETIN FRANÇAIS DE PISCICULTURE TRENTE-CINQUIEME ANNEE. N°206 : pp : 5-17.

**Schàperclaus. P. W., 1962 :** les maladies des poissons BULLETIN FRANÇAIS DE PISCICULTURE TRENTE-CINQUIÈME ANNÉE. N°205 : pp : 138-16.5

**Sepulveda M., Quinn B., Denslow N., Holm S. & Gross T., 2003.** Effects of pulp and paper mill effluents on reproductive success of largemouth bass. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1 : 205-213.

**Sepulveda M., Quinn B., Denslow N., Holm S. & Gross T., 2003.** Effects of pulp and paper mill effluents on reproductive success of largemouth bass. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1 : 205-213.

**Sharafeldin, K., H. Abdel-Gawad, E. Ramzy, M. Sweilum and M. Nagy (2015).** Harmful impact of profenofos on the physiological parameters in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Int. J. Basic Appl. Sci.* 4(1): 19-26.

**Shibko S., Koivistoinen P., Tratyneck C., Newhall A. & Freidman L., 1966.** A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Anal. Biochem.*, 19 : 415-428.

**Shibko S., Koivistoinen P., Tratyneck C., Newhall A. & Freidman L., 1966.** A method for the sequential quantitative separation and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub cellular fraction. *Anal. Biochem.*, 19 : 415-428.

**SIEGEL G., WALTER A., ENGEL S., WALPER A., MICHEL F.** Pleiotropic effects of garlic. *Wien. Med. Wochenschr.*, 1999, 149, 217-24.

**Sivam Gp.**, 2001 Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 1106 -8.

**Smolders R., Bervoets L., De Coen W. & Bulst R., 2004.** Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient : linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.*, **129** : 99-112.

**Smolders R., Bervoets L., De Coen W. & Bulst R., 2004.** Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient : linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.*, **129** : 99-112.

**Sorgeloos P, 2014.** L'aquaculture A-T-Elle Le Potentiel Pour Devenir La «Biotechnologie Bleue » Dans L'avenir ? *Cah Agric* 23 : 53-64. Doi : 10.1684/Agr.2014.0683.

**Soufy, H., M. Soliman, E. El-Manakhly and A. Gaafa.,2007.** Some biochemical and pathological investigations on monosex Tilapia following chronic exposure to carbofuran pesticides. *Global Vet.* 1(1): 45-52.

**Subburaj, A., P. Jawahar, N. Jayakumar, A. Srinivasan and B. Ahilan.,2018.** Acute toxicity bioassay of Malathion (EC 50%) on the fish, *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) and associated histological alterations in gills. *J. Entomol. Zool. Stud.* 6(1): 103-107.

**Sumiyoshi: H. (1997)** New pharmacological activities of garlic and its constituents (Review). *Folia Pharmacological Japonica* 110 Suppl 1, 93 – 97.

**Tang, Z; Z. Sheng, S. Liu: X. Jian; K. Suin and Yan. M.,1997.** Preventing function of garlic on experimental oral precancer and its effect on natural killer cells. *Bulletin of Human Medical University* 22, 312 46 – 8.

**Trewavas, E., 1983.** Tilapiine Fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. Cornell University Press, Dorchester, England.

**Trichet, V.V., 2010.** Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research.* 41, 356-372.

**Ullah, R., A. Zuberi, S. Ullah, I. Ullah and F.U. Dawar.,2014.** Cypermethrin induced behavioral and biochemical changes in mahseer, *Tor putitora*. *J. Toxicol. Sci.* 39(6): 829-836.

**Umminger B.L., 1977.** Relation of whole blood sugar concentration in vertebrates to standard metabolic rate. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55**: 457–460.

**Umminger B.L., 1977.** Relation of whole blood sugar concentration in vertebrates to standard metabolic rate. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55**: 457–460.

**Van E., 2002.** Timing of exposure to apulp and paper effluent influences the manifestation of reproductive effects risk in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**: 2338-2347.

**Van E., 2002.** Timing of exposure to apulp and paper effluent influences the manifestation of reproductive effects risk in rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21** : 2338-2347.

**Vijayavel K. & Balasubramanian M.P., 2008.** Reproductive dysfunction induced by naphtalene in an estuarine crab *Scylla serrata* with reference to vitellogenesis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **69** : 89-94.

**Vijayavel K. & Balasubramanian M.P., 2008.** Reproductive dysfunction induced by naphtalene in an estuarine crab *Scylla serrata* with reference to vitellogenesis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **69** : 89-94.

**Wagil, M., Kumirska, J., Stolte, S., Puckowski, A., Maszkowska, J., Stepnowski, P., Bialk-Bielinska, A., 2014.** Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. *Science of the Total Environment*, 493, 1006–1013.

**Wagil, M., Kumirska, J., Stolte, S., Puckowski, A., Maszkowska, J., Stepnowski, P., Bialk-Bielinska, A., 2014.** Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. *Science of the Total Environment*, 493, 1006–1013.

**Wagil, M., Kumirska, J., Stolte, S., Puckowski, A., Maszkowska, J., Stepnowski, P., Bialk-Bielinska, A., 2014.** Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. *Science of the Total Environment*, 493, 1006–1013.

**Walsh, J., Walker, L., Webber, J., 1992.** Determination of tetracyclines in bovine and porcine muscle by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *J Chromatogr* 596 (2), 211-216.

**Wen, Y., Wang, Y., Feng, Y.O., 2006.** Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 70, 153–159.

- Wen, Y., Wang, Y., Feng, Y.O., 2006.** Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 70, 153–159.
- Wen, Y., Wang, Y., Feng, Y.O., 2006.** Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 70, 153–159.
- Wintermyer M. & Cooper K., 2003.** Dioxin/furan and PCB concentrations in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissues and the effects on egg fertilization and development *J.Shellfish Res.*, **22** : 737-746.
- Wintermyer M. & Cooper K., 2003.** Dioxin/furan and PCB concentrations in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) tissues and the effects on egg fertilization and development *J.Shellfish Res.*, **22** : 737-746.
- Won, S.Y., Lee, C.H., Chang, H.S., Kim, S. O., Lee, S.H., Kim, D.S., 2011.** Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS. *Food Control*, 22, 1101-1107.
- Yang, Y., Song, W., Lin, H., Wang, W., Du, L. et Xing, W., 2018.** Antibiotiques et gènes de résistance aux antibiotiques dans les lacs mondiaux : une revue et une méta-analyse. *Environnement international*, 116, 60-73.
- YAOLING L., JIUNRONG C., MENGSIYH S., MINGLER S., LIYL., CHEN JR., SHIEN MS., SHIEN MJ.** The effects of garlic powder on the hypolipidemic function and antioxidative status in hamsters. *Nutr. Sci. J.*, 1998, 23, 171-87.
- Zandee D.I., Klutymans J.H. Zuburg W. & Pieters H., 1980.** Seasonal variation in biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Neth. J. Exp. Mar. Biol.*, **14** :1-29.
- Zeid, E.A., and A.S.A. Khalil, 2014.** Toxicological consequences of Di-n-Butyl-Phthalate (DBP) on health of Nile Tilapia fingerlings. *Ameri. J. Ani. Vet. Sci.* 9(4): 269-276.
- Zeid, E.A., and A.S.A. Khalil, 2014.** Toxicological consequences of Di-n-Butyl-Phthalate (DBP) on health of Nile Tilapia fingerlings. *Ameri. J. Ani. Vet. Sci.* 9(4): 269-276.
- Zulfiqar, A., 2020.** Effect of malathion on blood biochemical parameters (urea and creatinine) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pakistan Journal of Science*, 72(1).

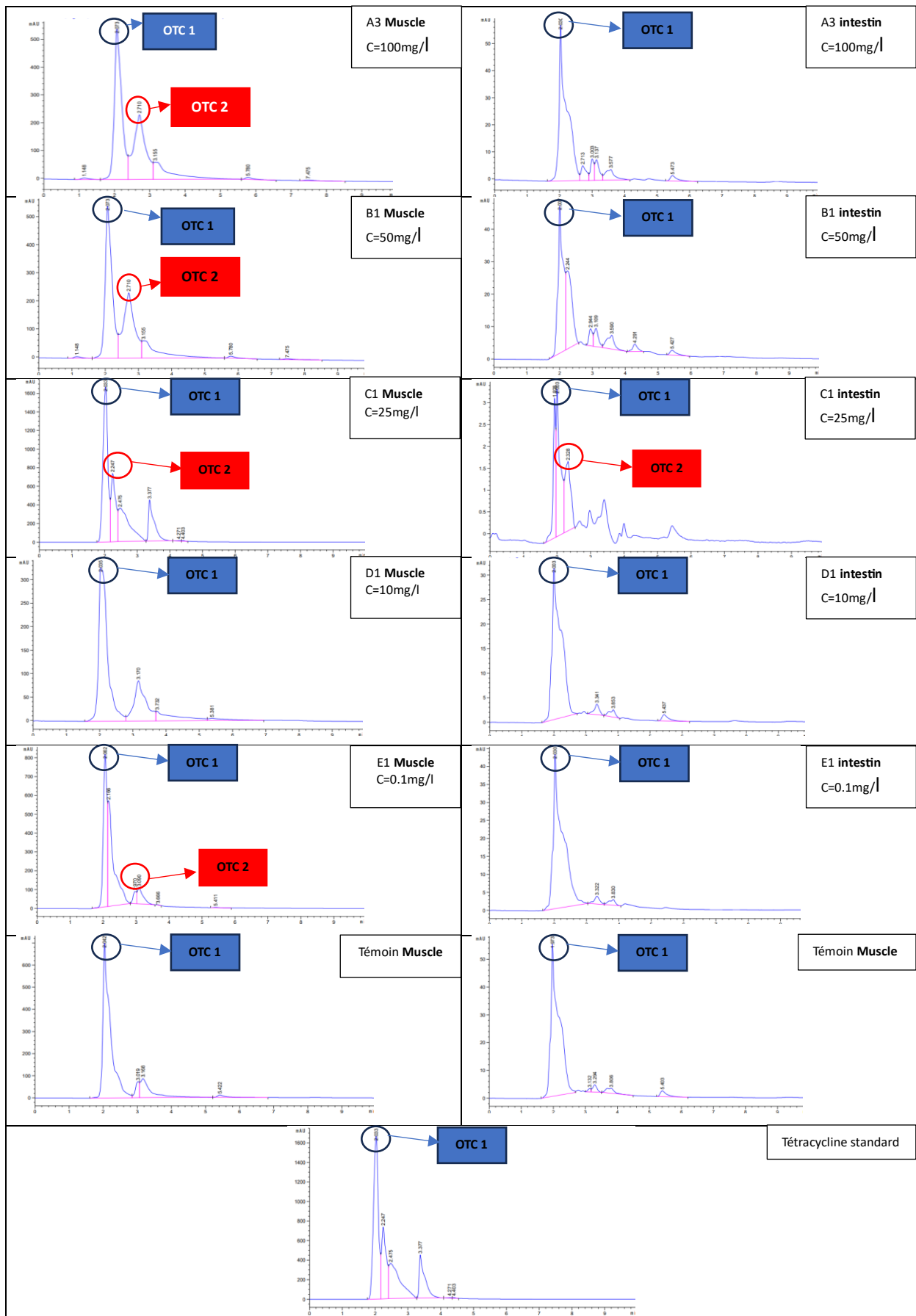


Figure A,1 : Chromatogrammes appliquant les systèmes chromatographiques de labo Laboratoire de PLBVB de l'ENS de Kouba.

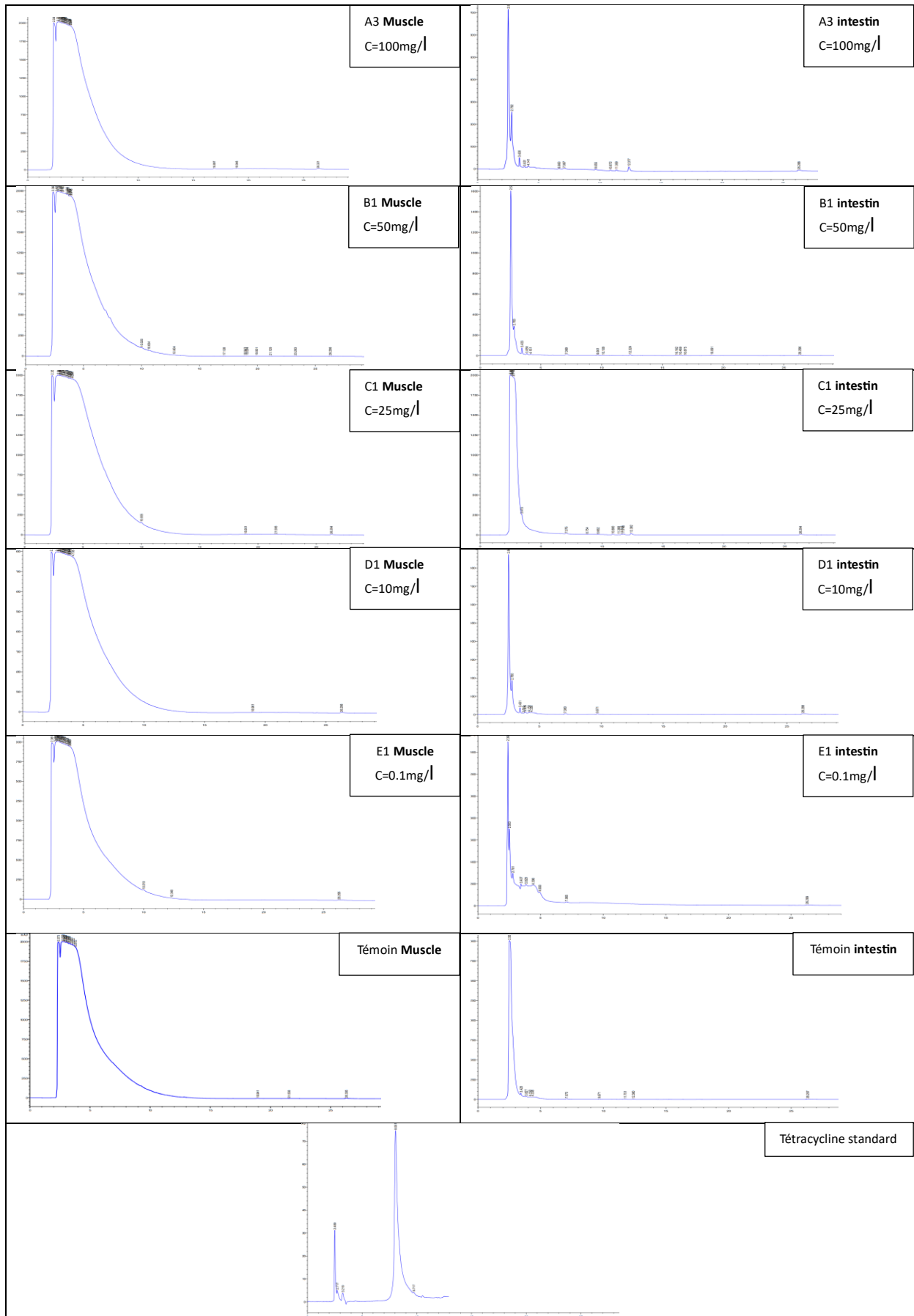


Figure A,2 : Chromatogrammes appliquant les systèmes chromatographiques de labo Laboratoire de Police scientifique.



## **Annexes**