

UNIVERSITE MONTPELLIER I  
UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

**TRAITEMENT PAR LAGUNAGE A HAUT RENDEMENT ALGAL  
(LHRA) DES EFFLUENTS PISCICOLES MARINS RECYCLES :  
EVALUATION CHIMIQUE ET ECOTOXICOLOGIQUE**

Thèse présentée pour obtenir le grade de :  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I  
Formation doctorale : Sciences de l'eau dans l'environnement continental  
Groupe des disciplines pharmaceutiques du CNU 40ème section  
Sciences du médicament (Hygiène-Environnement)

par

GENEVIEVE DEVILLER

soutenue le 07 novembre 2003

JURY :

Mme Aliaume, C., MDC, Université Montpellier II

Mr Blancheton, J-P., Docteur-Ingénieur, Ifremer

Mme Casellas C., Professeur, Université Montpellier I      Directeur de thèse

Mr Fleurence, J., Professeur, Université de Nantes      Rapporteur

Mr Lasserre, G., Professeur, Université Montpellier II      Président et rapporteur

## REMERCIEMENTS

Cette thèse est l'aboutissement d'un travail de longue haleine que je suis fière de vous présenter aujourd'hui. Il n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien des personnes suivantes auxquelles je voudrais exprimer ma reconnaissance :

Mr Jean Paul Blancheton pour m'avoir fait confiance, conseillée et aidée tout au long de cette thèse depuis les expérimentations jusqu'à la rédaction finale.

Mme Claude Casellas pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse et m'avoir fait bénéficier de ses relations professionnelles.

Mme Catherine Aliaume pour son aide sur les analyses statistiques et ses qualités pédagogiques.

Mr Gérard Lasserre pour avoir accepté d'être mon rapporteur et pour sa bienveillance.

Mr Joël Fleurence pour avoir accepté d'être mon rapporteur et apporté des conseils judicieux.

Mr Olivier Palluel pour son investissement sur les biomarqueurs et l'intérêt qu'il a manifesté pour mon travail.

Mr Jean Marc Deslouis Paoli pour son investissement sur les mesures de photosynthèse des algues.

Mme Hewa Asanthi et Mr Wilfried Sanchez pour leur travail sur les analyses des métaux et des biomarqueurs.

Mme Aurélie Charrier pour l'analyse des nutriments.

Mme Crépin pour son soutien et son professionnalisme.

Les stagiaires de l'Ifremer qui ont participé à ce travail et tous ceux qui ont apporté de la bonne humeur et du dépaysement à la station.

L'ensemble du personnel de l'Ifremer Palavas pour leur aide, leur bienveillance et le réel plaisir que j'ai eu à travailler avec eux. Je vous souhaite à tous une bonne continuation sur le chemin que vous aurez choisi.

Marco, ma famille et pepette pour leur affectueux soutien.

***A tous, merci...***

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>9</b>
<b>CHAPITRE I : PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES DE BARS ELEVES DANS TROIS SYSTEMES D'ELEVAGE.....</b>	<b>11</b>
I.1) INTRODUCTION.....	11
I.2) BIBLIOGRAPHIE.....	12
I.2.1) Le modèle biologique : le bar.....	13
I.2.2) Les paramètres d'élevage du bar .....	13
I.2.3) Caractéristiques des effluents d'élevage dans les circuits ouvert et recyclé.....	15
I.2.4) Traitement des effluents piscicoles par le lagunage .....	18
I.2.5) Les modèles de croissance du bar.....	20
I.3) MATERIELS ET METHODES.....	22
I.3.1) Les systèmes d'élevage expérimentaux testés.....	22
I.3.2) Suivi des élevages et paramètres mesurés.....	29
I.3.3) Les prélèvements d'eau et les nutriments mesurés.....	33
I.3.4) Les paramètres zootechniques mesurés.....	34
I.3.5) L'analyse statistique des résultats.....	36
I.4) RESULTATS.....	37
I.4.1) Les apports d'eau neuve.....	37
I.4.2) Les analyses de nutriments.....	39
I.4.3) Les paramètre d'élevage.....	41
I.4.4) Mortalité poisson.....	44
I.4.5) Croissance poisson.....	44
I.4.6) Alimentation poisson.....	48
I.5) DISCUSSION.....	50
I.5.1) Influence du traitement sur les performances des poissons.....	50
I.5.2) Influence du traitement sur les nutriments dissous.....	54
I.6) CONCLUSION.....	57
<b>CHAPITRE II : ETUDE DE L'ACCUMULATION DES METAUX ET DES BIOMARQUEURS CHEZ LES POISSONS EN FONCTION DE L'ELEVAGE.....</b>	<b>59</b>
II.1) INTRODUCTION.....	59
II.2) BIBLIOGRAPHIE.....	60

II.2.1) Les indicateurs de condition.....	60
II.2.2) La bioaccumulation des métaux.....	61
II.2.3) Les biomarqueurs biochimiques.....	67
II.3) MATERIELS ET METHODES.....	76
II.3.1) Prélèvements des poissons.....	76
II.3.2) Les indicateurs de condition.....	76
II.3.3) L'analyse des métaux.....	77
II.3.4) L'analyse des biomarqueurs biochimiques.....	78
II.3.5) L'analyse statistique des résultats.....	80
II.4) RESULTATS-DISCUSSIONS.....	81
II.4.1) Les indicateurs de condition.....	81
II.4.2) L'analyse des métaux traces.....	82
II.4.3) L'analyse des biomarqueurs biochimiques.....	88
II.5) CONCLUSION.....	93
<b>CHAPITRE III : RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES D'ÉPURATION PAR LE LAGUNAGE A HAUT RENDEMENT ALGAL.....</b>	<b>95</b>
III.1) INTRODUCTION.....	95
III.2) BIBLIOGRAPHIE.....	97
III.2.1) Description du lagunage à haut rendement algal.....	97
III.2.2) Capacités d'épuration et croissance des Chlorophycées.....	98
III.2.3) L'activité photosynthétique des algues.....	105
III.3) MATERIELS ET METHODES.....	107
III.3.1) L'absorption des nutriments et la production algale.....	107
III.3.2) L'activité photosynthétique des algues.....	111
III.4) RESULTATS-DISCUSSIONS.....	114
III.4.1) Etude de l'épuration de l'azote et du phosphore et de la croissance algale dans le LHRA.....	114
III.4.2) Etude de l'activité photosynthétique des ulves.....	133
III.4.3) L'analyse statistique descriptive des résultats.....	143
III.5) CONCLUSION.....	148
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>151</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>153</b>
<b>Liste des tableaux et figures.....</b>	<b>167</b>
<b>ANNEXES</b>	

## GLOSSAIRE

Abs NID : absorption de l'azote inorganique dissous

Abs PO<sub>4</sub> : absorption des phosphates

AD : aliment distribué

AI : aliment ingéré

ANI : aliment non ingéré

C : carbone

CAT : catalase

C<sub>ENT</sub> : concentration moyenne de l'effluent en entrée de lagunage

CID : carbone inorganique dissous

CO : circuit ouvert

COD : carbone organique dissous

CR : circuit recyclé

CRL : circuit recyclé laguné

C<sub>SOR</sub> : concentration moyenne de l'effluent en sortie de lagunage

CYP1A : cytochrome P450 1A

Da : densité algale

E : Einstein

EROD : Ethoxyresofurin-*O*-Deethylase

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

GPOX : glutathion peroxidase

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

GST : glutathion S transférase

h : hauteur d'eau dans un bassin de lagunage

HAP<sub>s</sub> : hydrocarbures aromatiques polycycliques

HSP<sub>s</sub> : protéines de stress

I<sub>c</sub> : intensité de compensation

IC : indice de conversion alimentaire

ICP-MS : spectromètre de masse à source plasma

I<sub>k</sub> : intensité de saturation

K : facteur de condition

KW : test de Kruskal Wallis

L : longueur du poisson

L1 & L2 : lagunage 1 & lagunage 2

LC 50 : concentration létale pour 50% de la population

LHRA: Lagunage à Haut Rendement Algal

LSI : indice hépatosomatique

Lum : lumière incidente

MC : mortalité cumulée

MES : matière en suspension

m<sub>f</sub> : masse du foie du poisson

m<sub>p</sub> : masse du poisson

N : azote

NAT : azote d'ammoniaque total

$N_f$  : effectif final de poisson

$NH_3$  ou ANI : ammoniaque non ionisé

$NH_4^+$  : ammoniaque ionisé

$N_i$  : effectif initial de poisson

NID : azote inorganique dissous

$N_{imp}$  : nombre d'impulsion sur la tige tactile

NK : test de Newman Keuls

$N_m$  : nombre de poisson mort

P : phosphore

PCBs: biphényles polychlorinés

PF : Poids Frais

Photop : photopériode

$P_m$  : poids moyen des poissons

$P_{max}$  : la production maximale

$P_{m_f}$  : poids moyen des poissons

$P_{m_i}$  : poids moyen des poissons

PS : Poids Sec

PT : protéines totales hépatiques

$Q_{ED}$  : débit d'eau douce

$Q_{EM}$  : débit d'eau de mer

$Q_{EN}$  : débit d'eau neuve

$Q_{LHR}$  : débit d'un bassin de lagunage

r : rayon

R : le ratio R

Rendt : rendement algal

Renouv : taux de renouvellement du lagunage

Resp : la respiration

RI : ration individuelle

ROS : espèces réactives de l'oxygène

S : salinité de l'eau du circuit

$S_{LHR}$  : surface d'un bassin de lagunage

SOD : superoxyde dismutase

$S_{rejetH}$  : salinité du rejet Hydrotech<sup>®</sup>

t : temps

TAJ : taux d'alimentation journalier

TCS : taux de croissance spécifique

Temp : température

TNJ : taux de nourrissage journalier

UA : unité relative normalisée

$V_{LHR}$  : volume d'un bassin de lagunage

$vol.j^{-1}$  : volume de lagunage par jour

$Vol_{rejetH}$  : volume rejeté par l'Hydrotech<sup>®</sup>

WHO : World Health Organization

$W_t$  : poids moyen du poisson au temps t



L'aquaculture, qui connaît un développement rapide depuis le début des années soixante dix, a pris très tôt en compte les problèmes de pollution et notamment celle des milieux aquatiques récepteurs des rejets d'élevage. Parmi les divers facteurs de pollution potentiellement présents dans ces rejets (bactéries, parasites, antibiotiques, gamètes, poissons...), les sels nutritifs contribuent au phénomène d'eutrophisation des milieux aquatiques, qui est un problème décrit à l'échelle mondiale.

La nécessité de contrôler les rejets de matière organique et de sels nutritifs dans les milieux aquatiques naturels s'inscrit dans les objectifs de la directive cadre pour la gestion de l'eau, adoptée en septembre 2000 par l'Union Européenne. Celle ci vise, sous quinze ans, la restauration d'un "bon état" général des différents types de milieux aquatiques sur tout le territoire européen. Elle impose une réglementation des rejets et le principe du pollueur-payeur pour les industries, les collectivités et les particuliers concernés.

En aquaculture, la charge polluante rejetée par les fermes d'élevage dépend du type d'installation et de la méthode de gestion de l'élevage. Les nouvelles techniques d'élevage fiables et respectueuses de l'environnement font l'objet de recherches. Le circuit recyclé est déjà utilisé à l'échelle industrielle. Il comporte une boucle de traitement qui permet de réutiliser plusieurs fois l'eau d'élevage. Les apports en eau sont ainsi réduits de 30 à 50 fois par rapport à un élevage traditionnel (Blancheton et al, 1996). Les volumes de rejet sont également fortement réduits, mais il sont plus concentrés notamment en nitrate et en phosphate qui ne sont pas éliminés par la boucle de traitement (Pagand, 1999 ; Léonard, 2000).

L'utilisation des algues pour éliminer les substances dissoutes des effluents aquacoles a été expérimentée avec succès pour des élevages en circuit ouvert, notamment en polycultures où plusieurs espèces sont cultivées dans la même eau d'élevage (Cohen et Neori, 1991 ; Jiménez del Rio et al., 1994 ; Neori et al., 1996; Schuenhoff et al., 2003).

La technique de traitement par lagunage à haut rendement algal (LHRA), développée par Oswald (1963) pour traiter des effluents domestiques, a été testée pour le traitement d'effluents piscicoles marins dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire « Environnement et santé publique » de l'université de Montpellier I et le « Laboratoire de Recherche Piscicole en Méditerranée » à la station Ifremer de Palavas-les-Flots.

Dans une étude récente, Pagand (1999) a montré que les ulvacées qui se développent toute l'année dans ce type d'effluent, réduisent les concentrations en azote inorganique dissous et en phosphate avec toutefois d'importantes fluctuations saisonnières. Il a conclu que l'effluent traité est théoriquement réutilisable dans le système d'élevage.

Ce travail s'inscrit dans un projet de réutilisation d'un effluent de système recyclé après traitement par LHRA, ce qui correspond à un nouveau type de système intégré générant le minimum de rejet (« zéro rejet »). Au cours de cette thèse un élevage de bars Européens en circuit recyclé dont l'effluent est traité par LHRA est comparé avec des élevages en circuit recyclé et en circuit ouvert. Les objectifs sont d'étudier les performances zootechniques des poissons dans ces élevages, de qualifier leur état de santé en utilisant des indicateurs biologiques précoces mis au point pour évaluer la qualité des milieux aquatiques environnementaux et de déterminer les paramètres de gestion du LHRA permettant la meilleure épuration de l'effluent recyclé.

Au cours du premier chapitre, la mortalité, la croissance et l'alimentation des poissons dans les différents élevages est étudiée. La question de l'effet de la réutilisation de l'effluent traité par LHRA sur le milieu d'élevage est également abordée.

Dans le deuxième chapitre, on étudie l'impact de la qualité d'eau de ces différents systèmes d'élevage sur l'état de santé des poissons, en utilisant la bioaccumulation des métaux et une batterie de biomarqueurs biochimiques. Il s'agit dans le même temps de rechercher des éléments qui permettent d'établir la qualité du produit commercialisé pour la consommation humaine.

Dans le troisième et dernier chapitre, les densités algales et les taux de renouvellement dans le LHRA qui maximisent l'épuration et la croissance algale en fonction des conditions climatiques locales, sont recherchés. Les facteurs de limitation de l'activité photosynthétique des algues, en particulier le carbone inorganique dissous dans l'effluent recyclé, sont étudiés *in vitro*.

## I.1) Introduction

De nombreux paramètres doivent être contrôlés pour permettre un bon état de santé et une croissance optimale de poissons en élevage : il est nécessaire de fournir de l'aliment de qualité en quantité suffisante, de maintenir les paramètres de l'environnement dans des limites de confort et d'éviter le développement de pathogènes. Les élevages traditionnels utilisent d'importants débits de renouvellement de l'eau dans les bassins, afin d'éliminer les déchets dissous et solides produits par les poissons. De nouvelles techniques consistent principalement à éliminer les déchets de l'eau pour pouvoir la réutiliser plusieurs fois dans les élevages. Elles ont permis de réduire les coûts de production, d'améliorer le contrôle des paramètres d'élevage et de réduire les rejets dans l'environnement. Ces systèmes sont appelés recyclés ou semi-clos ou bien encore intégrés lorsque plusieurs espèces sont produites dans un même élevage, notamment des algues.

Ces différentes techniques sont à l'origine d'une modification de la qualité d'eau d'élevage pour les poissons. Les paramètres les plus importants, comme la concentration en oxygène ou le pH, sont ajustés à des valeurs proches de l'optimal pour les poissons. Toutefois, il existe une liste non exhaustive de paramètres physico-chimiques non contrôlés qui peuvent influencer la croissance, celle-ci étant sensiblement variable pour chaque espèce de poisson (Hirayama et al., 1988 ; Leonard et al., 2002). De nombreux auteurs ont montré que les nitrates, les phosphates et le carbone organique s'accumulent dans le milieu d'élevage recyclé (Pagand, 1999 ; Leonard, 2000).

Au laboratoire Ifremer de Palavas des travaux ont été réalisés sur l'épuration d'effluents provenant d'élevages en circuit recyclé par lagunage à haut rendement algal (LHRA). Les résultats de ces travaux ont montrés que le LHRA permet d'abaisser la concentration moyenne en azote inorganique dissous et en phosphate de l'effluent traité et que celui-ci est théoriquement réutilisable dans le système d'élevage.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la réutilisation de cet effluent dans l'élevage en évaluant son impact sur les performances des poissons et le fonctionnement du système recyclé. L'élevage du bar Européen appelé aussi loup en Méditerranée est particulièrement

indiqué car il est élevé à l'échelle industrielle depuis une dizaine d'années et ses conditions d'élevage sont parmi les plus connues.

Les deux aspects abordés au cours de ce chapitre sont :

- la comparaison des survie, croissance et alimentation de bars élevés dans trois systèmes d'élevage : un circuit recyclé, un circuit recyclé dont l'effluent est traité par LHRA et un circuit ouvert utilisé comme contrôle.
- la caractérisation de l'effluent dans les élevages et la mesure des capacités d'épuration de l'azote inorganique dissous et des phosphates du LHRA.

## **I.2) Bibliographie**

Chez les poissons, la croissance est une fonction physiologique spécifique qui est continue dans le temps. En milieu naturel la croissance des poissons dépend de chaque espèce et elle est affectée par la variation des facteurs environnementaux et par l'accès à la nourriture. Pour les poissons d'élevage en revanche, où la nourriture est fournie de manière constante, la croissance de chaque espèce dépend plus ou moins directement des facteurs environnementaux.

De nombreux facteurs externes, dont la liste n'est pas définitivement établie, peuvent avoir un effet sur la croissance des poissons. Parmi eux, on distingue (1) les facteurs déterminants (photopériode, température, salinité) qui agissent directement sur des récepteurs pour augmenter ou diminuer la croissance et (2) les facteurs limitant pour lesquels la croissance est ralentie ou arrêtée, au dessus (ammoniaque), en dessous (oxygène) ou en dehors (pH) d'un certain seuil de tolérance (Bœuf & Payan, 2001).

Lorsque l'on veut développer un élevage, il est important de choisir et de maintenir ces facteurs dans des valeurs optimales pour l'espèce, afin de produire un poisson de bonne qualité au meilleur coût.

### **I.2.1) Le modèle biologique : le bar**

Nous avons choisi d'étudier le bar (*Dicentrarchus labrax*), également appelé loup en Méditerranée, qui est une espèce d'intérêt économique majeur pour l'aquaculture. Un spécimen de cette espèce est représenté sur la figure I.1 Ce vertébré fait partie de la classe des Osteichthyens, de l'ordre des Perciformes et de la famille des Serranidae. Comme chez tous les Perciformes, le corps est symétrique, les pectorales élevées sur les flancs. Les pelviennes sont en position thoracique, l'anale est épineuse ; les écailles sont cténoïdes. Les Serranidae présentent une bouche en position terminale ; 4 arcs branchiaux ; une colonne vertébrale de 24 à 35 vertébres.



**Figure I.1 : photo d'un spécimen de bar (*Dicentrarchus labrax*)**

Les poissons qui appartiennent au genre *Dicentrarchus* ont 2 nageoires dorsales séparées par un espace, le bord inférieur du préopercule pourvu de plusieurs épines courbes et ces poissons sont localisés à la Méditerranée et à l'Atlantique (Barnabé, 1976).

Ce poisson fusiforme, gris argenté, fréquente les fonds marins de faible profondeur (< 50 m) et affectionne les zones agitées. Il atteint au maximum un peu plus de 1 mètre pour un poids de 17 kilos.

### **I.2.2) Les paramètres d'élevage du bar**

Le bar fait partie du groupe des poissons euryhalins car il est capable de s'adapter à de larges variations de température et de salinité. Les adultes sont tolérants à des températures comprises entre 2 et 32°C (Barnabé, 1990).

Cependant, en milieu naturel, la chute des températures en automne en dessous de 10°C est associée à la migration des bars vers des eaux plus profondes et plus chaude (Pickett et Pawson, 1994). Precht et al. (1955) suggèrent qu'une température comprise entre 20 et 25°C est optimale pour la croissance du bar, car elle correspond à une complète compensation thermique de son métabolisme de base. C'est également l'avis de Claireaux et Lagardère (1999) pour qui le métabolisme de *Dicentrarchus labrax* n'est pas modifié entre 20 et 25°C, car il correspond à un certain degré d'homéostasie pour cette espèce.

Le bar est tolérant à une gamme étendue de salinité allant de 0 à 35g/l et les meilleures conditions de salinité pour sa croissance sont comprises entre 10 et 35 g/l (Bœuf et Payan, 2001). Claireaux et Lagardère (1999) ont montré que globalement le métabolisme de base du bar tend à diminuer avec la salinité, mais qu'une différence n'est significative qu'entre 5 et 20 g/l. Pour Bœuf et Payan (2001), les poissons marins ont presque toujours une meilleure croissance dans des conditions de salinité intermédiaire (8 à 20 g/l) et celle-ci est souvent corrélée à un taux d'alimentation supérieur et parfois à un meilleur indice de conversion.

Les variations lumineuses saisonnières sont responsables de modification dans le comportement alimentaire et dans le cycle sexuel des poissons (Bœuf et Le Bail, 1999). Afin d'éviter tout effet sur la croissance, la photopériode est maintenue constante toute l'année dans les élevages.

Lemarié et al. (2000) ont montré que le pH optimum pour la croissance du bar se situe entre 6,1 et 7,9 et qu'il n'y a pas de différence de croissance observée dans cette échelle.

Plusieurs auteurs considèrent dans leurs protocoles expérimentaux, qu'une concentration en oxygène dissous comprise entre 6 et 10 g/l est optimale pour la croissance du bar (Person-Le Ruyet et al., 1995 ; Lemarié et al., 2003).

Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) qui est produit par les poissons au cours de leur respiration est un facteur important à contrôler pour leur croissance et leur survie. Lemarié et al (2000) ont établi qu'une baisse de croissance et d'alimentation de 10 % est observée pour une concentration de CO<sub>2</sub> de 36,5 mg/l et un taux de renouvellement de l'eau neuve inférieur à 8,2 l/kgPF/h dans les élevages en circuit ouvert.

Au cours de leur métabolisme les poissons rejettent également de l'ammoniaque qui est très toxique pour eux et dont l'accumulation dans l'eau va d'abord réduire la croissance puis entraîner la mort des individus. Les bars de 5 à 235g rejettent 80 à 87% d'azote sous forme d'ammoniaque (Guerin-Ancey, 1976). Il est principalement excrété sous sa forme non ionisée  $\text{NH}_3$  (ANI). Dans l'eau  $\text{NH}_3$  est ionisé sous forme  $\text{NH}_4^+$ . La proportion relative de ces deux formes dépend du pH, de la température et, d'une façon moindre, de la salinité (Bower & Bidwell, 1978). La mesure de l'ammoniaque dans l'eau de mer s'exprime en azote d'ammoniaque total (NAT) qui représente la somme de  $\text{N-NH}_3$  et de  $\text{N-NH}_4^+$ . La molécule de  $\text{NH}_3$ , non polaire et liposoluble, est 300 à 400 fois plus toxique que  $\text{NH}_4^+$  (Haywood, 1983). La toxicité aiguë de l'ammoniaque chez les juvéniles de bar a été étudiée par Person-Le Ruyet et al. (1995) et ils ont mesuré une LC 50 (Concentration Létale pour 50% de la population) de  $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$  N-ANI ou  $40 \text{ mg.l}^{-1}$  N-NAT. Lemarié et al. (2003) ont étudié la toxicité chronique de l'ammoniaque chez les juvéniles de bar et ils ont établi une concentration maximale de  $0,26 \text{ mg.l}^{-1}$  N-ANI ou  $6,5 \text{ mg.l}^{-1}$  N-NAT dans l'eau d'élevage pour permettre une croissance optimale des poissons.

### ***1.2.3) Caractéristiques des effluents d'élevage dans les circuits ouvert et recyclé***

Le tableau I.1 montre quelques caractéristiques physico-chimiques d'effluents provenant d'élevage marin en circuit ouvert ou en circuit recyclé.

#### **1.2.3.1) Le circuit ouvert**

Dans un circuit ouvert, le maintien de conditions d'élevage "optimales" nécessite d'importants taux de renouvellement (5 à 34 fois le volume d'élevage par jour) qui permettent de diluer les rejets des poissons et en particulier l'ammoniaque très toxique pour eux.

Dans le cas d'élevage de bars, Lavenant & al (1995) indiquent que les normes zootechniques préconisent entre 24 et 36 renouvellements par jour pour une charge d'environ  $50 \text{ kg.m}^{-3}$  ( $20$  à  $30 \text{ L.kg}^{-1} \text{ PF.h}^{-1}$ ). Les concentrations en nutriments dans

l'effluent restent faibles et évoluent peu avec le taux de renouvellement de l'eau neuve. Les apports d'eau neuve importants permettent d'éliminer continuellement les produits excrétés par les poissons (féces, CO<sub>2</sub>, ammoniacque) et de maintenir une concentration en oxygène dissous et un pH stables pour les poissons. Les principaux inconvénients de ce type d'élevage sont une dépendance vis à vis des variations de la qualité de l'eau neuve pompée (paramètres physico-chimiques et germes pathogènes éventuels) et le rejet dans l'environnement d'un effluent faiblement concentré mais avec un débit important. Ce type de rejet peut contribuer à l'eutrophisation des milieux récepteurs si la capacité de dilution de ces derniers est insuffisante.

**Tableau I.1 : Caractéristiques physico-chimiques de quelques effluents issus d'élevage en circuits ouverts et recyclés**

	Circuit ouvert		Circuit recyclé		
	Jiménez del Rio et al. (1996)	Lemarié et al. (1998)	Villon et al. (1989)	Pagand (1999)	Pedersen (1998)
Référence					
Espèce	<i>S. aurata</i>	<i>D. labrax</i>	<i>D. labrax</i>	<i>D. labrax</i>	<i>D. labrax</i>
Charge (kg.m <sup>-3</sup> )	20	47	20	64	
Eau neuve (l.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )	400	720	77	20	4,5-6,8
Température (°C)	17-24	16-19		22	24
Oxygène (mg.l <sup>-1</sup> )		7,3		2,8	
pH	7-8			7,6	
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )	0,09-0,13	1,02±0,01	< 0,1	10	57
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )		0,17±0,04	< 0,1	0,7	
N-NAT(mg.l <sup>-1</sup> )		0,4±0,4	< 0,1	0,9	
N-NID (mg.l <sup>-1</sup> )	1,00-1,33		0,09	12	
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg.l <sup>-1</sup> )		0,08±0,05	0,01	1,4	10



### 1.2.3.2) Le circuit recyclé

Dans le cas d'élevage en eau recyclée, les taux de renouvellement de l'eau des bassins sont du même ordre, mais l'élimination de la fraction particulaire, par sédimentation et filtration, la transformation de l'azote ammoniacal en nitrate, par nitrification bactérienne, et l'élimination du CO<sub>2</sub> par dégazage, permettent de réduire considérablement les besoins en eau de renouvellement du système d'élevage. En effet, l'azote sous forme de nitrate est beaucoup moins toxique que sous forme ammoniacal avec, par exemple, une LC50 mesurée de 293 mg/l de N-NO<sub>3</sub> chez les salmonidés (Person-Le Ruyet & Bœuf, 1998). Les apports en eau sont ainsi réduits de 30 à 50 fois par rapport à un élevage traditionnel, ce qui rend nécessaire le maintien artificiel de la concentration en oxygène dissous et du pH. Le fonctionnement en eau recyclée présente le sérieux avantage de contrôler la quasi totalité des paramètres physico-chimiques de l'effluent d'élevage (Blancheton et al., 1996) et ainsi, contrairement aux circuits ouverts, de limiter l'impact de la qualité de l'eau utilisée pour le renouvellement. En outre, une consommation d'eau neuve plus faible a pour conséquence de réduire le volume d'effluent éliminé dans l'environnement (Blancheton et al., 1996).

Cependant, si la boucle de traitement des systèmes recyclés permet de retirer régulièrement les fécès et la fraction particulaire de l'eau, elle ne permet pas d'éliminer certaines substances dissoutes qui vont se concentrer dans l'effluent. Ainsi la qualité de l'effluent d'un élevage en eau recyclée est très différente de celle d'un élevage traditionnel. Le tableau I.1 montre quelques caractéristiques physico-chimiques de quelques effluents issus de circuits ouvert et recyclé.

Plus le taux de renouvellement de l'eau neuve dans le circuit est faible et plus les substances dissoutes sont concentrées dans l'eau d'élevage. C'est le cas des substances azotées et phosphorés dont les formes dissoutes sont principalement représentées par les nitrates et les phosphates. Les apports d'eau neuve dans les circuits recyclés sont couramment exprimés en fonction de l'aliment ingéré par les poissons par le ratio R (en kg.m<sup>-3</sup>).

Leonard (2000) a établi qu'il existe une relation linéaire entre ce ratio R et la concentration en azote inorganique dissous, exprimée en quantité d'azote (N-NID) dans l'eau du circuit, dont la formule est :

$$\text{N-NID} = 40,6.R + 6,99 \quad (r^2 = 0,97)$$

Leonard (2000) a également établi une relation logarithmique entre ce même ratio R et la concentration des phosphates, exprimée en quantité de phosphore (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) dans l'eau du circuit, dont la formule est la suivante :

$$\text{P-PO}_4^{3-} = \ln(R) + 2,82 \quad (r^2 = 0,82)$$

La pente de ces droites représente la quantité d'azote et de phosphore retrouvée dans le circuit par kilo d'aliment ingérée pour un aliment contenant 44% de protéines (soit 67g d'azote.kg<sup>-1</sup>) et 1,5 % de phosphore.

Ainsi, les rejets piscicoles riches en azote et phosphore inorganique sont susceptibles de provoquer l'eutrophisation des milieux aquatiques récepteurs si la capacité de dilution de ces derniers n'est pas suffisante. Ces phénomènes ont déjà été largement observés à l'échelle mondiale et plus particulièrement autour des fermes de crevettes. Si les circuits recyclés permettent de réduire le volume d'effluent rejeté, ils ne diminuent pas les flux d'azote et de phosphore rejetés. Il serait alors intéressant de disposer d'une unité de traitement supplémentaire de l'effluent pour réduire sa charge en substances dissoutes et le rendre compatible avec un rejet dans l'environnement ou, idéalement, réutilisable dans l'élevage pour tendre vers des systèmes d'élevage sans rejets.

Parmi les traitements possibles ayant déjà fait leurs preuves pour les effluents domestiques, le lagunage est particulièrement intéressant car il est simple d'utilisation et de faible coût.

#### ***1.2.4) Traitement des effluents piscicoles par le lagunage***

Le lagunage est une « culture d'algues » qui reproduit les phénomènes d'auto-épuration qui se réalisent naturellement dans les milieux aquatiques en réponses aux apports de sels nutritifs et de matières organiques. Ils sont utilisées depuis l'antiquité pour la pisciculture en Asie et en Grèce (Gloyna, 1972). De nombreux auteurs ont étudié l'utilisation des algues pour le traitement des effluents marins d'aquaculture (Goldman et al, 1974a ; Goldman et al, 1974b ; Krom et Van Rijm, 1989 ; Vandermeulen et Gordin, 1990 ; Cohen et

Neori, 1991 ; Neori et al, 1991 ; Jimenez Del Rio et al, 1994; Craggs, Smith et McAuley, 1995 ; Schuenhoff et al, 2003). Certains auteurs ont étudié la faisabilité de développer des polycultures.

Le principe d'une polyculture est d'élever simultanément plusieurs espèces qui sont complémentaires les unes avec les autres et ainsi de limiter les déchets. Hussenot et al (1998) ont proposé un élevage de loup (*Dicentrarchus labrax*) dont les effluents sont enrichis en silicium pour produire des diatomées (*Skeletonema costatum*), qui seront ensuite utilisées pour nourrir des huîtres (*Crassostera gigas*) à haute valeur ajoutée. Neori et Shpigel (1999) proposent un traitement d'effluents d'élevage de Daurades (*Sparus aurata*) par des ulves (*Ulva lactuca*) qui sont ensuite consommées par des mollusques herbivores : les abalones (*Haliotis discus hannai*).

La plupart de ces études concernent l'élimination de l'ammoniaque d'un effluent issu de circuit ouvert avant son rejet dans le milieu extérieur ou sa réutilisation partielle dans l'élevage. En revanche peu d'études ont été faites sur le traitement des effluents concentrés des circuits recyclés et sur l'impact que pouvait avoir la réutilisation de l'effluent traité par lagunage dans le circuit d'élevage pour les poissons.

L'originalité du travail de recherche mené au « Laboratoire de recherche piscicole Méditerranéen » à l'Ifremer de Palavas-les-flots en collaboration avec le laboratoire « Environnement et santé publique » de la faculté de pharmacie de Montpellier est d'utiliser le Lagunage à Haut Rendement Algal (LHRA) pour le traitement d'effluents marins de circuits recyclés. Le LHRA diffère du lagunage classique par une plus faible profondeur des bassins et un brassage continu de la masse d'eau qui favorisent la croissance des algues. Ce système est étudié depuis 1994 et a donné lieu à de nombreuses publications (Monnot, 1995 ; Ausseil, 1997).

Le travail le plus récent sur le sujet est la thèse de Pagand (1999). Il a mesuré pendant 2 ans les capacités d'épuration d'un LHRA alimenté avec un effluent marin de loups (*Dicentrarchus labrax*) en circuit recyclé. Il a observé que la biomasse algale qui se développe toute l'année dans le bassin de LHRA est à 99% de type macroalgale (majoritairement des chlorophycées ubiquistes des genres *Ulva* et *Enteromorpha*) et que l'efficacité du traitement par le LHRA est très saisonnière avec un maximum en été et un minimum en hiver. Le taux d'élimination de l'azote inorganique dissous a varié de 30 à 88%, avec une moyenne annuelle de 59%. Le taux d'élimination des

phosphates a varié de 0 à 82%, avec une moyenne annuelle de 56%. Le pH et la concentration en oxygène dissous sont augmenté en sortie de LHRA pour atteindre un maximum de 9 et 15 mg.l<sup>-1</sup> respectivement.

Il en déduit que les résultats obtenus laissent supposer que l'eau traitée par le LHRA est de qualité suffisante pour être réutilisée dans l'élevage car :

(i) L'azote ammoniacal toxique pour les poissons est éliminé rapidement du milieu, avec

des concentrations résiduelles inférieures à 0,04 mg N.l<sup>-1</sup>.

(ii) il n'a pas observé de microalgues dans le lagunage qui pourraient s'avérer toxiques

pour les poissons comme c'est parfois le cas en milieu naturel (Glibert et al, 2002).

(iii) Une séparation par simple tamisage permet d'éliminer les macroalgues de l'effluent traité.

(iv) l'azote est essentiellement présent sous forme de nitrate et la concentration en nitrite dans l'eau traitée est très faible (les nitrites étant toxiques pour les poissons).

(v) Le niveau élevé du pH et de l'oxygène de l'effluent traité est favorable au maintien de ces paramètres dans l'eau d'élevage et permet donc de réduire les besoins (et donc le coût) en hydroxyde de sodium et en oxygène.

### ***1.2.5) Les modèles de croissance du bar***

Différents types de modèle ont été développés pour décrire la croissance des poissons. Les modèles basés sur des bilans énergétiques prennent en compte l'évolution de paramètres environnementaux (température de l'eau, concentration en oxygène, qualité de l'aliment) et sont adaptés aux élevages en cage ou en circuit ouvert qui sont fortement dépendants des conditions du milieu. Les modèles empiriques sont eux souvent établis à partir de régressions logarithmiques et sont adaptés aux élevages en circuit ouvert et recyclé. Ce sont ces derniers que nous avons retenu pour les comparer à la croissance du bar dans nos circuits.

### I.2.5.1) En circuit ouvert

Le modèle de Tanguy & Le Grel (1989) a été établi pour simuler la croissance du bar en cage pendant la phase de grossissement. Il prend en compte le poids du poisson pour calculer son taux de croissance spécifique (%.j<sup>-1</sup>) exprimé par :

$$\text{TCS} = \alpha \times e^{0,12 \times \text{Temp}} \times m_p^{-0,34}$$

avec: Temp = température de l'eau d'élevage (°C)

$\alpha = 0,3$  si Temp < 26°C ;  $\alpha = 0,2$  si Temp > 26°C ;  $m_p$  = poids du poisson (g)

Le poids atteint au temps t+1 s'exprime alors en fonction du poids au temps t par :

$$m_p(t+1) = m_p(t) \times (1 + \text{TCS}/100)^t$$

avec : t = nombre de jour d'élevage entre deux mesures de poids

### I.2.5.2) En circuit recyclé

Le modèle de Pagand et al. (2000a) est établi pour simuler les taux d'azote inorganique dissous dans un élevage de bar en circuit recyclé maintenu à 22°C. Ce modèle comporte des sous modèles de croissance et d'alimentation des poissons.

#### I.2.5.2.1) Sous modèle de croissance

Il montre une corrélation significative ( $P < 0,001$ ;  $n=21$ ;  $r^2 = 0,92$ ) entre le taux de croissance spécifique (%.j<sup>-1</sup>) et le poids du bar exprimée par :

$$\text{TCS} = 13,90 \times W_t^{-0,61}$$

avec:  $W_t$  = poids moyen des poissons au temps t (g)

Le poids atteint au temps t+1 s'exprime alors en fonction du poids au temps t par :

$$W_{t+1} = W_t \times \exp((13,9 \times W_t^{-0,61}) / 100)$$

avec : t = nombre de jour d'élevage entre deux mesures de poids.

### **I.2.5.2.2) Sous modèle d'alimentation**

Il montre une corrélation significative ( $P < 0,001$ ;  $n=21$ ;  $r^2 = 0,89$ ) entre le taux d'alimentation journalier ( $\%.j^{-1}$ ) et le poids du bar exprimée par :

$$TAJ = 8,36 \times W^{-0,41}$$

avec :  $W$  = poids moyen des poissons

## **I.3) Matériels et méthodes**

### ***I.3.1) Les systèmes d'élevage expérimentaux testés***

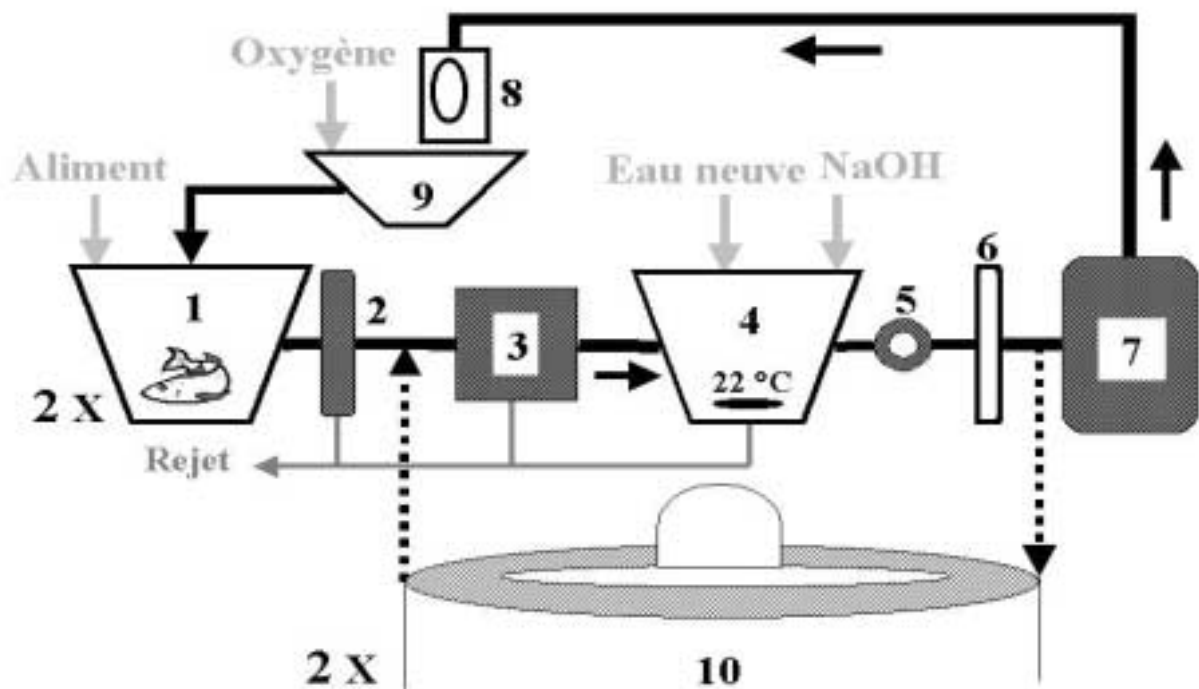
#### **I.3.1.1) Schéma général des circuits expérimentaux**

Les trois types d'élevage expérimentaux utilisés au cours de cette étude sont situés à la station IFREMER de Palavas-les-Flots (Hérault, France). L'un d'entre eux, appelé circuit ouvert (CO) est installé dans une salle et les deux autres circuits, appelés circuits recyclé (CR) et recyclé/laguné (CRL), sont installés dans une salle voisine. Un schéma général des trois systèmes d'élevage est présenté Figure I.2.

Le circuit ouvert (volume : 5m<sup>3</sup>), est le plus simple : l'eau traverse un filtre à sable, une lampe UV, un échangeur thermique, une colonne de dégazage puis est stockée dans un bac de charge où elle est suroxygénée, avant d'alimenter 2 bassins d'élevage et d'être rejetée à l'égout. Ce circuit est utilisé comme témoin, car il correspond au type d'élevage le plus répandu et le mieux décrit.

Dans le circuit recyclé (volume : 6m<sup>3</sup>) on retrouve les mêmes éléments, mais l'eau en sortie de bassin d'élevage est traitée par une boucle primaire de traitement qui comporte un piège à particules, un filtre mécanique, un filtre biologique, une colonne de dégazage du CO<sub>2</sub> et une pompe qui permet de faire recirculer cette eau traitée dans les bassins d'élevage.

Dans le circuit recyclé/laguné (volume : 18 m<sup>3</sup>) on a les mêmes éléments que dans le circuit recyclé mais une partie de l'eau est traitée dans 2 bassins de lagunage à haut rendement algal, situés à l'extérieur, avant de retourner dans le système d'élevage.



**Figure I.2 : Représentation schématique des systèmes d'élevage ouvert, recyclé et recyclé-laguné**

En salle : 1. bassin d'élevage (×2) ; 2. piège à particule ; 3. filtre mécanique ; 4. bac tampon ; 5. pompe de recirculation ; 6. lampe UV ; 7. filtre biologique ; 8. colonne de dégazage et 9. bac de charge. A l'extérieur : 10. LHRA (×2). Les circuits sont constitués des éléments : 1,6,8 et 9 pour le circuit ouvert ; 1,2,3,4,5,6,7,8 et 9 pour le circuit recyclé et 1,2,3,4,5,6,7,8,9 et 10 pour le circuit recyclé avec lagunage à haut rendement.

### I.3.1.2) Description des éléments des circuits

#### I.3.1.2.1) Les bassins d'élevage

Chaque circuit comporte deux bassins d'élevage d'un volume unitaire de  $2\text{m}^3$ . Le débit d'entrée dans chaque bassin est de  $3\text{m}^3.\text{h}^{-1}$ . Leur forme cylindro-coniques permet de récupérer, par une vanne de sortie, les fécès et l'aliment gaspillé qui sédimentent dans le fond des bassins.

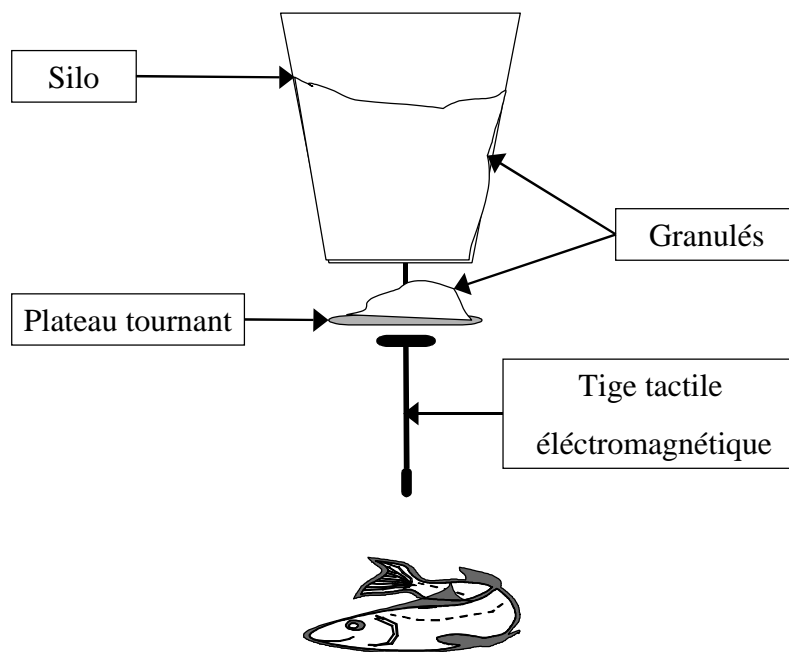
#### I.3.1.2.2) Le système de distribution de l'aliment

Il s'agit d'un système d'auto alimentation dans lequel les poissons doivent manipuler une tige tactile pour libérer une ration de granulés contenus dans un silo (Figure I.3).

La tige tactile est située au dessus du niveau de l'eau pour éviter les contacts involontaires et limiter le gaspillage. Ce système est relié à un ordinateur (HUSKY®) qui comptabilise le nombre de demandes en aliment pour chaque bassin, ce qui permet de mesurer les quantités



d'aliment distribué (AD) en multipliant la ration unitaire libérée par le nombre de contacts enregistré. La ration moyenne de granulé libérée à chaque contact est réglée en fonction du poids moyen et de la biomasse totale de poisson dans les bassins.



**Figure I.3 : Système de distribution de l'aliment**

#### **I.3.1.2.3) La lampe UV**

L'eau des élevages traverse une lampe UV de  $20.10^{-3} \text{J.cm}^{-2}$  afin de détruire les germes qui pourraient être à l'origine de pathologie chez les poissons. Cette lampe se situe entre le filtre à sable et l'échangeur thermique dans le circuit ouvert et entre la pompe de recirculation et le filtre biologique dans les circuits recyclés.

#### **I.3.1.2.4) La colonne de dégazage**

Il s'agit d'un cylindre en PVC rempli d'anneaux de plastique (ETAPAC). L'eau d'élevage qui traverse la colonne à contre courant se retrouve fractionnée et les gaz dissous dans l'eau sont ainsi remis à l'équilibre avec ceux de l'air ambiant. Ceci permet d'éliminer le  $\text{CO}_2$  de l'eau d'élevage et de l'enrichir en oxygène.

#### **I.3.1.2.5) La boucle de suroxygénation**

Elle est située au niveau du bac de charge et elle permet de suroxygéner l'eau avant son entrée dans les bacs d'élevage. Ce système permet de maintenir une concentration en oxygène optimale pour les poissons entre 100-120%. Elle se compose d'une pompe à l'entrée de laquelle est introduite une arrivée d'oxygène pur (AGA®). Le retour de la pompe s'effectue dans le même bassin. La concentration en oxygène peut être réglée en modifiant les débit de la pompe et/ou de la source en oxygène.

#### **1.3.1.2.6) Les pièges à particules**

Ils sont présents dans les circuits recyclés en sortie de bassin d'élevage. Ils permettent de piéger rapidement les gros fécès et l'aliment non ingéré (ANI) par simple sédimentation et ils comportent une vanne de purge.

#### **1.3.1.2.7) Le filtre mécanique**

Un filtre mécanique (Hydrotech 501-1H®) permet d'éliminer en continu les matières en suspension supérieures à 30 µm. Le filtre est nettoyé automatiquement par un jet d'eau douce lorsqu'il est encrassé.

#### **1.3.1.2.8) La pompe de recirculation**

Elle permet de faire circuler l'eau d'élevage, avec un débit de  $10\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$  dans la boucle primaire de traitement des circuits recyclés.

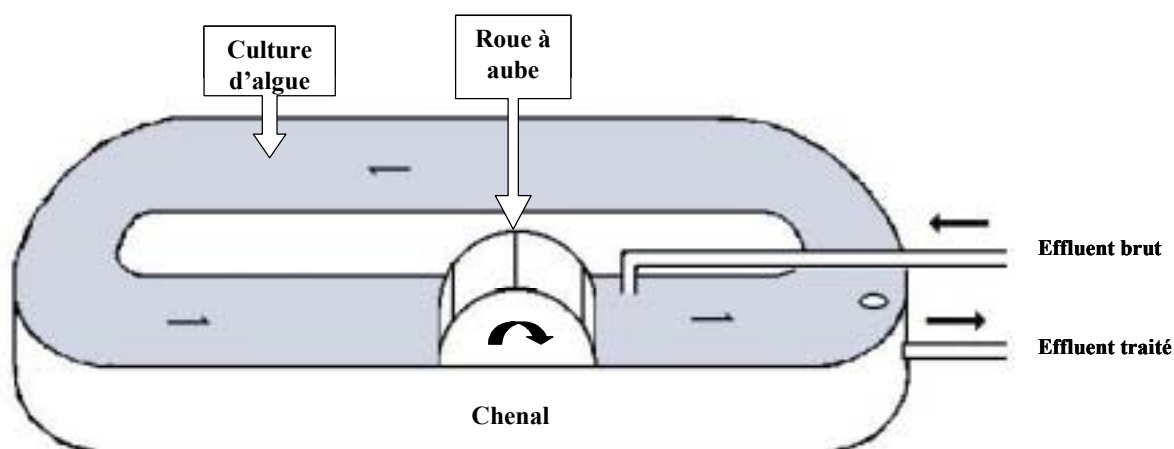
#### **1.3.1.2.9) Le filtre biologique**

Le filtre biologique, d'un volume de  $0,6\text{ m}^3$ , est rempli de garnissage microporeux sur lequel les bactéries peuvent se fixer et se multiplier. Parmi elles, les bactéries nitrifiantes (*Nitrosomonas sp.* et *Nitrobacter sp.*) transforment l'ammoniaque excrété par les poissons (et toxique à faible concentration), en nitrate peu toxique pour les poissons (Hagopian et Riley, 1998). Cette activité bactérienne produit des protons responsable d'une réduction du pH dans le milieu d'élevage.

#### **1.3.1.2.10) Le lagunage à haut rendement algal (LHRA)**

Dans le circuit recyclé-laguné, une partie de l'eau de la boucle primaire est traitée dans deux bassins de lagunage à haut rendement algal (LHRA) situés à l'extérieur, avant de retourner dans le circuit d'élevage.

Les deux LHRA sont identiques et représentés sur la figure I.4. Leurs caractéristiques sont décrites dans le tableau I.2.



**Figure I.4 : Schéma d'un bassin de lagunage à haut rendement algal (LHRA) (d'après Pagand, 1999)**

**Tableau I.2 : Caractéristiques techniques des bassins de lagunage**

Longueur	7,5 m
Largeur	2,5 m
Largeur du chenal	0,8 m
Longueur du chenal linéaire	5,2 m
Surface totale des chenaux	11,8 m <sup>2</sup>
Hauteur d'eau	0,55 mètres
Volume d'eau	5900 litres
Vitesse du courant	15,3 cm. s <sup>-1</sup>
Roue à aube	6 pales en bois
Matériau chenal	Bois résiné

Les deux lagunages sont mis en eau 4 mois avant le début de l'expérimentation avec des effluents issus d'une autre salle d'élevage de bars en circuit recyclé. Les roues à aube sont mises en service et les bassins sont laissés en développement spontané (pas d'ensemencement). Après un bloom de phytoplancton à diatomées (*Nitzschia et Navicula*

majoritairement ) et au bout d'un mois de mise en eau, ce sont majoritairement des macroalgues Chlorophycées (*Ulva*, *Enteromorpha*, *Cladophora*) qui colonisent les bassins.

L'alimentation des bassins de LHRA avec les effluents du circuit recyclé-laguné a lieu 15 jours avant le début de l'expérimentation.

L'effluent qui arrive en entrée des lagunages est prélevé en entrée du filtre biologique afin d'avoir une concentration maximale en ammoniacale. L'eau sort des lagunages par une surverse devant laquelle est placée une maille (100µm) pour maintenir les algues dans le bassin. L'eau en sortie est récoltée dans deux bacs collecteurs de 50 litres, dans lesquels se trouvent des pompes qui renvoient l'eau dans le circuit. Le retour de l'eau traitée a lieu en entrée de filtre mécanique afin d'éliminer les éventuelles particules provenant des LHRA. Les débits d'entrée dans les lagunages sont réglés à l'aide de débitmètres situés dans la salle d'élevage.

#### I.3.1.3) Le maintien du pH, de la température et de l'éclairage dans les circuits

La température, le pH, la concentration en oxygène et la photopériode sont réglés au même niveau optimal pour la croissance du bar dans les trois circuits.

La température de l'eau d'élevage au cours de l'expérimentation est réglé à 22°C. Cette température est maintenue, dans le circuit ouvert, par un échangeur thermique et par une résistance chauffante située dans le bac tampon, dans les deux circuits recyclés.

Le pH de l'eau doit être compris entre 7 et 8 pour une bonne croissance des poissons. Le CO<sub>2</sub> produit au cours de la respiration des poissons et des bactéries du filtre biologique des circuits recyclés fait diminuer le pH. Ainsi, lorsque c'est nécessaire, un ajout de soude (1N) est effectué dans le bac tampon des circuits recyclés. Dans le circuit ouvert, en revanche, le débit d'eau neuve étant élevé dans les bassins d'élevage, le pH est équivalent à celui de l'eau de mer brute.

Les bassins d'élevage sont éclairés automatiquement par une lumière indirecte de 15 lux pendant 16 heures par jour.

#### I.3.1.4) L'eau neuve

L'eau neuve provient d'un pompage en mer, situé à 4,5 m de profondeur en face de la station de Palavas.

Quel que soit le circuit, elle est filtré sur filtre à sable (15  $\mu\text{m}$ ) avant son introduction dans le système d'élevage.

Dans les élevages en salle, où l'atmosphère est très humide (saturé en vapeur d'eau), l'évaporation est considérée comme négligeable et le débit d'effluent rejeté à l'égout est équivalent au débit d'eau de renouvellement.

#### I.3.1.5) Les poissons

Les poissons étudiés sont des bars ou loups, appartenant à la famille des téléostéens et dont la dénomination est le *Dicentrarchus labrax*. Ces poissons ont été élevés dans les circuits expérimentaux, du 26/03/01 au 28/03/02. Leurs caractéristiques principales sont présentées dans le tableau I.3.

**Tableau I.3 : Données biométriques des poissons élevés**

Durée d'élevage (jour)	378
Poids moyen initial (g)	35 $\pm$ 12
Poids moyen final (g)	380 $\pm$ 99
Charge initiale ( $\text{kg.m}^{-3}$ )	10
Charge finale ( $\text{kg.m}^{-3}$ )	85

Ces poissons proviennent d'une ferme d'élevage voisine "Méditerranée Pisciculture", où ils sont élevés en bassin à terre et en circuit ouvert.

La répartition des poissons dans les 6 bassins expérimentaux a été faite de manière aléatoire à partir de tables de nombre, de façon à obtenir une même charge initiale de 10  $\text{kg.m}^{-3}$  dans chaque bassin.

Les poissons se sont acclimatés au système d'alimentation dans les différents circuits et au bout de 15 jours, ils s'auto alimentaient de façon régulière.

#### I.3.1.6) L'aliment

Il s'agit d'un aliment industriel extrudé pour bars à base de farine de poisson.

Etant donné l'évolution des poids individuels des poissons étudiés, nous avons utilisé plusieurs types de granulés de diamètres différents.

La composition moyenne de ces différents aliments était similaire à l'exception des pourcentages en protéines et en matières grasses comme résumé dans le tableau I.4.

**Tableau I.4 : Composition moyenne des aliments utilisés au cours de l'expérimentation**

<b>Composants</b>	<b>% de la matière sèche</b>
Protéines brutes	44 - 52
Phosphore	1.5
Matières grasses brutes	12 - 23
Humidité	10
Cellulose brute	2
Cendres brutes	10

Le détail de chaque type d'aliment utilisé est donné dans le tableau I.5 et leurs fiches techniques sont présentées en annexe I.

**Tableau I.5 : Périodes d'utilisation des différents types d'aliment**

<b>Période</b>	<b>Aliment</b>
Du 27/03/01 au 03/07/01	Néostart 3 <sup>®</sup>
Du 04/07/01 au 15/10/01	Bar D Extra Natura 4 <sup>®</sup>
Du 16/10/01 au 28/03/02	Bar D Extra Natura 5 <sup>®</sup>

### ***1.3.2) Suivi des élevages et paramètres mesurés***

Les paramètres d'élevage ont été fixés pour permettre une croissance optimale des loups et une vérification régulière de leur valeur permet de s'assurer que ces conditions d'élevage sont

similaires dans les trois circuits. Si une valeur s'écarte de la référence fixée, un réglage est fait immédiatement pour conserver les conditions initiales d'élevage.

### I.3.2.1) La température, la salinité, l'oxygène et le pH

Les paramètres mesurés et le matériel utilisé sont détaillés dans le tableau I.6.

**Tableau I.6 : Fréquence, point de prélèvement et matériel de mesure des paramètres de qualité d'eau**

Paramètre	Fréquence	Point de mesure	Matériel	unité
température	tous les jours à 9h00	CR / CRL: bac tampon CO: bassin d'élevage	Thermomètre à alcool	degré celsius
salinité	tous les jours à 9h00	CR / CRL: bac tampon CO: bassin d'élevage	Réfractomètre Atago modèle S-10 <sup>®</sup>	g.l <sup>-1</sup>
pH	2 × par semaine à 9h00	CR / CRL: bac tampon CO: bassin d'élevage	électrode combinée Ag/AgCl ORION <sup>®</sup>	
oxygène	tous les jours à 9h00	bassins d'élevage	oxymètre YSI <sup>®</sup> modèle 51B	mg.l <sup>-1</sup> et % saturation

### I.3.2.2) Les débits circulants

Si nécessaire, les débits sont réajustés quotidiennement à leur valeur théorique (tableau I.7). Les débitmètres sont démontés puis nettoyés une fois par mois en moyenne, pour éviter leur encrassement, ce qui réduirait la précision de la mesure.

**Tableau I.7 : Valeurs théoriques et fréquence de contrôle des différents débits dans les circuits testés**

Débit circulant	Circuit	Valeur théorique	Fréquence
Bassins d'élevage	Tous	3m <sup>3</sup> .h <sup>-1</sup>	Tous les jours à 9h00
Boucles de suroxygénation	Tous	4m <sup>3</sup> .h <sup>-1</sup>	Tous les jours à 9h00
Boucle de recirculation	CR & CRL	10m <sup>3</sup> .h <sup>-1</sup>	Tous les jours à 9h00
Bassins de lagunage	CRL	0,4 à 0,9 m <sup>3</sup> .h <sup>-1</sup>	Tous les jours à 9h00

### I.3.2.3) L'alimentation

#### I.3.2.3.1) L'aliment distribué (AD)

Chaque matin à 9h00, le nombre d'impulsion ( $N_{imp}$ ) par bassin enregistré par l'ordinateur HUSKY, est relevé.

La ration individuelle (RI) libérée à chaque impulsion évolue en fonction du nombre d'individus dans le bassin et de leur poids moyen (Tableau I.8). Le réglage d'une nouvelle ration est effectué selon un calendrier donné par le tableau et à chaque changement d'aliment sur les six bassins. On manipule la tige tactile de chaque distributeur pour récupérer six échantillons qui sont pesés, puis d'après la moyenne de leur poids, un réglage est effectué jusqu'à ce que la ration soit identique pour tous les bassins.

**Tableau I.8 : Calendrier des rations libérées par les distributeurs d'aliment**

<b>Période</b>	<b>Ration par impulsion (g)</b>
Du 27/03/01 au 14/05/01	1.5
Du 15/05/01 au 05/11/01	3
Du 06/11/01 au 09/04/02	5

On calcule pour chaque bassin l'aliment distribué journalier (AD) avec la formule suivante :

$$AD (g.j^{-1}) = RI (g) \times N_{imp}$$

#### I.3.2.3.2) L'aliment non ingéré (ANI)

L'aliment gaspillé par les poissons est récupéré tous les matins dans les caisses collectrices en sortie de bassin d'élevage dans le CO et dans les pièges à particules du CR et du CRL.

Les granulés sont comptés pour chaque bassin, si leur petit nombre le permet, sinon leur volume est mesuré dans une éprouvette de 2 litres. Au préalable, pour chaque type d'aliment, le poids moyen d'un granulé (g) et une courbe poids (g) = f (volume humide, ml) ont été déterminés (Annexe II).



La quantité journalière d'aliment non ingéré (ANI, g) est donc obtenue soit en multipliant le nombre de granulés gaspillés par leur poids moyen, soit directement en reportant le volume obtenu sur la courbe adéquate donnée en annexe II.

### **I.3.2.3.3) L'aliment ingéré (AI)**

L'aliment ingéré par jour (AI, g) pour chaque bassin est déterminé par la formule suivante :

$$AI = AD - ANI$$

### **I.3.2.4) Les apports d'eau neuve dans les circuits**

#### **I.3.2.4.1) Le circuit ouvert**

Le débit d'eau neuve dans le circuit ouvert correspond aux débits d'entrée dans les deux bassins d'élevages c'est à dire  $6 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  ou encore 24 renouvellements par jour de l'eau d'élevage.

#### **I.3.2.4.2) Les circuits recyclés**

Dans les circuits, recyclé et recyclé/laguné, les apports d'eau neuve ( $Q_{EN}, \text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ ) dans les circuits recyclés sont réglés en fonction de l'aliment journalier ingéré (AI,  $\text{g} \cdot \text{j}^{-1}$ ) afin de maintenir un ratio :

$$R = AI / Q_{EN} = 0,4 \text{ kg/m}^3$$

Les apports d'eau douce ( $Q_{ED}, \text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ ) par le rinçage automatique du filtre Hydrotech<sup>®</sup> sont pris en compte pour le calcul des apports d'eau de mer ( $Q_{EM}, \text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ ) à effectuer d'après la formule :

$$Q_{EN} = Q_{ED} + Q_{EM}$$

Deux fois par semaine, le volume d'eau douce consommée par le filtre mécanique (ED,  $\text{l} \cdot \text{j}^{-1}$ ) est relevé. L'eau rejetée à l'extérieur par le filtre est récupérée dans une baille ( $\text{Vol}_{\text{rejetH}}, \text{l}$ ) et la salinité est mesurée dans ce rejet ( $S_{\text{rejetH}}, \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) et dans le circuit (S,  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Le calcul suivant permet de mesurer le débit d'eau douce ( $Q_{ED}, \text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ ) qui entre dans le circuit via le filtre en utilisant la salinité comme marqueur :

$$Q_{ED} = ED / 24 - [(1 - S_{\text{rejetH}} / S) \times \text{Vol}_{\text{rejetH}} / 24]$$

Une fois les apports d'eau douce moyen estimés, les débits d'eau de mer neuve ( $Q_{EM}$ , l.h<sup>-1</sup>) dans les deux circuits recyclés sont réglés deux fois par semaine d'après le calcul suivant :

$$Q_{EM} = (AI / R / 24) - Q_{ED}$$

Tous les matins les apports d'eau de mer neuve (EM, l.j<sup>-1</sup>) sont contrôlés par un relevé de compteur dans chaque circuit recyclé.

### ***1.3.3) Les prélèvements d'eau et les nutriments mesurés***

Des prélèvements d'eau sont réalisés par périodes de 2 mois dans les trois circuits pour l'analyse des nutriments : du 28/03/01 au 28/05/01 ; du 03/07/01 au 30/08/01 ; du 20/10/01 au 19/12/01 et du 28/01/02 au 28/03/02.

Les échantillons sont prélevés, 3 fois par semaine à 9h00, en entrée de filtre biologique pour les circuits recyclés (CR et CRL) et en sortie d'un des deux bassins d'élevage, au hasard, pour le circuit ouvert (CO).

Après le prélèvement, les échantillons sont immédiatement filtrés sur filtre en fibre de verre Whatmann® GF/C et l'analyse est immédiate ou différée. Dans ce dernier cas, les échantillons sont congelés à -4°C jusqu'à l'analyse. La nature des analyses effectuées et les méthodes utilisées sont détaillées dans le tableau I.9.

**Tableau I.9 : Natures et méthodes d'analyse des échantillons d'eau prélevés dans les circuits**

<b>Paramètre</b>	<b>Méthode &amp; Matériel</b>	<b>Références</b>
Ammoniaque (NAT)	Spectrophotométrie au bleu d'indophénol Alliance instruments Evolution II	Solorzano (1969) Norme AFNOR NF T90-015
Nitrites (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	Spectrophotométrie Alliance instruments Evolution II	Bendschneider & Robinson (1952) Norme ISO 6777-1984 (F)
Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Comme les nitrites après réduction sur colonne Cadmium /Cuivre Technicon autoanalyser II	Wood & al (1967)

Phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ )	Spectrophotométrie Alliance instruments Evolution II	Murphy & Riley (1962) Norme AFNOR NF T90-023
--------------------------------------	---	---

L'azote inorganique dissous (NID) correspond à la somme des formes d'azote inorganique mesurées et sa concentration est égale à :

$$[\text{NID}] = [\text{NAT}] + [\text{NO}_2^-] + [\text{NO}_3^-]$$

### ***1.3.4) Les paramètres zootechniques mesurés***

Les paramètres zootechniques suivis pour évaluer l'effet du traitement de l'eau sur les performances biologiques des poissons sont : la mortalité, la croissance et les indices alimentaires.

#### **1.3.4.1) La mortalité**

On calcule une mortalité cumulée à chaque biométrie en ajoutant le nombre de mort dans les bassins depuis la biométrie précédente.

$$\text{MC}_{n+1} = \text{MC}_n + (\text{Nm}_{n+1} / \text{Ni}_n \times 100)$$

avec: MC = mortalité cumulée (%) ; Nm = nombre de morts et Ni= effectif initial de poisson

#### **1.3.4.2) La croissance**

##### **1.3.4.2.1) Le poids moyen (Pm)**

Afin de suivre l'évolution du poids moyen des poissons dans chaque bassin d'élevage, les poids individuels sont déterminés tous les mois au cours d'une biométrie. Pour la population 1, tous les poissons d'un bassin sont pesés pour calculer le poids moyen de ce bassin. En revanche, pour la population 2, étant donné le nombre élevé d'individus par bassin (> 500), le poids moyen est la moyenne des poids individuels d'un échantillon de 40 poissons prélevés au hasard. Par ailleurs tous les poissons sont comptés dans chaque bassin afin d'estimer la biomasse totale.

Les poids individuels sont mesurés de la façon suivante:

- les poissons sont mis à jeun la veille de chaque pesée.
- un anesthésiant, le phénoxy-éthanol, est utilisé à des doses allant de 150 à 300 mg/l pour le stockage et les pesées respectivement.
- un fort bullage en oxygène pur est mis en place pendant toute la durée de la manipulation, de façon à éviter la mort des poissons par asphyxie.

Ces biométries permettent aussi de calculer plusieurs indices de croissance.

#### **I.3.4.2.2) La charge (C)**

Elle correspond à la biomasse de poissons contenue dans chaque bassin, et s'exprime en  $\text{kg.m}^{-3}$ .

$$C = P_m \times N / 1000 \times V_B$$

avec  $V_B$  = volume des bassins d'élevage ( $\text{m}^3$ ); N = nombre de poissons par bassin

#### **I.3.4.2.3) Le taux de croissance spécifique (TCS)**

La croissance est exprimée par le taux de croissance spécifique (TCS) qui correspond à la croissance pondérale moyenne quotidienne des poissons. Il est exprimé en % par jour:

$$\text{TCS} = (\text{Ln } P_{mf} - \text{Ln } P_{mi}) \times 100 / t$$

avec:  $P_{mi}$  = Poids moyen initial (g) ;  $P_{mf}$  = Poids moyen final (g) ; t = durée d'élevage (j).

#### **I.3.4.3) Les indices alimentaires**

Ils permettent de déterminer la prise alimentaire dans chaque bassin et de mesurer « l'efficacité » de l'alimentation pour la croissance. On utilise les données sur la quantité d'aliment consommé et sur la croissance pour calculer ces indices.

##### **I.3.4.3.1) Le taux de nourrissage journalier (TNJ)**

Il exprime le rapport dans chaque bassin entre l'aliment ingéré par les poissons et leur biomasse et se calcule par la formule suivante :

$$\text{TNJ } (\%.j^{-1}) = \text{AI} / t \times [ (P_{mi} \times N_i) + (P_{mf} \times N_f) / 2 ] \times 100$$

avec: AI = Aliment Ingéré (g) ; Pmi & Pmf = poids moyen initial et final des poissons (g) ; Ni & Nf = nombre de poisson initial et final ; t =durée d'élevage (j)

#### **I.3.4.3.3) L'indice de conversion alimentaire (IC)**

Il permet de connaître le taux de transformation de l'aliment par les poissons. On le calcule à partir du poids d'aliment ingéré et du gain de biomasse des poissons

$$IC = (AI) \times t / [(Pm_f * N_f) - (Pm_i * N_i)]$$

#### ***I.3.3) L'analyse statistique des résultats***

Les poids moyens des poissons pour chaque bassin à chaque biométrie sont décrits par une moyenne et un écart type. Les 2 bassins d'un même circuit sont considérés comme des duplicata d'un type de traitement de l'eau. Ces résultats sont analysés par une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) avec le bassin (1 et 2) et le circuit (CO, CR et CRL) comme facteurs.

Les concentrations en nutriments dans l'eau des circuits sont analysées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA). Si la distribution normale des variables ou l'égalité des variances ne sont pas vérifiées au risque  $\alpha=5\%$ , les valeurs sont normalisées par une transformation log ou ln.

Si l'ANOVA montre une différence significative au risque  $\alpha=5\%$  ( $p<0,05$ ), les groupes sont comparés entre eux par un test de Newman Keuls (NK test) au risque  $\alpha=5\%$ .

Si les variances ne sont toujours pas homogènes ou si les résidus n'ont pas une distribution normale, malgré la transformation, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW test) est effectué et les groupes sont comparés entre eux par un test de Dunn's au risque  $\alpha=5\%$ .

Les coefficients de corrélations entre différents paramètres ont été mesurés avec un test de Spearman.

## I.4) Résultats

### I.4.1) Les apports d'eau neuve

#### I.4.1.1) Le taux de renouvellement de l'eau neuve en fonction de la biomasse

Afin de pouvoir comparer les apports d'eau neuve dans les différents circuits et leur évolution au cours des expérimentations, on a calculé un taux de renouvellement d'eau neuve journalier en fonction de la biomasse de poisson dans les bassins, exprimé en litre par kilo de poisson frais par heure ( $l.kg^{-1}.PF.h^{-1}$ ).

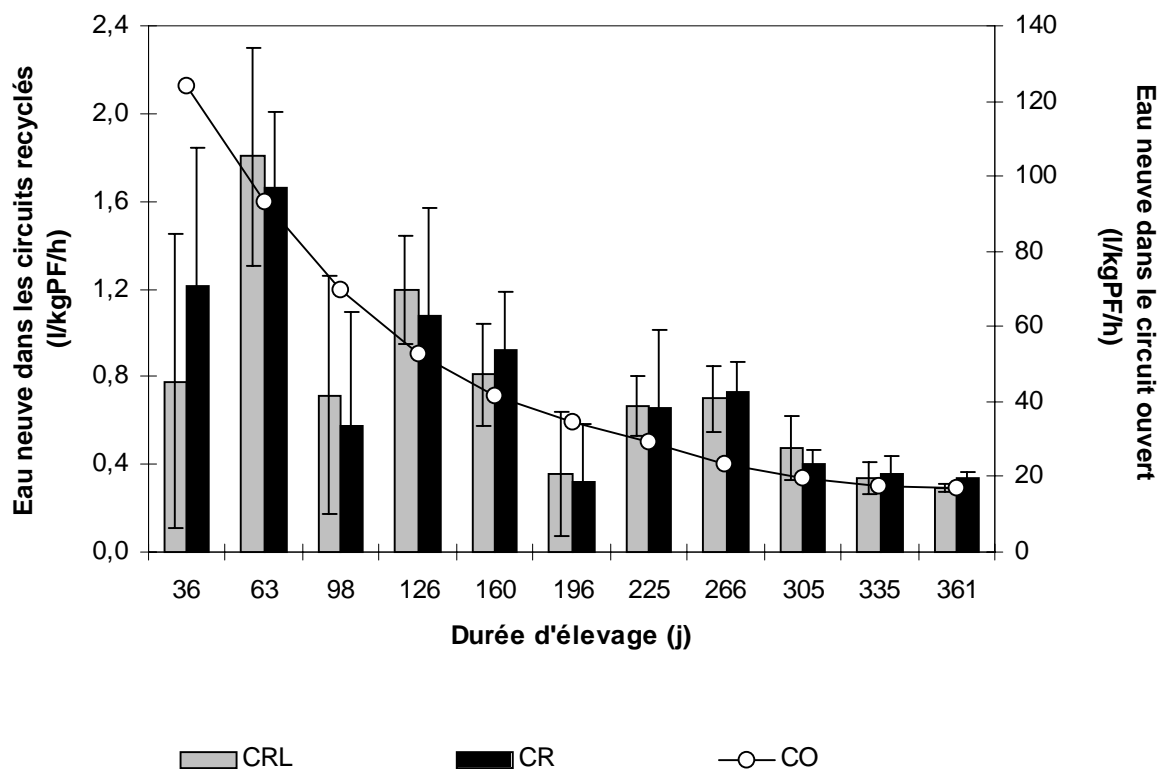


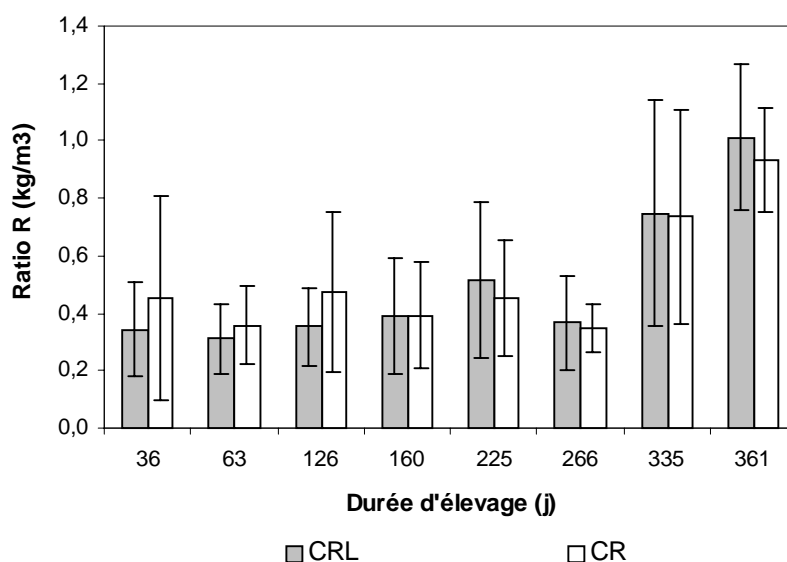
Figure I.5 : Taux de renouvellement de l'eau neuve en fonction de la biomasse dans les bassins des circuits d'élevage

Les apports d'eau neuve ont diminué dans les trois circuits au fur et à mesure que la biomasse a augmenté dans les bassins (Fig. I.5). Toutefois, dans les circuits recyclés, le maintien d'un ratio R constant donc d'un même apport d'eau en fonction de l'aliment ingéré, a permis de maintenir un taux de renouvellement de l'eau neuve entre  $2,5 \text{ l.kg}^{-1}.\text{PF.h}^{-1}$  et  $0,2 \text{ l.kg}^{-1}.\text{PF.h}^{-1}$ . Ce n'est pas le cas dans le circuit ouvert où le maintien d'un débit constant d'eau neuve au cours de l'expérimentation a fait évoluer le taux de renouvellement de l'eau neuve avec la biomasse dans les bassins avec des valeurs comprises entre  $125 \text{ l.kg}^{-1}.\text{PF.h}^{-1}$  en début d'expérience et  $17 \text{ l.kg}^{-1}.\text{PF.h}^{-1}$  à la fin.

En moyenne sur l'année, le taux de renouvellement de l'eau neuve dans le circuit ouvert a été 63 fois plus important que dans les deux circuits recyclés.

#### I.4.1.2) Le ratio R dans les circuits recyclés

Le ratio R qui représente le degré de fermeture des circuits recyclés a été maintenu à peu près constant au cours de l'expérimentation sauf les deux derniers mois, lorsque les charges étaient fortes dans les bassins, il a été plus élevé (Fig.I.6).



**Figure I.6 : Ratio R de fermeture dans les élevages en circuits recyclés**

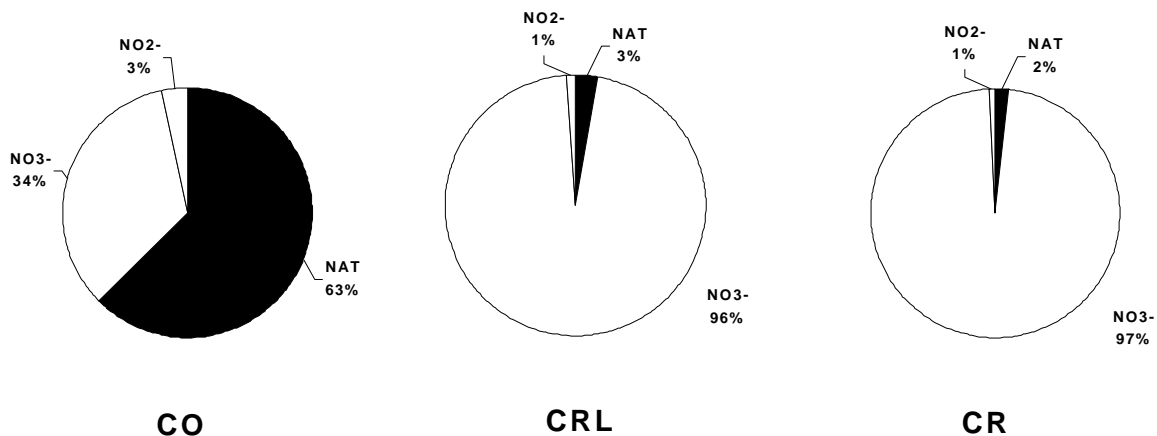
On vérifie statistiquement qu'il n'y a pas de différence entre les ratio des deux circuits recyclés pendant l'expérimentation (KW,  $p=0,56$ ) ce qui nous permet, par la suite, de comparer leurs concentrations en nutriments.

## 1.4.2) Les analyses de nutriments

Lors de la dernière campagne de prélèvement dans les circuits (du 28/10/02 au 28/03/02) seul un échantillon par semaine a pu être analysé au lieu de 3 précédemment.

### 1.4.2.1) Les concentrations en azote inorganique dissous

La proportion des différentes formes de NID dans l'effluent d'élevage dépend du type de circuit (Fig.I.7). Dans le circuit ouvert, c'est le NAT qui est la forme majoritaire du NID avec une proportion annuelle de 63% en moyenne sur l'année puis ce sont les nitrates avec 34% et enfin les nitrites qui ne représentent que 3% du NID total. En revanche, dans le CR le NID est presque totalement sous forme de nitrates (96%) alors que le NAT et les nitrites sont très minoritaires (3% et 1% respectivement). Le traitement par LHRA ne modifie pas les proportions des formes de NID de l'effluent d'élevage du CRL qui sont similaires à celles du CR.



**Figure I.7: Proportion des formes de l'azote inorganique dissous dans l'effluent des circuits ouvert (CO), recyclé (CR) et recyclé-laguné (CRL)**

Les concentrations moyennes mensuelles de l'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ), des nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) et de l'azote inorganique dissous (NID) mesurées dans tous les circuits sont exprimées en quantité d'azote ( $\text{mgN.l}^{-1}$ ) et sont représentées par la figure I.8.



La concentration en NAT est significativement plus faible dans le CO tout au long de l'année (NK test,  $p < 0,05$ ) bien qu'elle augmente lorsque la charge des poissons augmente et qu'elle dépasse les concentrations dans les circuits recyclés à partir du 335<sup>ème</sup> jour d'élevage et atteint  $0,48 \pm 0,17 \text{ mg.l}^{-1}$  à la fin de l'expérience. Dans les circuits recyclés, les concentrations en NAT ne sont pas différentes (ANOVA,  $p = 0,06$ ) et ne sont pas influencées par le ratio R. En ce qui concerne la forme non ionisée de l'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) son niveau annuel est plus élevée dans le CO (Dunn's,  $p < 0,05$ ). En fin d'expérience la valeur moyenne atteint  $0,025 \text{ mg.l}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_3$  avec un coefficient de variation important ( $\text{CV} = 40\%$ ). Le  $\text{NH}_3$  est significativement plus élevé dans le CRL par rapport au CR (KW,  $p < 0,001$ ).

La concentration des nitrites dans le CO est restée inférieure à celle des circuits recyclés tout au long de l'élevage (Dunn's,  $p < 0,05$ ). Dans les deux circuits recyclés la concentration des nitrites n'est pas différente (ANOVA,  $p = 0,32$ ), elle ne dépend pas du ratio R et elle montre des coefficients de variation importants.

La concentration des nitrates reste faible dans le CO et elle est très inférieure à celle mesurée dans les circuits recyclés (Dunn's,  $p < 0,05$ ). Les nitrates sont corrélés au ratio R dans le CR (Spearman,  $r = 0,29$ ,  $P = 0,02$ ) mais pas dans le CRL (Spearman,  $r = 0,06$ ,  $p = 0,64$ ). En effet, le traitement par les LHRA produit une baisse significative des nitrates dans le CRL par rapport au CR (KW,  $p < 0,001$ ). Cette épuration des nitrates est responsable d'une diminution significative de NID dans le CRL (KW,  $p < 0,001$ ), dont la concentration n'est pas corrélée au ratio R, alors que c'est le cas dans le CR (Spearman,  $r = 0,28$ ,  $p = 0,02$ ). Le modèle de Léonard (2000) surestime les concentrations en NID dans les circuits recyclés mais il permet d'expliquer 86% des variations dans le CR et seulement 55% dans le CRL. Dans le CO, le NID reste très faible toute l'année par rapport aux concentrations mesurées dans les circuits recyclés (Dunn's,  $p < 0,05$ ).

#### 1.4.2.2) Concentration en phosphates

Les concentrations moyennes mensuelles des phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) mesurées dans tous les circuits sont exprimées en quantité de phosphore ( $\text{mgP.l}^{-1}$ ) et sont représentées par la figure I.8. Comme pour le NID, la plus faible concentration en phosphates tout au long de l'année se retrouve dans l'effluent du circuit ouvert (Dunn's,  $p < 0,05$ ). En revanche, les phosphates s'accumulent dans les circuits recyclés et leurs concentrations sont en moyenne 100 fois plus fortes que dans le CO.

Leurs valeurs se situent de part et d'autres du modèle de Léonard (2000) qui permet d'expliquer 83% de la variation dans le CR et 63% dans le CRL. Pourtant les phosphates ne sont corrélées avec le ratio R, ni dans le CR (Spearman ;  $r=0,16$  ;  $p=0,20$ ) ni dans le CRL (Spearman ;  $r=0,04$  ;  $p=0,78$ ).

Il n'y a pas de diminution significative des phosphates par le LHRA (KW,  $p=0,95$ ). même si la moyenne annuelle des phosphates est abaissée de 4% dans le CRL par rapport au CR.

### ***1.4.3) Les paramètres d'élevage***

Les évolutions de la température, de la salinité, du pH et de la concentration en oxygène dans les élevages sont représentées par la figure I.9.

Le pH et la concentration en oxygène dissous ont été maintenu proche de la valeur théorique dans les différents circuits au cours de cette expérience. Il faut noter que la concentration en oxygène dissous est un paramètre qui varie beaucoup en fonction de l'alimentation et du métabolisme des poissons et qu'il a fallu le réajuster quotidiennement pour le maintenir dans une gamme de valeur satisfaisante. L'ajout ponctuel de soude (1N), pour maintenir un bon niveau de pH dans les circuits recyclés, a augmenté avec la charge de poissons et il a été plus fréquent dans le circuit recyclé que dans le circuit recyclé-laguné.

La température a été bien contrôlée pendant la saison froide grâce aux systèmes de chauffage de l'eau mis en place dans les différents systèmes. Par contre, pendant la période estivale (de juin à septembre 2001), la chaleur extérieure a provoqué l'élévation progressive de la température de l'eau dans les circuits recyclé et recyclé-laguné avec une moyenne maximale de 26,5°C dans le circuit recyclé.

La salinité est le paramètre qui a été la moins bien contrôlée au cours de cette expérience. Ce sont les apports d'eau douce du filtre mécanique qui ont entraîné une baisse progressive de la salinité dans les circuits recyclés. Un meilleur réglage de la fonction de rinçage des filtres a permis de limiter ce phénomène au cours de l'expérience. En revanche, l'évolution de la salinité dans le circuit ouvert est liée aux modifications saisonnières du milieu naturel dans lequel l'eau neuve est prélevée. Il faut noter que, à l'exception des 17 g.l<sup>-1</sup> dans le circuit recyclé-laguné au cours du premier mois d'expérimentation, les salinités dans les différents circuits ont été comprises entre 23 et 40 g.l<sup>-1</sup>.

1.

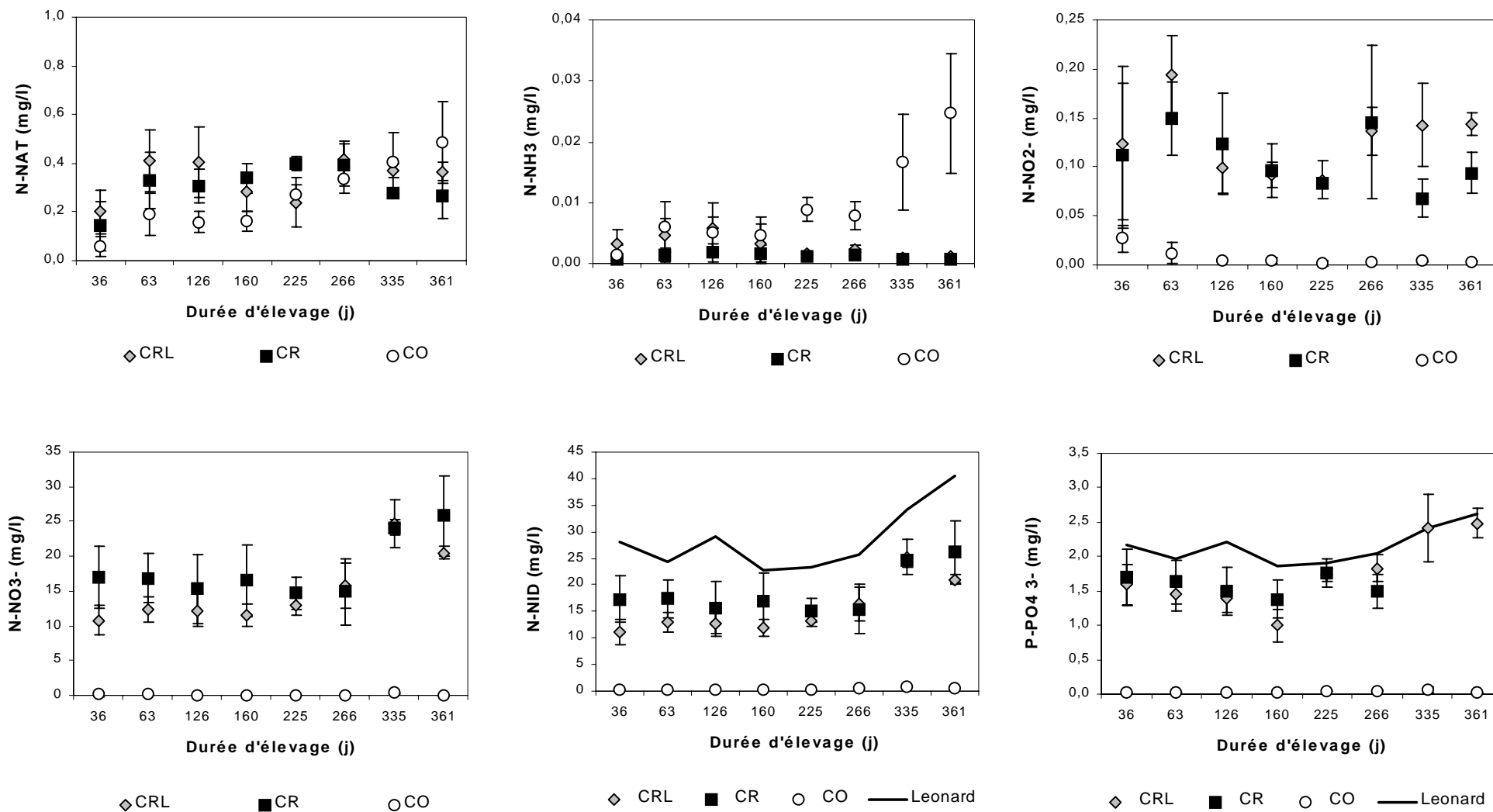


Figure I.8 : Concentrations des différentes formes de l'azote inorganique dissous et des phosphates dans les effluents d'élevage

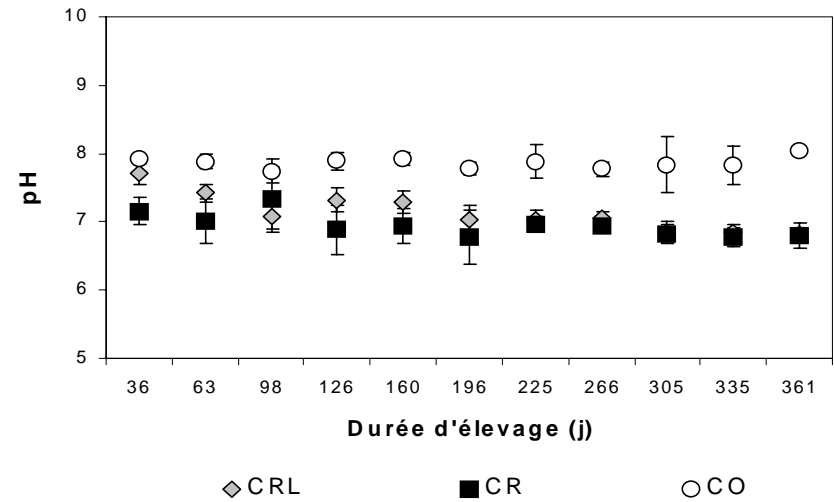
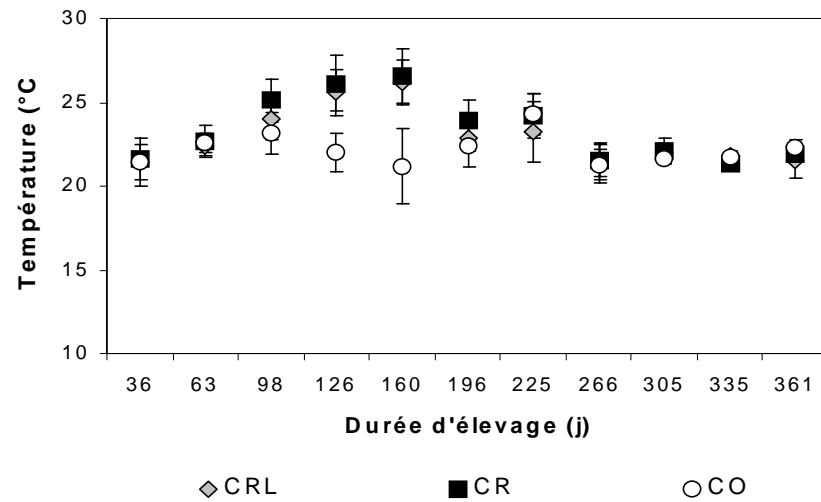
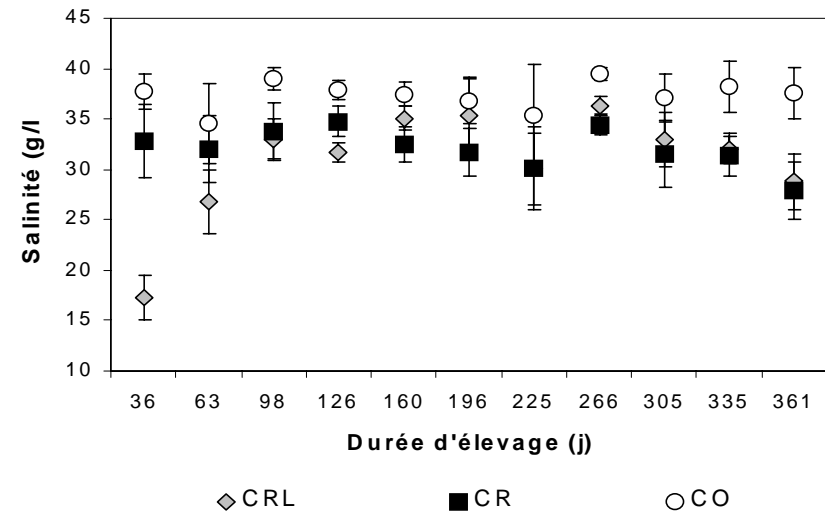
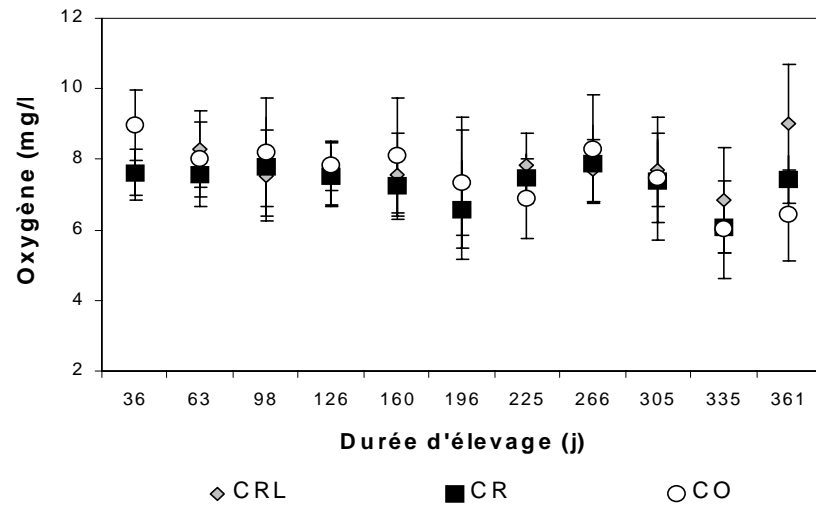
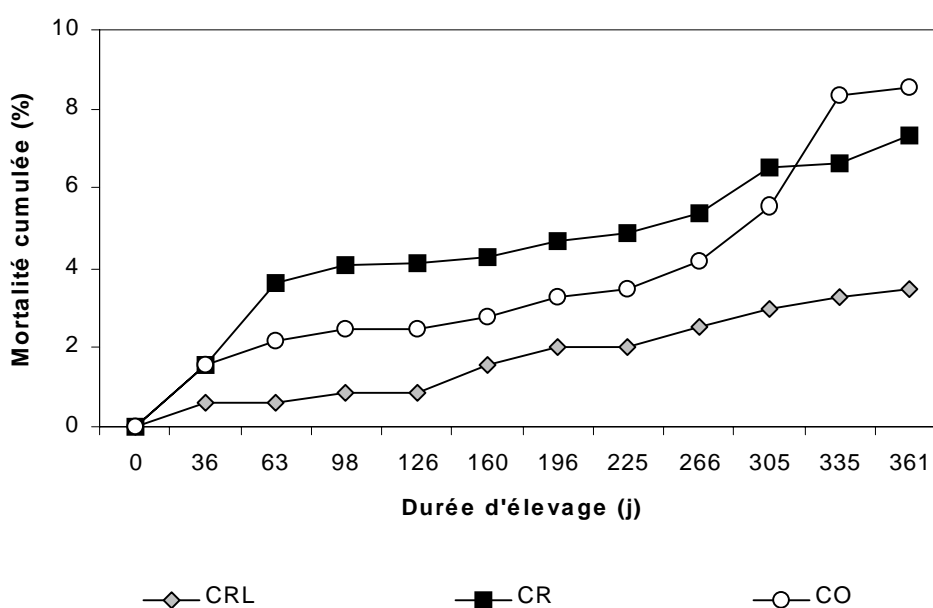


Figure I.9 : Concentration en oxygène, salinité, température et pH dans les circuits d'élevage



#### ***1.4.4) Mortalité poisson***

La mortalité des poissons a été très faible dans les trois circuits. La mortalité cumulée est inférieure à 10% au bout d'un an (Fig.I.10). Aucune pathologie n'a été observée au cours des expérimentations et aucun traitement n'a été utilisé. La mortalité est due principalement à du cannibalisme pour les petits poissons en début d'expérience et à des échappements de bassins lorsque les poissons sont devenus plus gros.



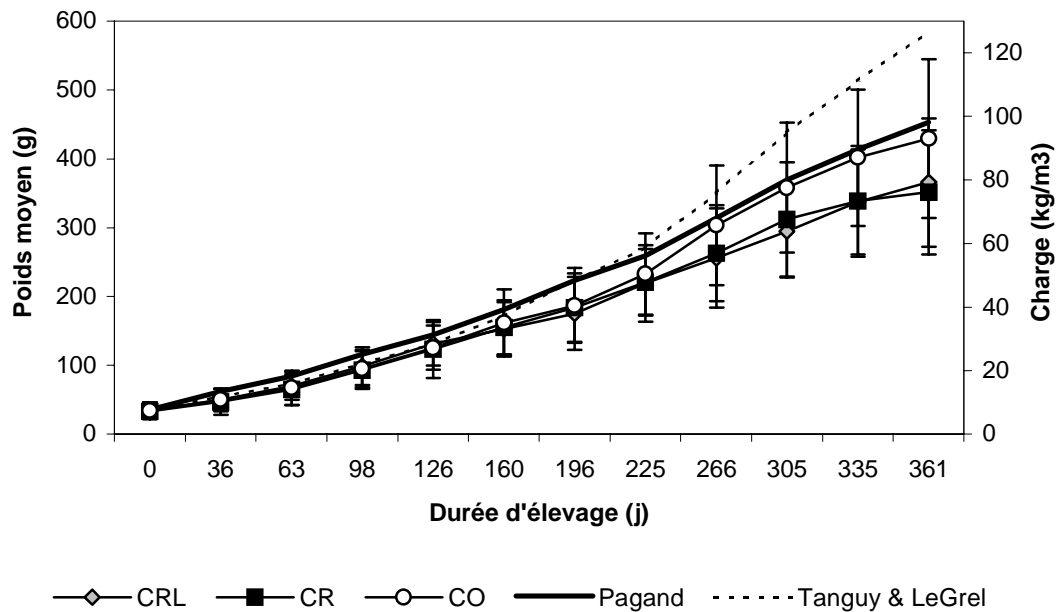
**Figure I.10 : Mortalité cumulée des poissons dans les circuits d'élevage**

#### ***1.4.5) Croissance poisson***

L'ANOVA 2 facteurs n'ayant pas montré de différence significative entre les deux bassins d'un même circuit leurs valeurs ont été groupées par circuit.

##### ***1.4.5.1) Poids moyen et charge***

L'évolution des poids moyens et de la charge dans les circuits sont représentés figure I.11.



**Figure I.11 : Poids moyens et charges de poisson dans les circuits d'élevage**

Les poids moyens ne sont pas significativement différents dans les trois circuits jusqu'au 266<sup>ème</sup> jour d'élevage, pour des poids moyens compris entre 35 et 220 gr et des charges comprises entre 10 et 55 kg.m<sup>-3</sup> en moyenne, à l'exception du poids moyen des poissons du CRL qui est significativement plus important pendant le mois d'août (NK test, p<0,05). Cet avantage n'est pas très élevé (6 et 4% par rapport au CR et au CO, respectivement) et disparaît après cette période.

Au bout de 266 jours d'élevage, la croissance des poissons est significativement meilleure dans le CO (NK test, p<0,05) avec un poids moyen de 13% et 16% supérieur à celui des poissons du circuit recyclé et recyclé-laguné, respectivement. Cette tendance se maintient jusqu'à la fin de l'expérimentation. Après plus d'un an d'élevage, le poids moyen dans le CO est supérieur de 18 % à celui du CR et de 15% à celui du CRL. Les charges finales sont de 79 kg.m<sup>-3</sup>, 81 kg.m<sup>-3</sup> et 92 kg.m<sup>-3</sup> dans le CR, le CRL et le CO respectivement.

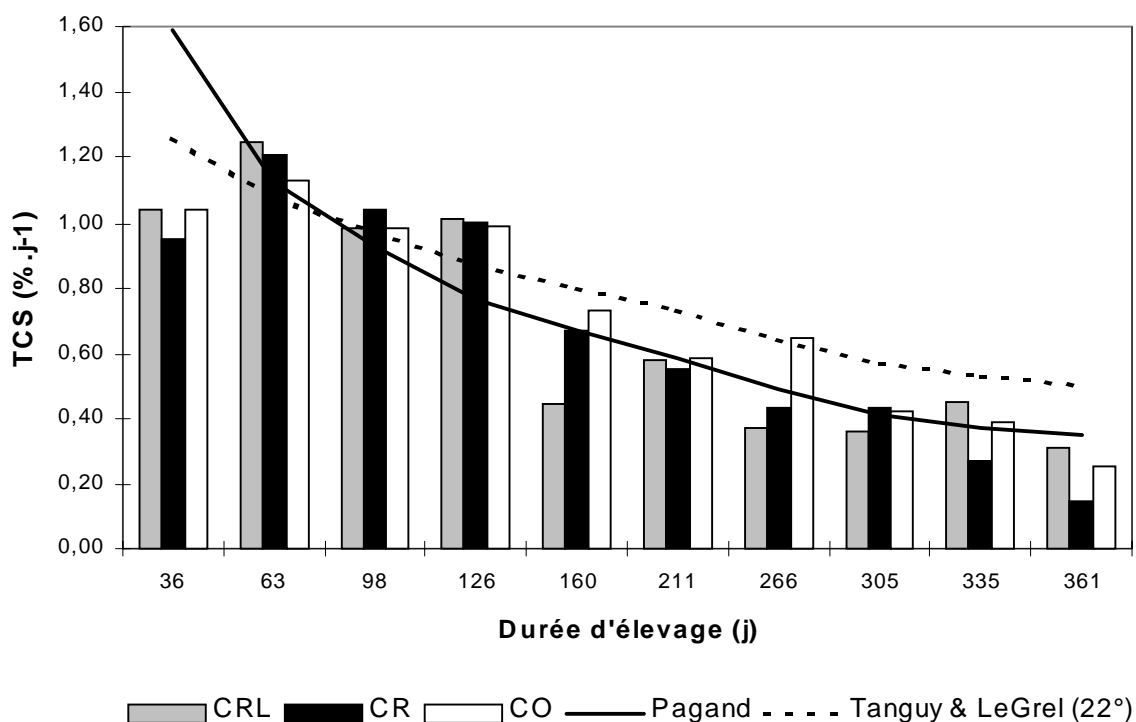
Il faut noter que le ralentissement de croissance observé le 196<sup>ème</sup> jour d'élevage dans les trois circuits est à mettre en relation avec l'arrêt de l'alimentation à volonté des poissons et la mise à leur disposition d'une ration égale nécessitée par le protocole d'un autre thésard travaillant sur les mêmes circuits. Le mois suivant, on peut voir que les poissons ont récupéré ce retard de croissance en proportion du ralentissement subi.

Si on compare nos résultats aux valeurs calculées par les modèles, on remarque que le modèle de Tanguy & Le Grel à 22°C simule correctement la croissance dans tous nos circuits jusqu'à un poids moyen 130 g et une charge de 30 kg.m<sup>-3</sup> environ puis il la surestime de plus en plus

jusqu'à la fin de l'expérience. Le modèle de Pagand permet de simuler la croissance dans tous les circuits jusqu'à un poids moyen de 150 g et une charge de 40 kg.m<sup>-3</sup> environ puis il surestime la croissance dans nos circuits sauf dans le CO pour lequel il simule convenablement la croissance jusqu'à la fin de l'expérience.

#### I.4.5.2) Taux de croissance spécifique

Afin d'analyser l'évolution des taux de croissance dans le temps dans les différents circuits sans tenir compte du ralentissement puis de la reprise de croissance en octobre et novembre 2001, un taux de croissance moyen est calculé entre ces deux dates correspondant à 211 jours d'élevage. La figure I.12 montre l'évolution de ces taux de croissance dans les trois circuits.



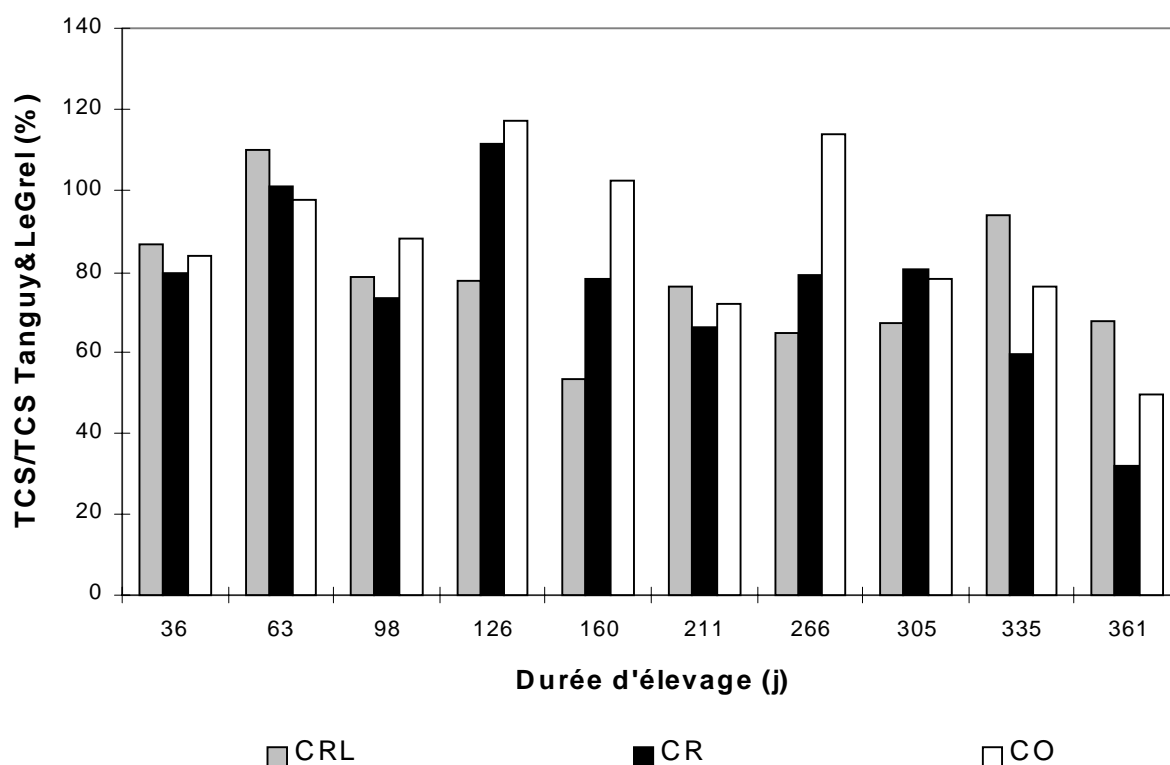
**Figure I.12 : Evolution du taux de croissance des poissons dans les élevages**

Le taux de croissance est globalement identique dans tous les circuits d'élevage jusqu'au 266<sup>ème</sup> jour à l'exception du 160<sup>ème</sup> jour où il diminue fortement dans le CRL. Le 266<sup>ème</sup> jour d'élevage, le taux de croissance est plus fort dans le CO puis il revient à la même valeur que dans les deux autres circuits. En revanche, dans le CR, le taux de croissance a tendance à être plus faible que dans les deux autres circuits les deux derniers mois de l'expérience. Le taux de croissance diminue avec la durée d'élevage dans tous les circuits.



Si on compare les taux de croissance dans les circuits avec ceux des modèles, on peut dire qu'ils suivent, globalement, le modèle de Tanguy & Le Grel à 22°C jusqu'au 160<sup>ème</sup> jour pour le CR et le CRL et jusqu'au 305<sup>ème</sup> jour pour le CO. Ensuite, ils suivent globalement le modèle de Pagand. En fin d'expérimentation, le taux de croissance se dégrade plus vite dans le CR et dans CO que dans le CRL.

Afin de tenir compte de l'évolution des températures de l'eau d'élevage, la figure I.13 montre le rapport entre le taux de croissance dans les circuits et la valeur simulée par le modèle de Tanguy & Le Grel en tenant compte des variations de température mesurées dans chaque circuit.



**Figure I.13 : Comparaison du taux de croissance des poissons dans les élevages avec ceux simulés par le modèle de Tanguy & Le Grel**

La prise en compte des variations de la température de l'eau dans les circuits, par le modèle de Tanguy & Le Grel, ne modifie pas globalement le rapport entre nos résultats et les valeurs simulées du taux de croissance.

#### I.4.6) Alimentation poisson

L'ANOVA 2 facteurs n'ayant pas montré de différence significative entre les deux bassins d'un même circuit leurs valeurs ont été groupées par circuit.

##### I.4.6.1) Le taux de nourrissage journalier

Afin d'analyser l'évolution de l'alimentation des poissons dans le temps dans les différents circuits sans tenir compte du rationnement de l'aliment en octobre puis de la compensation de ce rationnement en novembre 2001, des indices moyens sont calculés entre ces deux dates correspondant à 211 jours d'élevage.

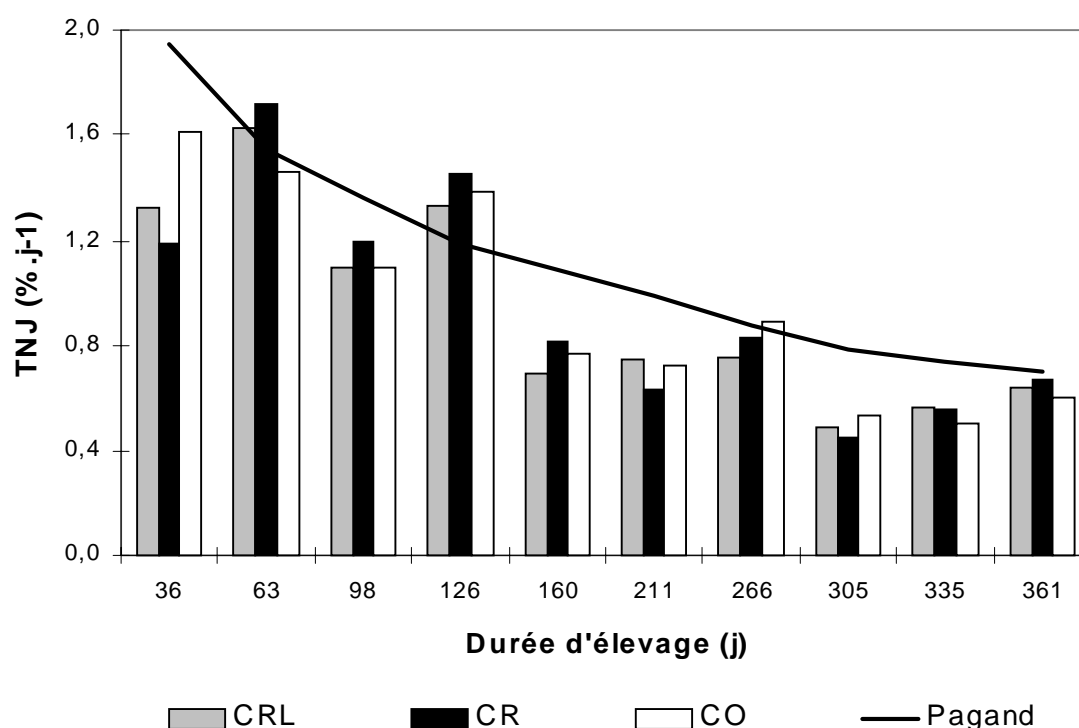


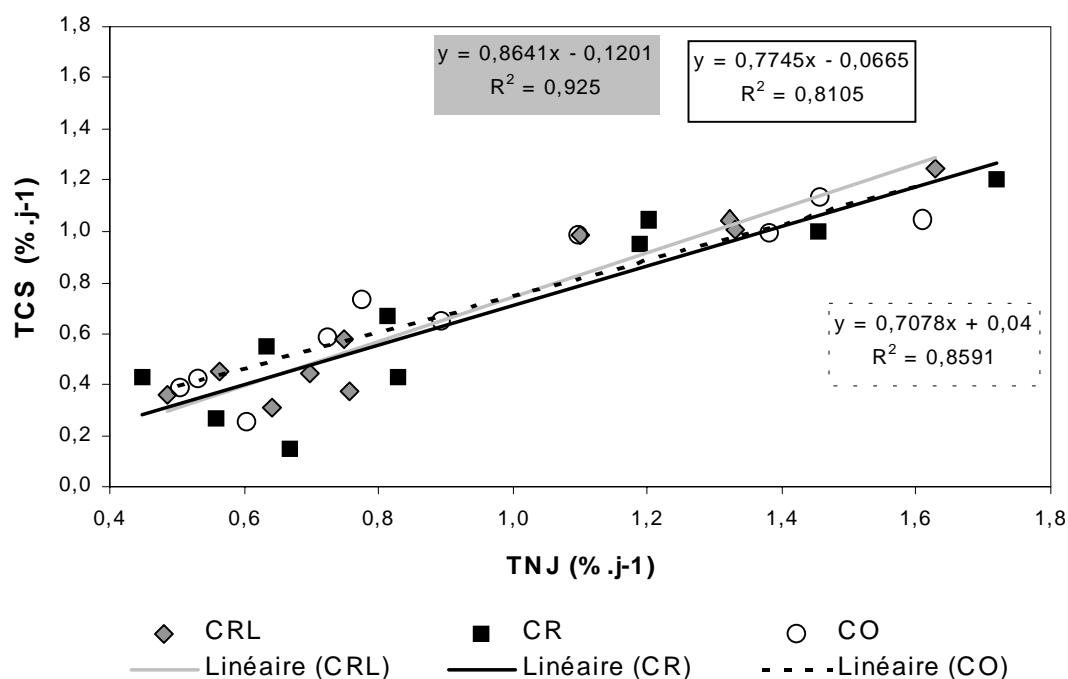
Figure I.14: Evolution du taux de nourrissage des poissons dans les circuits

Il n'y a pas de différence statistique des taux de nourrissage (ANOVA,  $p=0,98$ ) entre les circuits ouvert, recyclé et recyclé-laguné.

Le taux de nourrissage est similaire dans les trois circuits sauf le premier mois où il est plus élevé dans le circuit ouvert par rapport aux autres circuits d'élevage (Fig.I.14). Il diminue avec la durée d'élevage dans tous les circuits, pas régulièrement comme dans le modèle de

Pagand, mais par pallier tous les trois mois. Si le taux de nourrissage est parfois simulé correctement par le modèle de Pagand, la plupart du temps il lui est inférieur dans tous les circuits.

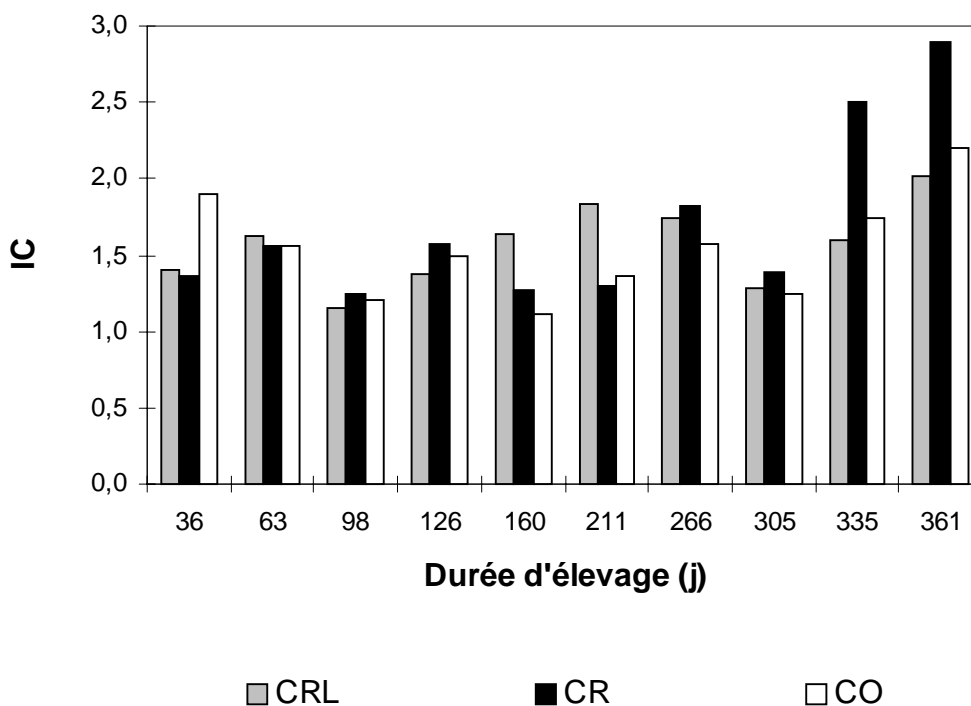
Si on compare le taux de nourrissage des poissons avec leur taux de croissance spécifique, on s'aperçoit qu'il existe des relations linéaires entre ces deux paramètres pour chaque circuit et qu'elles permettent d'expliquer 93%, 81% et 86% de la variation du taux de croissance spécifique dans le circuit recyclé-laguné, recyclé et ouvert, respectivement (Fig I.15).



**Figure I.15 : Taux de croissance des poissons en fonction de leur taux de nourrissage**

#### I.4.6.2) L'indice de conversion

Il n'y a pas de différence statistique entre les indices de conversion des différents circuits (ANOVA,  $p=0,64$ ). L'indice de conversion moyen au cours de cette expérimentation est égal à  $1,5 \pm 0,3$  pour le circuit ouvert,  $1,7 \pm 0,6$  pour le circuit recyclé et  $1,6 \pm 0,3$  pour le circuit recyclé-laguné (Fig.I.16).



**Figure I.16 : Evolution de l'indice de conversion des poissons dans les circuits**

## **I.5) Discussion**

### ***I.5.1) Influence du traitement sur les performances des poissons***

Nous avons mesuré la mortalité, l'alimentation et la croissance de bars élevés pendant un an dans trois types d'élevage. Un des objectifs était d'évaluer l'utilisation de l'eau traitée par LHRA sur les performances des poissons d'un circuit recyclé.

#### **I.5.1.1) Le LHRA en circuit recyclé**

Nous avons observé une amélioration de la survie des poissons dans le CRL de l'ordre de 5 % par rapport aux deux autres circuits. Ce résultat est à mettre en relation avec les travaux de Cahu et al (1998) qui ont montré que la survie des larves de bars était augmentée de 26 % lorsque l'on ajoute des algues unicellulaires à l'eau d'élevage. Il confirme également l'étude de Pagand (2000b) qui n'avait pas observé de développement d'algues toxiques pour les

poissons dans le LHRA. L'étude des communautés phytoplanctoniques, zooplanctoniques et macroalgales présentes dans les LHRA a permis d'identifier des espèces naturellement présentes dans les milieux eutrophisés comme les lagunes (Deddouche, 2001).

La croissance des poissons n'est pas non plus modifiée par le LHRA sauf le 166<sup>ème</sup> jour d'élevage où le poids moyen des poissons dans le CRL est supérieur à celui des deux autres circuits. Ce gain de poids est dû à un meilleur taux de croissance mesuré le 63<sup>ème</sup> jour. Il dépasse de 10% les prévisions du modèle de Tanguy&LeGrel en cage immergée. Cette croissance est associée à une augmentation du taux de nourrissage et à un meilleur indice de conversion que dans les autres circuits. La salinité plus faible (<20 g/l) mesurée dans le CRL en début d'expérimentation pourrait être à l'origine d'un abaissement du métabolisme standard des poissons et aboutir à cette meilleure croissance (Claireaux et Lagardère, 1999). Une autre hypothèse est liée à la présence des LHRA dans lesquels la photosynthèse est augmentée brutalement à cette période de l'année (fin mai 2002). Fillit (1995) a montré que l'augmentation de la photopériode et de la température après la saison hivernale provoque une augmentation intense de l'activité photosynthétique d'ulves issus des lagunes languedociennes et nous avons observé une augmentation importante de la croissance des algues dans les LHRA pendant les 15 jours précédents la biométrie des poissons. L'amélioration du poids serait alors liée à l'absorption ou à la sécrétion par les algues de facteurs défavorables ou favorables, respectivement, à la croissance des poissons. C'est le cas, par exemple, pour certaines microalgues (*Isochrysis galbana*) qui lorsqu'elles sont ajoutées au milieu d'élevage de larves de bars provoque une augmentation de 40 % de leur poids grâce à une stimulation de leur production d'enzymes digestives pancréatiques et intestinales (Cahu et al, 1998).

Cette amélioration du poids moyen disparaît le mois suivant et la courbe de croissance des poissons du CRL rejoint celle des poissons dans les deux autres circuits.

#### 1.5.1.2) La boucle de recirculation

La croissance des poissons dans le circuit ouvert est identique à celle des circuits recyclés jusqu'au 266<sup>ème</sup> jour d'élevage puis leur poids moyen est supérieur jusqu'à la fin de l'expérience. Cette différence est due à un meilleur taux de croissance des poissons alors qu'ils avaient un poids moyen compris entre 150 et 200 g.

Clairaux et Lagardère (1999) ont démontré que le métabolisme standard des bars était identique pour une température comprise entre 20 et 25°C ainsi que pour une salinité de 20 à

35 g/l et qu'il n'y a pas de différence de croissance pour ces valeurs. Pendant l'été la température est montée jusqu'à 29 °C dans le circuit recyclé et la moyenne dans les deux circuits recyclés a dépassé les 25 °C entre le 98<sup>ème</sup> et le 160<sup>ème</sup> jour d'élevage. Nous ne disposons pas de données sur la croissance des bars à ces températures mais l'absence d'effet à 25 °C (la plus forte température testée) et la baisse de croissance qui apparaît plus de 100 jours après l'élévation des températures rend peu probable l'hypothèse d'un ralentissement de croissance lié à la température. Il en est de même pour la salinité dont la seule valeur inférieure à 20 g/l apparaît dans le circuit recyclé-laguné le premier mois de l'élevage ce qui ne permet pas d'expliquer un ralentissement de croissance, 8 mois après, dans les deux circuits recyclés. Les valeurs du pH sont restées dans les limites de 6,1-8 établies par Lemarié et al (2000) pour une absence d'effet sur la croissance des bars et la concentration en oxygène a été maintenue à un niveau satisfaisants (> 6 mg/l) pour la croissance (Lacut, 1999) dans les trois circuits sauf dans le circuit ouvert les deux derniers mois.

Le meilleur taux de croissance mesuré dans le circuit ouvert est associé à une augmentation de la prise alimentaire et à un indice de conversion plus faible. Parmi les facteurs qui peuvent limiter le taux de croissance et le taux de nourrissage dans les circuits recyclés, l'accumulation d'une substance toxique est une hypothèse majeure.

Lemarié et Toften (2002) ont montré que l'accumulation de produits d'excrétion liée à la diminution du taux de renouvellement de l'eau dans un circuit ouvert est responsable d'une diminution du taux de nourrissage et de la croissance des bars. Ils ont démontré que cette baisse de croissance est provoquée par un ensemble de facteurs mais que le dioxyde de carbone apparaît comme le facteur majeur d'une diminution des performances lorsque l'oxygène n'est pas limitant. Dans les circuits recyclés, la concentration en dioxyde de carbone ne dépend pas du taux de renouvellement de l'eau neuve mais de la colonne de dégazage. Il est possible que les capacités d'extraction du CO<sub>2</sub> par les colonnes de dégazage ai été insuffisantes à partir d'une charge de poisson de 50 kg/m<sup>3</sup> dans les élevages. Cette hypothèse est renforcée par l'observation au cours des biométries des derniers mois d'un comportement léthargique des poissons issus des circuits recyclés qui, selon Lemarié et al (2000), apparaît lors d'une intoxication au CO<sub>2</sub> chez le bar.

D'autres substances toxiques peuvent également se concentrer dans les circuits recyclés et aboutir à une réduction de la croissance des poissons (Mayer et al., 1992). L'origine des substances toxiques qui pourrait s'accumuler dans ces circuits est à rechercher dans l'aliment,

car les apports d'eau neuve sont très limités par rapport à un circuit ouvert et la plupart des éléments de la boucle de recyclage sont fabriqués en matériaux inertes (PVC et aluminium 316L), ce qui rend peu probable une contamination de cette origine. L'aliment industriel pour bars est fabriqué à partir de petits poissons pélagiques qui proviennent de nombreuses régions dans le monde dont certaines pourraient être plus ou moins contaminées par des substances toxiques (dioxines, HAP, métaux lourds...).

Une autre hypothèse concerne la sensibilité du bar aux effluents de circuits recyclés, en fonction de son stade de développement. Léonard (2000) a observé des retards de croissance de l'ordre de 10% dès 30 jours d'élevage en circuit recyclé très fermé ( $R = 3 \text{ kg.m}^{-3}$ ) par rapport à un circuit recyclé très ouvert ( $R=0.06 \text{ kg.m}^{-3}$ ) chez des bars de 200-300 g en moyenne. Nous avons nous même mesuré lors d'une expérience préliminaire, une réduction significative de la croissance de bars de 330 g en moyenne après seulement 44 jours d'élevage dans le circuit recyclé-laguné par rapport au circuit ouvert. La concentration en dioxyde de carbone ou la bioaccumulation de substances toxiques ne peuvent pas expliquer ces différences de croissance. Dans notre expérience, la différence de croissance est apparue lorsque les poissons ont atteint un poids moyen de 220-230 g. Selon Bruslé & Roblin (1984) la maturation sexuelle des bars élevés en captivité a lieu pour 50% et 100% des mâles à 23 et 33 mois respectivement, alors qu'elle a lieu plus tard pour les femelles et n'est complète qu'à 3 ans. Dans notre étude, les poissons âgés de 9 mois en début d'expérimentation avaient donc 21 mois en fin d'expérimentation et une partie des mâles devaient être mature. Cette hypothèse a été confirmée au cours des prélèvements pour le dosage des biomarqueurs (Chapitre II) : sur une cinquantaine de poisson observés seules 2 femelles ont été identifiées et parmi les mâles quelques uns étaient matures. Les poissons non matures font une économie métabolique par rapport aux poissons matures ce qui leur permet de grandir plus vite. Une influence du type d'effluent d'élevage sur la maturation sexuelle des poissons serait à rechercher pour expliquer les différences de croissance entre les circuits ouvert et recyclé.

### 5.1.3) La comparaison avec les modèles de croissance

D'une manière générale, les courbes de croissance dans nos circuits suivent le modèle de Tanguy&LeGrel jusqu'au 126<sup>ème</sup> jour d'élevage et une charge moyenne de  $30 \text{ kg.m}^{-3}$ . Ce modèle a été établi pour des bars élevés en cage à une charge de  $25 \text{ kg.m}^{-3}$ . C'est donc l'augmentation de la charge dans nos bassins qui serait responsable d'un ralentissement de la croissance dans nos circuits.

Après le 126<sup>ème</sup> jour, les courbes de croissance suivent globalement le modèle de Pagand qui a été établi en circuit recyclé pour des charges de 80 kg.m<sup>-3</sup>. Il faut noter que les taux de nourrissage calculés par le modèle de Pagand sont supérieurs à ceux observés dans nos circuits les 6 derniers mois alors que les taux de croissance leurs correspondant sont équivalents. La baisse du taux de nourrissage et de croissance mesurée en fin d'élevage dans le circuit ouvert, est à mettre en relation avec la baisse du taux de renouvellement de l'eau en dessous du seuil limite de 20 l.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> au delà duquel on commence à voir un effet sur les performances des poissons (Lavenant et al 1995 ; Lemarié et Toften, 2003). Les meilleurs taux de croissance des poissons dans le circuit recyclé-laguné, par rapport au circuit recyclé pendant les deux derniers mois de l'expérience auxquels correspondent un meilleur indice de conversion, apparaissent lorsque les conditions climatiques deviennent plus favorables à la photosynthèse (février-mars).

L'hétérogénéité intra-groupe du poids moyen des poissons soumis à un même traitement augmente avec la croissance. Ces différences de croissance dans un groupe de poissons ayant un même poids initial et vivant dans le même environnement peuvent s'expliquer par le ratio sexuel, le comportement face à l'aliment et/ou la génétique (Gardeur & al, 2001).

### ***1.5.2) Influence du traitement sur les nutriments dissous***

Nous avons mesuré l'évolution de l'azote inorganique dissous et des phosphates dans les différents circuits. L'objectif est d'évaluer l'impact de l'installation d'un LHRA sur ces nutriments dans l'effluent en circuit recyclé.

#### ***1.5.2.1) L'azote dissous***

Les différentes proportions d'azote dans l'effluent d'élevage ne sont pas modifiées par le LHRA. En particulier, il n'augmente pas les concentrations de NAT et de nitrite qui sont des substances toxiques pour le poisson. Cela signifie que le fonctionnement du filtre biologique n'est pas perturbé par le lagunage, car il permet de maintenir une concentration en NAT très inférieure au seuil toxique sub-chronique (6,6 mg.l<sup>-1</sup>) pendant toute la durée de l'élevage.



Seule la forme  $\text{NH}_3$  est augmentée de façon significative dans le circuit recyclé-laguné par rapport au circuit recyclé, mais elle reste très inférieure à la valeur toxique sub-chronique ( $0,26 \text{ mg.l}^{-1}$ ) et elle dépend de la température, du pH et de la salinité dans le circuit.

Le nitrate est la forme azotée qui est majoritairement éliminée dans le LHRA, ce qui conduit à diminuer significativement le NID de l'effluent d'élevage recyclé. Ce n'est pas le cas dans le système intégré présenté par Neori (1996) où les effluents d'élevage, comparables à ceux du circuit ouvert et riche en ammoniacque ( $1,4 \text{ mg/l N-NAT}$ ), sont traités par des ulves. Il observe que l'accumulation des nitrates dans l'effluent conduit à une diminution importante des capacités d'épuration de l'azote par les algues et il propose de limiter la nitrification en éliminant régulièrement le biofilm qui se forme dans le système.

Le traitement par lagunage à haut rendement algal permet de diminuer le NID de 22 % en moyenne sur l'année. Ce taux d'épuration est inférieur à celui mesuré par Pagand (1999) dans ces mêmes lagunages, mais pour pouvoir comparer les résultats il faut tenir compte du débit d'effluent traité dans les bassins.

Pagand a mesuré 59 % d'épuration moyenne annuelle pour un effluent concentré à  $12,5 \text{ mg/l}$  de N-NID et traité avec un débit de  $0,06 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  ce qui correspond à une épuration moyenne annuelle de  $0,94 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ . Dans notre cas le LHRA a épuré 22% d'un effluent concentré à  $17,3 \text{ mg/l}$  de N-NID entrant avec un débit de  $0,45 \text{ m}^3/\text{h}$  ce qui correspond à une épuration moyenne annuelle de  $1,7 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{j}^{-1}$ . Les raisons pouvant expliquer une meilleure épuration de NID au cours de cette expérience par rapport à l'étude de Pagand (1999) sont difficiles à déterminer à cause de différences importantes dans nos protocoles de mesure (prélèvements en entrée/sortie lagunage pour Pagand et dans les circuits recyclés avec et sans LHRA dans cette étude). Un protocole similaire à celui de Pagand est étudié dans le chapitre III de cette thèse où plusieurs hypothèses sont envisagées.

Le modèle de Leonard (2000) surestime le NID dans notre circuit recyclé, mais il permet d'expliquer 86 % de ses variations durant l'expérience. Pour établir son modèle Leonard (2000) a utilisé une grande échelle de ratio ( $0,1 < R < 4$ ) ce qui pourrait expliquer une faible précision pour les ratios que nous avons utilisés ( $0,3 < R < 1$ ). De plus, son système de filtration mécanique moins poussé ( $50 \mu\text{m}$ ) que le notre ( $30 \mu\text{m}$ ) peut être à l'origine d'une concentration puis d'une dissolution de matières en suspension et aboutir à une concentration plus élevée de NID pour un même ratio de fermeture.

L'épuration de NID par le LHRA supprime la corrélation entre sa concentration et le ratio R dans le circuit recyclé-laguné et le modèle de Léonard (2000) ne permet pas de prévoir ses variations dans ce circuit. En effet, l'épuration de NID dans le circuit recyclé-laguné n'est pas constante toute l'année, car elle évolue avec la photosynthèse algale dans le LHRA qui est elle-même soumise aux variations climatiques saisonnières (Pagand, 1999).

#### 1.5.2.2) Le phosphore dissous

La concentration moyenne annuelle des phosphates dans le circuit recyclé-laguné n'est pas significativement différente de celle du circuit recyclé. Néanmoins on observe une réduction moyenne annuelle de 4 %. Pagand (1999) a mesuré une épuration moyenne annuelle de 56 % des phosphates avec un effluent comparable au notre et traité dans les mêmes lagunages.

L'efficacité de l'épuration des phosphates dans le LHRA dépend de deux phénomènes : l'assimilation dans les algues et la précipitation sous forme d'orthophosphates lorsque le pH est supérieur à 8 (Moutin et al., 1992 ; Mesplé et al., 1996). Le niveau de pH dans les LHRA est gouverné d'une part par l'activité photosynthétique des algues qui, en consommant du CO<sub>2</sub>, tend à élever le pH, et d'autre part par le débit de l'effluent dans les bassins.

Dans son étude Pagand (1999) a utilisé un débit faible dans les LHRA et il a mesuré un pH proche de 9 pratiquement toute l'année, ce qui a favorisé la précipitation des orthophosphates. Dans notre étude, le débit moyen annuel a été 7,5 fois plus fort que le sien, ce qui a conduit à réduire les pics de pH et donc la précipitation des phosphates dans les LHRA.

Ce phénomène de précipitation a du également se produire dans le bac tampon des circuits recyclés au niveau du point d'injection de la soude, comme l'a déjà suggéré Leonard (2000) dans ses travaux. La quantité de soude ajoutée a toujours été plus importante dans le circuit recyclé et elle a augmenté au cours de l'élevage afin de maintenir un pH optimal pour les poissons. On s'aperçoit que la concentration des phosphates est plus forte dans le circuit recyclé en début d'élevage puis elle devient plus faible que dans le circuit recyclé-laguné à partir du 266<sup>ème</sup> jour d'élevage. La régulation du pH par la soude est probablement responsable des différences observées et permet de comprendre l'absence de corrélation entre les phosphates et le ratio R.

Le modèle de Leonard, établi dans les mêmes conditions, permet de simuler correctement les phosphates dans le circuit recyclé mais pas dans le circuit recyclé-laguné.

## I.6) Conclusion

Des bars ont été élevés pendant un an dans trois circuits d'élevage différents : un circuit ouvert, un circuit recyclé et un circuit recyclé associé à un lagunage à haut rendement algal (LHRA). Le premier objectif de ce travail était de comparer les performances des poissons dans ces circuits. Dans tous les circuits, la mortalité a été inférieure à 10 % et le LHRA a amélioré sensiblement la survie des poissons. L'eau traitée par LHRA n'a pas modifié la croissance des poissons, mais celle-ci est réduite dans les circuits recyclés par rapport au circuit ouvert : au bout d'un an d'élevage le poids moyen des bars est inférieur de 15%. Cette baisse de croissance est associée à une diminution de l'alimentation. Une concentration excessive en dioxyde de carbone lorsque la charge des poissons dépasse  $50 \text{ kg/m}^3$  est probablement à l'origine de ce phénomène.

Le deuxième objectif était de caractériser les milieux d'élevage et d'évaluer les capacités d'épuration du LHRA en azote inorganique dissous et en phosphate. Le LHRA ne modifie pas les proportions des différentes formes de l'azote inorganique dissous (NID) et le nitrate est la principale forme d'accumulation de l'azote dans les circuits recyclés. Le traitement par le LHRA permet d'éliminer 22 % du NID en moyenne sur l'année. Les phosphates s'accumulent également dans les circuits recyclés mais nous n'avons pas mesuré de réduction significative de leur concentration par le LHRA : l'addition de soude dans le circuit recyclé pour maintenir un pH optimal a probablement entraîné une précipitation des phosphates dans ce circuit et aboutit à une sous-estimation de l'épuration par le LHRA.



## II.1) Introduction

Dans les circuits recyclés certains paramètres de qualité de l'effluent d'élevage sont contrôlés (oxygène dissous, température, pH, et CO<sub>2</sub>), et maintenus proches des valeurs optimales pour la croissance du poisson. Par ailleurs l'accumulation de matières particulaires (MES et bactéries) et de matières dissoutes (NID, COD, phosphates...) a déjà été décrite (Léonard et al., 2002 ; Pagand, 1999) mais d'autres substances sont également susceptibles de se concentrer dans ce type de circuit. La qualité de l'eau d'élevage d'un circuit recyclé diffère donc de celle d'un circuit ouvert et son impact sur l'état de santé des poissons est mal connu. Les poissons élevés dans nos circuits semblent tous en bonne santé, puisque leur mortalité est faible et leur croissance est proche de celle établie par les modèles. Toutefois, une réduction de croissance des poissons de 15 % dans les circuits recyclés par rapport au circuit ouvert est le signe d'une détérioration de la qualité de l'eau. En évaluation du risque environnemental, le comportement des polluants (biodisponibilité, bioaccumulation et biotransformation) et de leurs effets biologiques et biochimiques sur les poissons sont de plus en plus utilisés pour prédire leur impact sur les écosystèmes aquatiques (Bayne et al., 1985).

Récemment, certains marqueurs biologiques ou biomarqueurs, mesurés au niveau cellulaire ou moléculaire, ont été proposés comme indicateurs précoces de la dégradation d'un environnement (McCarthy et Shugart, 1990). Un des atouts des biomarqueurs est qu'ils peuvent anticiper un changement majeur au niveau biologique de l'organisme et ainsi être utilisés à titre préventif pour modifier les conditions environnementales et de protéger les animaux d'un effet irréversible.

Il existe plusieurs types de biomarqueur :

Les biomarqueurs d'exposition qui permettent de mesurer dans l'organisme, une substance exogène ou son métabolite ou le produit de son interaction avec une cellule cible.

Les biomarqueurs d'effet qui mesurent des altérations biochimiques, physiologiques ou autres dans les tissus et qui peuvent être associés avec une détérioration de l'état de santé de l'organisme.

Le foie des poissons est un organe important qui intervient dans des fonctions majeures comme l'assimilation des aliments, le stockage de composés de réserve, la production de protéines ou encore la biotransformation et la détoxification de composés endogènes et exogènes.

La recherche de dysfonctionnements au niveau du foie des poissons est donc souvent utilisée pour évaluer leur état de santé (Köhler et Pluta, 1995).

Dans ce chapitre, il s'agit de s'inspirer de cette démarche environnementale pour évaluer l'impact du système d'élevage sur l'état de santé des poissons et ainsi d'en prévenir les effets négatifs à long terme. Il s'agit dans le même temps de rechercher des éléments qui permettent d'établir la qualité du produit commercialisé pour la consommation humaine.

## **II.2) Bibliographie**

Plusieurs types de biomarqueurs d'exposition et d'effet, spécifiques ou non, sont utilisés pour évaluer la qualité d'un environnement aquatique pour les poissons. Chez les poissons, le foie étant le principal organe de détoxification la plupart des biomarqueurs sont mesurés dans cet organe cible.

### ***II.2.1) Les indicateurs de condition***

Ces indices ne sont pas des biomarqueurs au sens strict de la définition de Van Gastel et Van Brummelen (1996) mais ils sont mesurés en première intention car ils sont simples à réaliser, de faible coût et ils peuvent fournir des informations sur l'impact potentiel des polluants. On mesure notamment le facteur de condition (K) pour évaluer l'état général du poisson. Ce facteur peut être affecté par un facteur de stress qui produirait une diminution de l'alimentation chez les poissons et modifierait ainsi ses réserves énergétiques. On mesure également l'indice hépatosomatique ou « liver somatic index » (LSI) pour identifier une éventuelle pathologie hépatique. Plusieurs études supportent l'hypothèse qu'il existe une relation de causalité entre le grossissement du foie et l'exposition à des polluants (Slooff et al., 1983).

Quelques études de terrain ont aussi montré que la taille du foie peut être diminué (Adams et al, 1992) ou inchangée (Otto et al., 1994) dans un environnement pollué. Ces indices sont utilisés pour faire un bilan initial des réserves énergétiques et de la capacité des animaux à tolérer une pollution ou un facteur de stress (Mayer et al, 1992) mais ils sont peu sensibles et peuvent être affectés par de nombreux paramètres (alimentation, température, polluants ...).

### ***II.2.2) La bioaccumulation des métaux***

Afin de comprendre le comportement des contaminants dans l'eau et d'évaluer l'exposition des organismes aquatiques à ces substances, on utilise des marqueurs de bioaccumulation. La bioaccumulation d'un contaminant dans les tissus d'un organisme est un biomarqueur d'exposition à cette substance (NRC, 1987 ; WHO, 1993). Elle reflète la distribution du contaminant ou de ses métabolites dans l'organisme.

L'accumulation des substances chimiques dans les organismes dépend de plusieurs mécanismes :

la bioconcentration qui représente le ratio de concentration entre l'organisme et l'eau à l'équilibre.

la biomagnification qui est le ratio entre l'absorption du polluant via l'aliment et son élimination par l'organisme.

Lorsque l'on mesure la bioaccumulation d'un composé dans un organisme, il est important de tenir compte de sa biodisponibilité qui est définie comme sa fraction dans l'eau susceptible d'être absorbée par l'organisme et de s'accumuler dans ses tissus (Belfroid et al., 1996).

L'accumulation d'une substance dans un organisme va également dépendre de sa capacité à le métaboliser et à l'éliminer. C'est ce qu'on appelle la biotransformation qui peut réduire la toxicité d'une substance en l'éliminant ou au contraire l'augmenter en la métabolisant sous forme active.

La bioaccumulation d'un composé dans un organisme est typique de ce composé, du milieu aquatique dans lequel il se trouve et de l'organisme cible. Même en l'absence de toxicité aiguë ou chronique avérée, la bioaccumulation d'une substance est un résultat en soit car certains effets ne sont mesurables qu'à un stade plus tardif ou bien se manifestent aux générations suivantes ou à un stade plus haut de la chaîne alimentaire.

Pour vérifier l'hypothèse d'une concentration de substances polluantes dans l'eau des circuits recyclés par rapport au circuit ouvert, l'analyse directe de l'eau ne paraît pas très efficace car souvent les concentrations mesurées se situent en dessous des limites de détection. En revanche, l'analyse des polluants dans les tissus des poissons permet de mesurer la bioaccumulation en fonction du circuit d'élevage, en tenant compte de la biodisponibilité des substances dans leurs effluents.

Nous avons choisi d'analyser les métaux car ils sont mesurables à l'état de traces, leurs dosages sont faciles à réaliser, et il a été démontré que les niveaux mesurés dans les tissus sont corrélés avec l'exposition (Kraal et al., 1995 ; Odzak et Zvonaric, 1995 ; Liang et al., 1999). De plus ils ont été trouvés responsables de retard de croissance chez les poissons (Baker et al., 1997, Baker et al., 1998), ils sont très ubiquitaires dans le milieu marin et ils présentent un grand intérêt pour la qualité du poisson commercialisé pour la consommation humaine.

Afin de mesurer la concentration de ces métaux dans le poisson une mesure dans le muscle (qui est consommé) et dans le foie (qui est l'organe majeur de détoxification) paraît judicieuse.

#### II.2.2.1) Les métaux dans les milieux aquatiques les circuits et leurs interactions avec les poissons

Les métaux sont des éléments dont certains sont essentiels à la vie de nombreux organismes vivants sous forme de trace. Pourtant, ces métaux essentiels et les métaux non essentiels peuvent s'avérer toxiques pour ces organismes lorsqu'ils se retrouvent à un niveau de concentration trop levé dans le milieu et qu'ils s'accumulent dans leurs tissus.

Les métaux sont présents naturellement dans la croûte terrestre, mais ce sont les activités humaines qui provoquent leur dissémination dans l'environnement, principalement via les rejets industriels et urbains. Les métaux se retrouvent dans l'eau, le sol, l'air et peuvent s'accumuler dans les organismes au fil de la chaîne alimentaire. Ils sont présents sous formes soluble, colloïdale ou particulaire dans l'eau. La répartition de ces différentes formes dépend de leur spécificité chimique, des substances dissoutes ou particulières présentes dans l'eau et des conditions physico-chimiques du milieu.

La formation de complexes avec les matières organiques dissoutes (COD, substances humiques...) est largement décrites dans la littérature en particulier pour le cuivre dont la



toxicité est ainsi réduite (Hollis et al., 1996 ; Hollis et al., 1997) mais les métaux peuvent également interagir avec des hydroxydes et des carbonates dont la solubilité est modifiée par le pH.

Ils peuvent aussi être adsorbés sur des matières en suspension (matières organiques, bactéries...) et entrer en compétition avec des ions présents naturellement dans les milieux aqueux (Ca, Na, Mg, K...).

Ces différentes formes vont être plus ou moins absorbées par les poissons en fonction de leur caractère hydrophobe et de leur affinité avec les sites d'absorption. L'absorption des métaux chez les poissons se situe principalement au niveau des ouïes, du tractus digestif et de la peau. Les métaux traversent la membrane épithéliale par diffusion passive ou facilitée, par transport actif ou par endocytose. Certains paramètres de l'eau, comme la température qui facilite l'absorption de certains métaux à travers l'intestin (Roesijadi et Robinson, 1994) peuvent modifier ces mécanismes. Les métaux vont alors se lier avec les protéines et les lipides des tissus et organes cibles.

L'accumulation des métaux dans les organismes dépend enfin de leurs capacités de dépuration de ces composés. Chez les poissons, les métaux accumulés peuvent être mobilisés et éliminés à travers les ouïes, la peau, l'intestin ou les reins (Roesijadi et Robinson, 1994).

La toxicité attribuée aux métaux vis à vis des poissons peut être aiguë ou chronique. La toxicité aiguë est surtout observée avec les métaux sous formes ioniques, très solubles, capables de se lier aux enzymes et ainsi de modifier les processus biologiques. Les ions se fixant aux premiers ligands rencontrés, la voie d'administration du métal va déterminer la cible de son effet toxique. Les complexes organométalliques liposolubles, capables de traverser les membranes biologiques et de rester stockés dans les organes cibles, sont responsables d'une toxicité chronique. Les effets toxiques des métaux observés chez les poissons sont liés à une perturbation des systèmes de régulation des ions qui touche notamment les ouïes et peut aboutir dans ce cas à une détresse respiratoire (Westfall, 1945). Mushiake et al. (1985) ont observé une réduction des lymphocytes et des granulocytes qui aboutit à une baisse de la phagocytose. D'une manière générale, les recherches soulignent une augmentation de la sensibilité des poissons aux infections (Austin, 1999).

Lors d'une intoxication par les métaux, plusieurs auteurs ont observé une modification des mécanismes de défense cellulaire comme l'induction des métallothionéines (Roesijadi et Robinson, 1994), l'inhibition de la glutathion-S-transférase (Tuvikene et al., 1999) et l'induction des protéines de stress (Stegeman et al., 1992).

### II.2.2.2) Les teneurs en métaux dans le muscle et le foie des poissons

Quelques valeurs de métaux mesurées dans le muscle et dans le foie de poissons pêchés ou élevés dans le bassin Méditerranéen ont été relevées dans la littérature et sont présentées dans le tableau II.1 et II.2, respectivement. Afin de pouvoir comparer ces résultats avec ceux de notre étude les concentrations exprimées en poids frais (PF) ont été transformés en poids sec (PS) en considérant que  $PS = 10\% PF$ .

### II.2.2.3) Les valeurs recommandée pour la consommation humaine

Parmi les métaux traces que l'on peut retrouver dans les poissons, certains toxiques pour l'homme font l'objet de recommandation pour la consommation humaine par la FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the united nations/World Health Organization). Les valeurs limites de ces composés dans la chair de poisson sont présentées dans le tableau II.3

**Tableau II 3: Doses maximales de métaux toxiques recommandées par la FAO/WHO pour la consommation humaine**

	Valeurs limites recommandées	Commentaire	Référence
Arsenic	PTWI: 15	As inorganique Carcinogène	FAO/WHO, 1998, WHO Food Addit. Ser., No 31
Cadmium	0,5-10 <sup>a</sup>	Carcinogène Liste CCFAC	FAO/WHO, 2001 WHO Food Addit. Ser., No 33
Cuivre	50-150 <sup>a</sup>		FAO/WHO, 1989 WHO Food Addit. Ser., No 24
Plomb	2,5-30 <sup>a</sup>	Carcinogène	FAO/WHO, 2001 WHO Food Addit. Ser., No 33
Chrome	ESADDI : 50-200	Cr III	US Food and Drug Administration, 1993
Zinc	200-250 <sup>a</sup>		FAO/WHO, 1989 WHO Food Addit. Ser., No 24

<sup>a</sup> $\mu\text{g.gPS}^{-1}$ ; PTWI= ingestion maximale provisoire tolérable par semaine ( $\text{mg.kg}^{-1}$  poids corporel) ; ESADDI= ingestion maximale journalière ( $\mu\text{g.j}^{-1}$ ) CCFAC: Codex Committee on Food Additives and Contaminants

**Tableau II.1: concentrations de métaux mesurés dans le muscle de quelques poissons du bassin Méditerranéen.**

Origine	Espèce	Poids (g)	Métal	Concentration (µg/g poids sec)	Références
Mer Méditerranée (Turquie)	<i>S.aurata</i> (n=16)	95-648	Cr	1,24 ± 0,46	Canli et al., 2002
			Cu	2,84 ± 0,43	
			Zn	26,66 ± 7,62	
			Cd	0,37± 0,46	
			Pb	5,54 ± 0,74	
Océan Atlantique (Portugal)	<i>D.labrax</i>		Ni	0,76 ± 0,07	Perez Cid et al., 2001
			Cu	7,85 ± 0,13	
			Zn	112 ± 2	
			Cd	0,062 ± 0,025	
			Pb	0,38 ± 0,02	
Mer Adriatique (Croatie)	<i>M. merluccius</i> (n=138)	9-3000	Cd	0,041-0,143	Kljakovic Gašpic et al., 2002
	<i>M. barbatus</i> (n=99)	10-193	Pb	0,49-1,41	
Aquaculture (France)	<i>D.labrax</i> (n=4)	130 ± 5	Cu	0,78 ± 0,11	Roméo et al., 2000
			Zn	36 ± 4	
			Cd	0,013 ± 0,002	
Aquaculture (Croatie)	<i>D.labrax</i> (n=12)	6,2 ± 1,3	Cd	<0,25	Odzak et Zvonaric, 1995
			Pb	<0,05	

Les valeurs sont des moyennes ± écart-types

**Tableau II.2: concentrations de métaux mesurés dans le foie de quelques poissons du bassin Méditerranéen.**

Origine	Espèce	Poids (g)	Métal	Concentration (µg/g poids sec)	Références
Mer Méditerranée (Turquie)	<i>Sparus auratus</i> (n=16)	95-648	Cr	1,66 ± 0,33	Canli et al., 2002
			Cu	33,37 ± 16,24	
			Zn	76,47 ± 17,41	
			Cd	0,96 ± 0,24	
			Pb	8,87 ± 2,13	
	<i>M. cephalus</i> (n=16)	26-412	Cr	4,58 ± 3,45	
			Cu	203 ± 266	
			Zn	110 ± 35	
			Cd	1,64 ± 0,91	
			Pb	12,59 ± 5,80	
Mer Adriatique (Croatie)	<i>M. merluccius</i> (n=138)	9-3000	Cd	0,065-1,53	Kljakovic Gašpic et al., 2002
	<i>M. barbatus</i> (n=99)	10-193	Pb	0,11-1,83	
Aquaculture (France)	<i>D.labrax</i> (n=4)	130 ± 5	Cu	36,9 ± 1,4	Roméo et al., 2000
			Zn	58 ± 6	
			Cd	0,629 ± 0,097	
Aquaculture (Croatie)	<i>D.labrax</i> (n=12)	6,2 ± 1,3	Cd	1,0-1,5	Odzak et Zvonaric, 1995
			Pb	0,02-0,08	

Les valeurs sont des moyennes ± écart-types.

### **II.2.3) Les biomarqueurs biochimiques**

#### **II.2.3.1) Les protéines totales hépatiques**

Les protéines hépatiques ne sont pas un biomarqueur au sens strict défini par Van Gastel et Van Brummelen (1996). Leur dosage renseigne cependant sur l'état physiologique du foie et sert à normaliser les autres dosages de biomarqueurs biochimiques.

#### **II.2.3.2) Les enzymes de biotransformation**

Les altérations du taux et/ou de l'activité des enzymes de biotransformation sont les plus sensibles biomarqueurs d'effet (Van der Oost et al., 2003). Ces enzymes peuvent être inhibés ou activés lors d'une exposition à un xénobiotiques chez les poissons. On distingue deux types d'enzymes impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques :

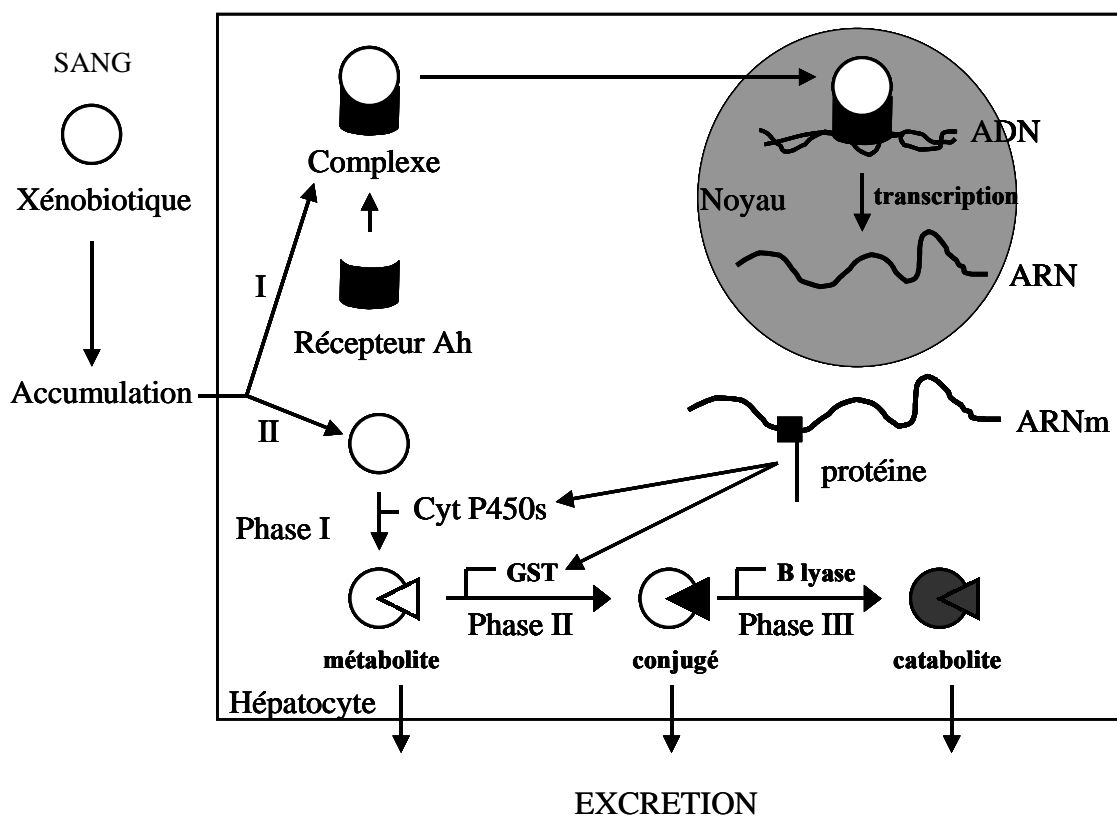
Les enzymes de phase I

Les enzymes de phase II

Les enzymes de phase I jouent un rôle important dans la première étape de métabolisation de nombreux contaminants, qui pourront ensuite être pris en charge par une enzyme de phase II pour être éliminés hors de la cellule. La figure II.1 montre une représentation simplifiée de la prise en charge des xénobiotiques par ces systèmes enzymatiques dans la cellule hépatique.

##### **II.2.3.2.1) L'Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD)**

La 7 Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase ou EROD est une enzyme de détoxification de phase I qui fait partie du système des monooxygénase à cytochrome P450 très ubiquitaire dans le règne vivant. Ce système comporte plusieurs familles qui interviennent dans le métabolisme oxydatif de divers composés endogènes comme les stéroïdes, les neurohormones, les acides gras et les prostaglandines mais aussi des composés chimiques. L'EROD fait partie de la sous famille du cytochrome P4501A (CYP1A) qui intervient dans la biotransformation de nombreux composés étrangers et parmi eux les dioxines, les furanes, les biphényles polychlorinés (PCBs) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). L'exposition des organismes à ces produits conduit à l'induction du CYP1A via le récepteur Ah (arylhydrocarbon) cytosolique. L'induction du CYP1A entraîne une première étape de detoxification qui consiste à transformer ces xénobiotiques lipophiles en composés plus hydrophiles.



**Figure II.1 : représentation simplifiée du devenir des xénobiotiques dans la cellule hépatocytaire.** I : mécanisme possible pour l'induction des enzymes II : mécanisme possible pour la détoxification des xénobiotiques (d'après Van der Oost et al., 1996)

Le métabolite obtenu peut alors être pris en charge par d'autres enzymes comme la glutathion-S-transferase (GST) afin d'être éliminé (Van der Oost & al, 1996).

L'induction de l'activité EROD a souvent été étudiée au cours de ces 15 dernières années. Dans la plupart des cas, l'activité EROD est corrélée positivement avec la concentration du polluant dans le milieu. Cependant il existe des substances inhibitrices de l'EROD (Fent et Bucheli, 1994) et d'autres facteurs tels que la température, la saison ou les hormones sexuelles (Stegeman et Hahn, 1994 ; Au & Wu, 2001) qui peuvent modifier cette relation dose réponse.

Actuellement, l'EROD est utilisé comme biomarqueur d'exposition dans de nombreux programmes internationaux de surveillance ou de gestion de l'environnement marin (Cajaraville et al, 2000), par exemple en France dans le cadre du réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (RNO). C'est un des biomarqueurs le plus mesuré et le plus sensible pour indiquer une exposition à un contaminant et évaluer le risque lié à cette contamination, pour les organismes aquatiques (Van der Oost et al., 2003).

Quelques valeurs de l'EROD mesurées chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) et répertoriées dans la littérature sont résumées dans le tableau II.4.

**Tableau II.4 : Activité EROD dans le foie de bars (*Dicentrarchus labrax*) pêchés ou élevés avec et/ou sans stimulation chimique (pmol/min/mgprotein)**

Type d'étude	Poids moyen (g)	Origine	EROD contrôle (pmol/min/mg)	« Polluants »	Exposition	EROD après stimulation (pM/min/mg)	Références
Laboratoire	20-50	Aquaculture, (Portugal)	0,2	1 % SF-STIUE	Eau, 48 h	0,75-1,5	Gravato et al, 2003a
Laboratoire	40 (n=5)	Pêche, Plymouth (UK)	600 ± 200	Cd BaP Cd + BaP	Eau, 40µg/l pdt 15j IP, 20mg/kg Eau, 40µg/l pdt 15j puis IP, 20mg/kg	6500 ± 900 12500 ± 1200 20700 ± 1900	Lemaire-Gony et al, 1995
Laboratoire	75±17	Aquaculture, Théoule (France)	200 ± 60	BaP β-NF	IP, 20 mg/kg IP, 50 mg/kg	830 ± 200 2980 ± 430	Viarengo et al, 1997
Laboratoire	100-150 (n=3)	Pêche, Plymouth (UK)	13,59 ± 2,98 ap 24h 2,12 ± 0,47 ap 5j	3MC	IP, 20mg/kg	91,01± 14,60 ap 24h 50,38 ± 7,78 ap 5j	Lemaire et al, 1996
Terrain	150-200	Aquaculture. (Cannes, France)	23,45 ± 4,75 (n=10)	Eaux usées Port Marina	1 mois en cage 1 mois en cage 1 mois en cage	41,79± 6,97 (n=11) 42,20± 8,37 (n=9) 27,19± 4,08 (n=6)	Stien et al., 1998
Terrain	(n=10)	Aquaculture, (Italie)	73,4 ± 28,4				Corsi et al, 1998

IP : intra-péritonéale ; 3 MC : 3-methylcholanthrene ; Cd = cadmium ; BaP = benzo(a)pyrène ; β-NF = β-naphthoflavone ; SF-STIUE : fraction soluble d'un effluent industriel/urbain secondaire traité

### II.2.3.2.2) La glutathion-S-transferase (GST)

La glutathion-S-transférase ou EC 2.5.1.18 est une enzyme de phase II qui intervient dans plusieurs processus physiologiques parmi lesquels figure la défense contre les dommages oxydatifs. La sensibilité des poissons à la carcinogenèse chimique peut être modulée par l'activité de la GST (Varanasi et al., 1987). Comme pour l'activité EROD, l'induction de la GST est régulée via le récepteur Ah. Cette enzyme catalyse la réaction d'addition entre ces composés et le groupement -SH du glutathion pour les rendre plus hydrosolubles (Habig & al, 1974).

La GST est induite par de nombreux composés dont certains sont également responsables de l'induction des cytochromes P450. Il s'agit des HAP's (Hoarau & al, 2001) et des PCB's. Certains auteurs ont mesuré une réduction de la GST chez le bar après une injection intrapéritonéale d'un HAP (Lemaire et al., 1996). Cependant la plupart des études n'ont pas montré de différence d'activité de la GST chez les poissons provenant de sites pollués contrairement à ce qui est observé pour les enzymes de phase I (Fenet et al., 1998).

Quelques résultats d'étude de l'activité GST chez les poissons, répertoriées dans la littérature sont résumées dans le tableau II.5.

### II.2.3.3) Les enzymes du stress oxydant

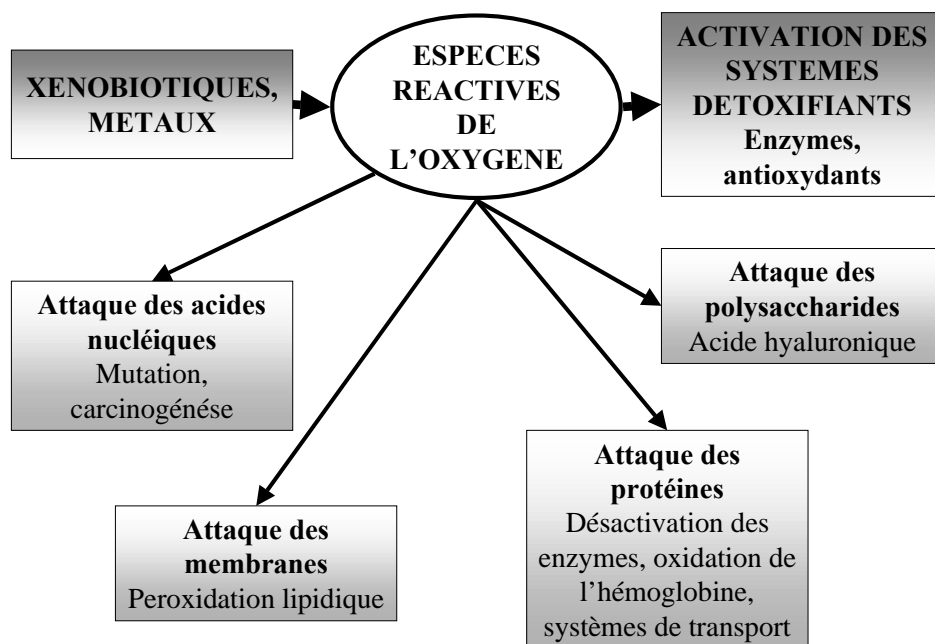
L'origine du stress oxydant chez les organismes aérobies provient de la consommation intracellulaire de la molécule d'oxygène qui est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques mais qui génère dans le même temps la formation d'espèces réactives de l'oxygène ou « reactive oxygen species » (ROS) qui sont potentiellement toxiques pour la cellule. Les principales sources de production des ROS proviennent de la phosphorylation oxydative de l'ADP, des chaînes de transport d'électron microsomiales, de l'activité phagocytaire et de l'activité de plusieurs enzymes qui produisent des ROS comme molécules intermédiaires. Les xénobiotiques peuvent augmenter la production intracellulaire des ROS, par exemple, au cours de leur réduction, où ils peuvent être transformés en leur radical libre qui va rapidement donner son électron à une molécule d'oxygène et produire un radical anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ). Celui-ci va à son tour réagir dans une réaction en chaîne et ainsi amplifier le phénomène initial.

Pour pouvoir maîtriser la formation de ces espèces réactives, les cellules disposent d'un complexe antioxydant de défense constitué d'enzymes spécifiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathione peroxidase) et de molécules qui piègent les espèces radicalaires au



niveau des membranes (vitamine E,  $\beta$ -carotène) ou de la phase aqueuse (acide ascorbique, acide urique et glutathion).

On définit le stress oxydant lorsque la formation des ROS excède les capacités de défense du système antioxydant. Le stress oxydant est à l'origine de dommages au niveau cellulaire (voir schéma figure II.2) et de différentes pathologies comprenant la carcinogénèse, les maladies cardiaques, l'arthrite rhumatoïde, l'inflammation et le vieillissement (Winston & al, 1998).

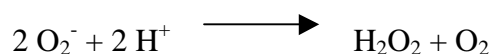


**Figure II.2: schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène sur les macromolécules (d'après Lackner, 1998)**

Parmi les mécanismes de défenses cellulaires qui contribuent à la détoxification des ROS, les enzymes antioxydantes peuvent être utilisés comme biomarqueurs du stress oxydant chez les poissons (Cossu & al, 1997).

### II.2.3.3.1 Les superoxydes dismutases (SOD)

Ces enzymes antioxydantes conventionnellement appelées EC 1.15.1.1 regroupent des métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde selon la réaction suivante :

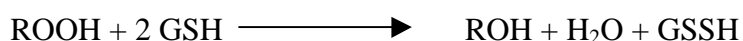


Ces enzymes possèdent au niveau de leur site actif un métal de transition (qui peut être le cuivre, le manganèse, ou le fer) qui va capter un électron de l'anion superoxyde et le transférer

au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif (Cossu & al, 1997). Chaque métal présent au site actif va conférer des propriétés particulières à la SOD, notamment en terme de localisation dans la cellule (Paoletti & al, 1986).

#### **II.2.3.3.2) Les glutathion peroxydases (GPOX)**

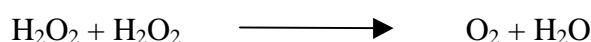
Il existe plusieurs glutathion peroxydases qui catalysent une réduction glutathion dépendante de nombreux peroxydes, dont le fonctionnement peut se résumer par l'équation suivante :



Parmi ces enzymes, on distingue : la glutathion peroxydase sélénium dépendante (SeGPOX) ou EC 1.11.1.9 est une métalloprotéine tétramérique dont chaque sous unité contient un atome de sélénium et qui joue un rôle majeur dans la lutte contre les processus de lipoperoxydation endogène et exogène (Cossu et al., 1997) ; la phospholipide hydroxyperoxyde glutathion peroxydase (PLGPOX) ou EC 1.11.1.12, dont le rôle principal est de protéger les liposomes et les biomembranes contre les dommages peroxydatifs (Spallholz et Boylan, 1991) et la glutathion peroxydase sélénium indépendante, qui réduit les peroxydes organiques (Cossu & al, 1997).

#### **II.2.3.3.3) La catalase (CAT)**

Cette enzyme cytosolique appelée conventionnellement EC 1.11.1.6 est une hémoprotéine tétramérique dont chaque sous unité contient un atome de fer. Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Cette enzyme très ubiquitaire est complémentaire de la SeGPOX contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène (Cossu et al., 1997).

Quelques résultats d'étude de l'activité des enzymes antioxydantes chez les poissons répertoriées dans la littérature sont résumées dans le tableau II.4.

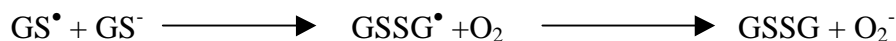
#### **II.2.3.4) Le glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG)**

Le glutathion ou L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyl est un tripeptide abondant chez les organismes vivants.

Parmi ces différentes fonctions, ce thiol joue deux rôles dans la détoxification (Stegeman et al., 1992). Il est impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques comme un donneur d'hydrogène dans la réaction catalysée par la glutathion-S-transférase (GST).

Il se conduit également comme une molécule antioxydante :

il est capable de réagir avec les radicaux libres ce qui va générer le radical thiyl ( $GS^\bullet$ ) qui peut à son tour générer l'ion superoxyde selon la formule suivante :



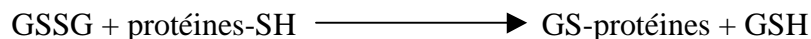
l'anion superoxyde sera alors pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD).

il intervient également comme substrat des glutathion peroxydases (GPOX) en tant que donneur d'hydrogène selon la réaction suivante :



Toutes ces réactions génèrent du glutathion sous sa forme oxydée (GSSG) qui traduit un stress oxydant.

Le glutathion oxydé (GSSG) peut réagir avec des protéines présentant un groupement  $-SH$  selon la réaction suivante :



Ce mécanisme est à l'origine de l'inactivation de certaines enzymes, d'où la nécessité pour la cellule de maintenir un rapport GSSG/GSH le plus faible possible. Ainsi la glutathion réductase utilise le NADPH pour transformer le GSSG en GSH. La diminution cellulaire de GSH et du rapport GSH/GSSG est donc un des effets les plus directs des polluants, mais elle peut être compensé par une synthèse accrue de GSH ou par sa régénération.

Van der Oost et al. (1996) considèrent néanmoins que le rapport GSH/GSSG est un biomarqueur potentiel pour le stress oxydatif et Stegeman et al. (1992) ont observé que dans les cellules saines le rapport GSH/GSSG est très élevé et toujours supérieur à 10/1.

Quelques résultats d'étude de l'évolution des teneurs en glutathion chez les poissons répertoriées dans la littérature sont résumées dans le tableau II.5.

### II.2.3.5) Les protéines de stress

Les protéines de stress sont présentes chez tous les organismes où elles jouent un rôle clef dans la protection et la réparation des cellules endommagées par un facteur de stress tel que la température, la salinité, le pH, l'anoxie, la lumière ultraviolette, les conditions oxydantes, les métaux lourds et les xénobiotiques tératogènes et hépatocarcinogènes (Dhainaut et al., 1997). Elles font partie des stratégies cellulaires de protection des organismes. Les protéines de stress comprennent plusieurs groupes parmi lesquelles les protéines de choc thermique ou « Heat Shock Proteins » (HSPs) dont la synthèse augmente lors d'une exposition à la chaleur ou à d'autres facteurs physiques et chimiques. L'ubiquité de ces protéines et la large gamme de facteurs susceptibles de les induire font qu'elles ont été récemment proposées comme des biomarqueurs non spécifiques. Aït-Aïssa et al. (2000) proposent l'utilisation des HSP70 présentes dans le cytoplasme pour détecter les effets toxiques de nombreux polluants, en particulier de la forme HSP72 qui est faiblement exprimée dans les conditions physiologiques et fortement inductible par un stress protéotoxique.

**Tableau II.5 : Biomarqueurs biochimiques mesurés dans le foie de *Dicentrarchus labrax*, *Brachydanio rerio* et *Sparus aurata* pêchés ou élevés avec et/ou sans pollution. <sup>a</sup> nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine ; <sup>b</sup> μmol.g<sup>-1</sup> de protéine.**

Origine	Espèce	Poids (g)	Polluant	Durée AT (Jour)	SOD <sup>a</sup>	CAT <sup>a</sup>	GPOX <sup>a</sup>	GST <sup>a</sup>	GSH <sup>b</sup>	Référence
Aquaculture (Italie)	<i>S. aurata</i>	250-350	Contrôle			185,7 ± 20,3	54700±4800			Vaglio et Landriscina, 1999
			Cd (IP)	3		118,8 ± 13,2	39700±3200			
			2,5 mg/kg	6		113,3 ± 12,1	34000±1600			
Aquaculture, Reims (France)	<i>B. rerio</i> (n= 40)	0,2 ± 0,07	Cu (Eau)	7		+		=	+	Paris-Palacios et al, 2000
			40±5 μg/l	14	14 AD	+		+	++	
			Cu (Eau)	7		++		+	++	
			140±30 μg/l	14	14 AD	+++		++	++	
					++++		+	+++		
Aquaculture, Ilhavo (Portugal)	<i>D. labrax</i> (n=3)	20-50	Contrôle	1				6		Gravato et Santos, 2003a
				2				7		
				4				9		
			0,1 % SF-STIUE (Eau)	1				7		
				2				7		
				4				9		
			1 % SF-STIUE (Eau)	1				7		
				2				7,5		
				4				6*		
Pêche, Plymouth (UK)	<i>D. labrax</i> (n=3)	100-150	Contrôle	1	6290±960	250000±30000	138,5±23,9	391±24		Lemaire et al, 1996
				5	4820±550	200000±20000	155,1±12,4	235±20		
			3MC (IP)	1	12450±1800*	310000±40000	82,9±13,4	263±26 *		
			20mg/kg	5	7620±1070*	220000±50000	169,8±21,1	141±16 *		

AT : après traitement ; AD : après dépuración ; IP : intra-péritonéale ; 3 MC : 3-methylcholanthrene ; Cu = cuivre ; Cd=cadmium; SF-STIUE : fraction soluble d'un effluent industriel/urbain secondaire traité.\*différence significative par rapport au contrôle.

## **II.3) Matériels et méthodes**

Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec Olivier Palluel (INERIS) et Wilfried Sanchez (stagiaire INERIS) pour les biomarqueurs ainsi qu'Hewa Asanthi (étudiante UM1) pour les métaux.

### ***II.3.1) Prélèvements des poissons***

Les prélèvements de poissons, pour évaluer l'impact des systèmes d'élevage sur les métaux traces et les biomarqueurs, sont effectués le même jour après 378 jours d'élevage. Quinze poissons par bassin, soit 30 par circuit, sont prélevés au hasard et tués par un coup de massue sur la tête. Ils sont pesés et leur taille est mesurée au millimètre près. Le foie est prélevé avec un scalpel propre puis pesé. Un petit morceau est coupé, pesé, rincé avec une solution de KCl à 150mM, stocké dans un cryotube et congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une solution d'azote liquide pour l'analyse des biomarqueurs. Pour 10 poissons en moyenne par circuit, le reste du foie est utilisé et un morceau de chair correspondant est prélevé pour l'étude des métaux. Ces échantillons sont pesés et enroulés dans une feuille de papier aluminium avant d'être placés dans la glace.

### ***II.3.2) Les indicateurs de condition***

Les données biométriques des poissons acquises au cours du prélèvement (le poids ( $m_p$ ), la taille (L) et le poids du foie ( $m_f$ )) permettent de calculer le facteur de condition (K) proposé par Bagnenal et Tesch (1978) selon la formule suivante:

$$K = (m_p / (L / 10)^3) \times 100$$

et l'indice hépato somatique (LSI) comme suit :

$$\text{LSI (\%)} = (m_f / m_p) \times 100$$

### **II.3.3) L'analyse des métaux**

Le jour du prélèvement, les échantillons de muscle et de foie sont transportés dans une glacière contenant de la glace, au laboratoire « Environnement et santé publique » de la faculté de pharmacie de Montpellier où ils sont maintenus à  $-24^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

#### **II.3.3.1) Préparation des échantillons**

Les échantillons sont passés au four à  $100^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce qu'ils atteignent un poids constant puis ils sont réduits en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Les échantillons sont placés dans des sacs en polythène et conservés dans un dessiccateur jusqu'à la digestion.

Approximativement, 0.25g des échantillons en poudre est alors transféré dans les tubes d'un digesteur à micro-onde pour une digestion en deux étapes. Dans un premier temps, 10ml d'acide nitrique est ajouté à l'échantillon pour une digestion de 20 minutes à 60 watts. Ensuite, on ajoute 5ml de peroxyde d'hydrogène pour une digestion de 15 minutes à 80 watts. Les résidus digérés sont alors dilués avec 50ml d'eau ultra pure (Millipore milli Q<sup>®</sup>), puis filtrés (Whatmann<sup>®</sup> GF/C), et conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  dans des flacons en plastique jusqu'à l'analyse des métaux.

#### **II.3.3.2) Le dosage des métaux**

Un spectromètre ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrophotometer) est utilisé pour l'analyse du chrome, du manganèse, du cobalt, du nickel, du cuivre, du zinc, de l'arsenic, de l'argent, du cadmium, de l'étain, du thallium et du plomb. L'instrument est calibré avec 2 solutions standard qui contiennent tous les métaux mesurés à 5 et 10 ppb respectivement. Les échantillons digérés de muscle et de foie sont dilués au  $1/5^{\text{ème}}$  en mélangeant 2ml d'échantillon, 7,65ml d'eau ultra pure, 250  $\mu\text{l}$  d'acide nitrique à 5 % et 100  $\mu\text{l}$  de solution standard. La solution standard, qui contient 1ppm de Bismuth (Bi 119) et 1ppm d'Indium (In 115), est utilisée comme étalon interne.

### **II.3.4) L'analyse des biomarqueurs biochimiques**

Le jour du prélèvement, les échantillons congelés, entourés de carboglace, sont transportés à l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) où ils sont maintenus à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

#### **II.3.4.1) Préparation des échantillons**

Pour éviter la dégradation des molécules biologiques, les échantillons sont maintenus à une température inférieure à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant tout le protocole de fractionnement des foies. Cette étape, qui consiste à séparer les compartiments cellulaires qui contiennent les différents biomarqueurs, est schématisée par la figure II.3.

Le foie est homogénéisé à l'aide d'un broyeur de type otter-elvehjern et d'un piston en téflon dans 2,5 ml de tampon (Tampon phosphate 100mM ; pH 7,8 ; glycérol 20% ; PMSF 0,2mM). L'homogénat subit une première centrifugation à 600g pendant 10 minutes.

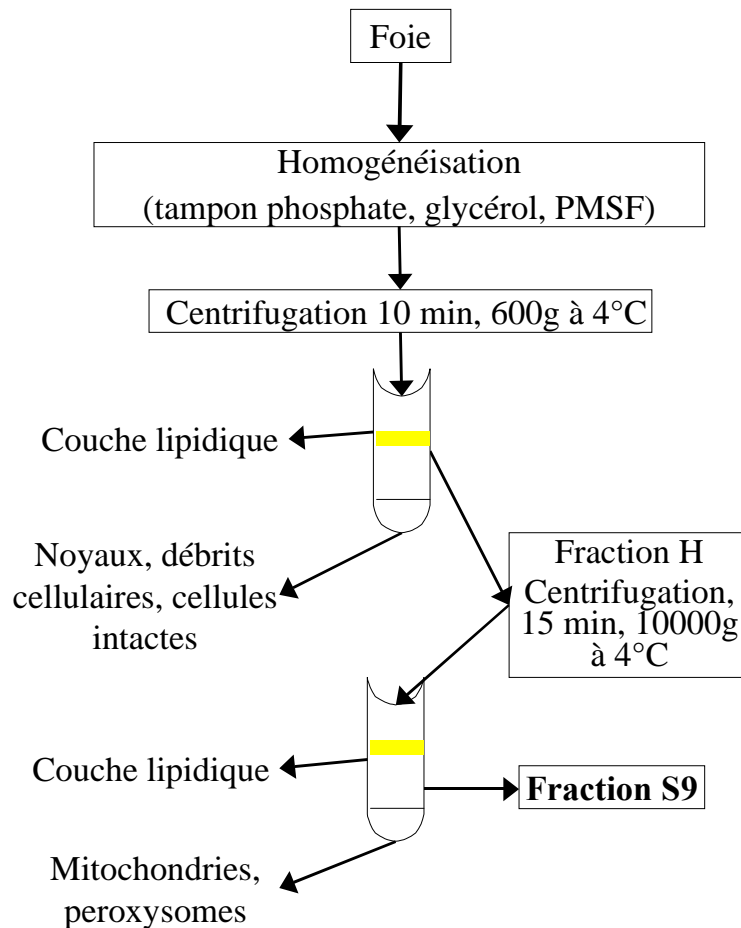
Cette étape met en évidence trois phases avec une fraction lipidique en surface, un surnageant qui contient le cytosol et les organites et un culot qui rassemble les cellules non éclatées, les noyaux intacts et les gros débris cellulaires. La fraction surnageante appelée fraction H est prélevée et subit une centrifugation à 10 000g pendant 15 minutes.

Il apparaît alors trois phases avec une phase lipidique moins importante que précédemment, un culot qui contient les mitochondries, les peroxysomes et les gros débris membranaires et un surnageant appelé fraction S9 qui contient le cytosol, les microsomes et les petits organites. C'est sur la fraction S9 que sont réalisés les différents dosages biochimiques.

#### **II.3.4.2) Le dosage des biomarqueurs**

Tous les dosages sont réalisés en microplaque 96 puits à fond plat. Les lectures d'absorbance ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre Power Wave X (Biotek<sup>®</sup>) tandis que les lectures de fluorescence étaient réalisées par un lecteur multiparamétrique EGG Wallac Victor (Perkin Elmer<sup>®</sup>).





**Figure II.3: schéma du fractionnement d'hépatocytes des bars (d'après Bonifacino & al, 1999)**

Les méthodes de références utilisées pour doser les protéines totales (PT), l' Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD), la glutathion-*S*-transferase (GST), la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPOX), la catalase (CAT), le glutathion total (GSH) et le glutathion oxydé (GSSG) sont données dans le tableau II.6.

Les protéines de stress (HSP70) ont été analysées par western blot selon la méthode de Lewis et al. (1999), après séparation des protéines totales par électrophorèse selon Laemmli (1970). Les bandes ainsi révélées sont scannées puis leur intensité est déterminée à l'aide du logiciel ImageMaster 1D (Pharmacia®). Le résultat est exprimé en unité relative d'intensité après normalisation des valeurs des bandes avec celle du standard HSP70 déposé en quantité connue sur le gel (UA normalisées).

**Tableau II.6: Méthodes de références et unités utilisées pour l'analyse des biomarqueurs**

<b>Biomarqueur</b>	<b>Unité</b>	<b>Référence publications</b>
PT	mg.g <sup>-1</sup> de foie	Bradford (1976)
EROD	pmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de protéine	Flammarion et al. (1998)
GST	nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de protéine	Habig et al. (1974)
SOD	nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de protéine	Paoletti et al. (1986)
GPOX	nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de protéine	Paglia et Valentine (1967)
CAT	nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> de protéine	Babo et Vasseur (1992)
GSH et GSSG	μmol.g <sup>-1</sup> de protéine	Vandeputte et al. (1994)

### ***II.3.5) L'analyse statistique des résultats***

Les résultats sont analysés en fonction du type de traitement de l'eau des bassins. De ce fait, les valeurs pour les 2 bassins d'un même circuit sont rassemblées dans un même groupe. Les variables mesurées sont décrites par une moyenne et un écart type.

Afin de comparer les groupes, une analyse de variance à un facteur (ANOVA) est réalisée. Si la distribution normale des variables ou l'égalité des variances ne sont pas vérifiées au risque  $\alpha=5\%$ , les valeurs sont normalisées par une transformation log ou ln. Si l'ANOVA montre une différence significative au risque  $\alpha=5\%$  ( $p<0.05$ ), les groupes sont comparés entre eux par un test de Newman Keuls au risque  $\alpha=5\%$ .

Si les variances ne sont toujours pas homogènes ou si les résidus n'ont pas une distribution normale, malgré la transformation, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW test) et les groupes sont comparés entre eux par un test de Dunn's au risque  $\alpha=5\%$ .

Les corrélations entre les différents paramètres sont déterminées à l'aide du coefficient de Pearson, lorsque les données sont homogènes et normalement distribuées, ou à l'aide d'une table de corrélation de Spearman si les données ne répondent pas à ces critères.

## II.4) Résultats et discussion

### II.4.1) Les indicateurs de condition

Les résultats biométriques mesurés dans chaque circuit sont résumés dans le tableau II.7.

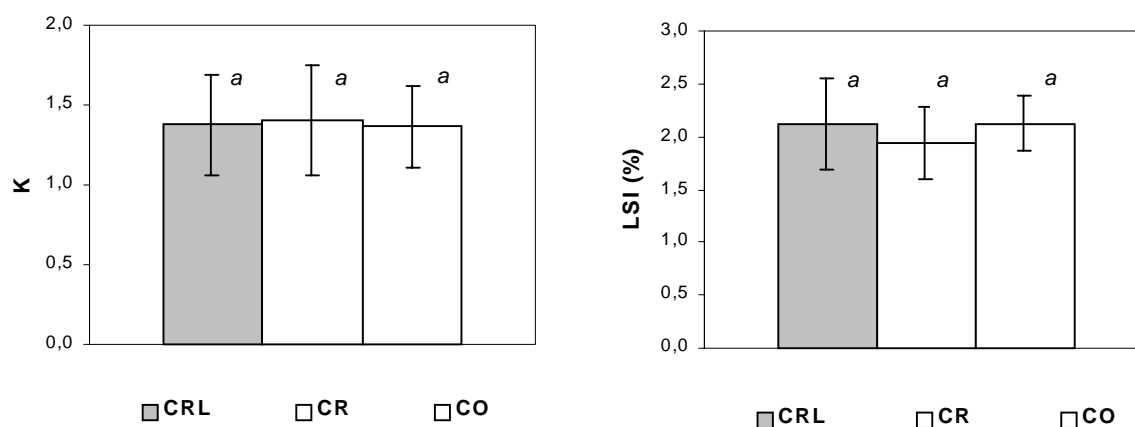
**Tableau II.7: Mesures biométriques des poissons testés pour la détermination des biomarqueurs**

Circuit	n	Longueur (mm)	Poids (g)	Poids du foie (g)
Ouvert	30	317±25 <sup>a</sup>	440±117 <sup>a</sup>	9,5±2,5 <sup>a</sup>
Recyclé	30	297±26 <sup>b</sup>	364±81 <sup>b</sup>	7,1±2,4 <sup>b</sup>
Recyclé Laguné	30	295±34 <sup>b</sup>	363±124 <sup>b</sup>	7,9±3,2 <sup>b</sup>

Les valeurs sont des moyennes ± écart type. Les valeurs n'ayant pas de lettre commune en indice sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

Il existe une différence significative de taille (NK,  $p < 0,05$ ), de poids (NK,  $p < 0,05$ ) et de poids des foies (NK,  $p < 0,05$ ) entre les poissons du circuit ouvert et ceux des deux circuits recyclés.

Ces résultats biométriques ont été utilisés pour mesurer les indicateurs de condition qui sont représentés par la figure II.4



**Figure II.4: Facteur de condition (K) et index hépatosomatique (LSI) des bars dans les circuits ouvert (CO), recyclé (CR) et recyclé-laguné (CRL)**

Il n'y a pas de différence significative entre le facteur de condition (ANOVA,  $p=0.84$ ) et l'index hépatosomatique (ANOVA,  $p=0,13$ ) des différents circuits.

#### **II.4.2) L'analyse des métaux traces**

##### II.4.2.1) Les mesures biométriques

Le nombre, le poids, la taille et le poids des foies des individus testés pour les métaux sont donnés dans le tableau II.8. Un problème de prélèvement n'a permis d'analyser que 6 échantillons au lieu des 10 prévus dans le circuit recyclé-laguné.

**Tableau II.8: Mesures biométriques des poissons testés pour la détermination des métaux traces**

<b>Circuit</b>	<b>n</b>	<b>Longueur (mm)</b>	<b>Poids (g)</b>
Circuit Ouvert	10	325±27 <sup>a</sup>	452±113 <sup>a</sup>
Circuit Recyclé	11	303±25 <sup>a</sup>	393± 94 <sup>a</sup>
Circuit Recyclé Laguné	06	298±40 <sup>a</sup>	362±181 <sup>a</sup>

Les valeurs sont des moyennes ± écart type. Les valeurs n'ayant pas de lettre commune en indice sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

Il n'y a pas de différence significative de taille (ANOVA,  $p=0,14$ ), de poids (ANOVA,  $p=0,35$ ) et de poids des foies (KW,  $p=0,12$ ) entre les poissons testés des trois circuits d'élevage pour l'analyse des métaux traces.

##### II.4.2.2) Les concentrations de métaux dans le muscle

Les concentrations des métaux dans la chair des poissons provenant des trois circuits d'élevage sont données dans le tableau II.9.

Parmi les douze métaux qui ont été mesurés dans les muscles seuls les résultats du zinc et de l'arsenic ont passé le test de normalité et ont été comparés par un test paramétrique (ANOVA). Les autres valeurs des métaux ont été comparées par un test non paramétrique (KW test).

Le chrome (Dunn's,  $p < 0,05$ ), le manganèse (Dunn's,  $p < 0,05$ ), le cobalt (Dunn's,  $p < 0,05$ ), le nickel (Dunn's,  $p < 0,05$ ), le cuivre (Dunn's,  $p < 0,05$ ), l'arsenic (NK,  $p < 0,05$ ) et le thallium (Dunn's,  $p < 0,05$ ) ont été trouvés significativement plus élevés dans le muscle des poissons du circuit recyclé (CR) que dans le muscle des poissons du circuit ouvert (CO). Seuls le chrome (Dunn's,  $p < 0,05$ ) et l'arsenic (NK,  $p < 0,05$ ) sont également plus élevés dans le muscle des poissons du circuit recyclé-laguné (CRL) par rapport au circuit ouvert (CO).

#### II.4.2.3) Les concentrations de métaux dans le foie

Les résultats des analyses pour les concentrations des métaux dans les foies des poissons provenant des trois circuits d'élevage sont données dans le tableau II.10. A cause d'une erreur d'analyse, neuf échantillons au lieu de dix ont été testés dans le circuit ouvert.

Pour les mêmes raisons que dans le muscle, le chrome, le nickel, le zinc, le cadmium, l'étain et le plomb ont été comparés par un test non paramétrique dans les foies (KW test).

Le chrome (Dunn's,  $p < 0,05$ ), le cobalt (NK,  $p < 0,05$ ), le cadmium (Dunn's,  $p < 0,05$ ) et le plomb (Dunn's,  $p < 0,05$ ) sont significativement plus élevés dans le foie des poissons issus du circuit recyclé que dans le foie des poissons du circuit ouvert. Dans le foie des poissons du circuit recyclé-laguné, seul le chrome est significativement augmenté (Dunn's,  $p < 0,05$ ) et l'étain est significativement diminué (Dunn's,  $p < 0,05$ ) par rapport au foie des poissons en circuit ouvert.

Tous circuits confondus, le manganèse, le cobalt, le cuivre, le zinc, l'argent, le cadmium, l'étain et le thallium sont significativement plus élevés dans les foies que dans les muscles alors que l'arsenic est plus élevé dans le muscle que dans le foie.

**Tableau II.9: Concentrations en métaux traces des muscles de poissons provenant des différents circuits d'élevage ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  poids sec)**

	<b>Circuit Ouvert</b>	<b>Circuit Recyclé</b>	<b>Circuit Recyclé Laguné</b>
<b>Chrome</b>	0,05±0,09 (0,00-0,32) <sup>a</sup>	0,25±0,14 (0,00-0,38) <sup>b</sup>	0,24±0,13 (0,00-0,09) <sup>b</sup>
<b>Manganèse</b>	0,50±0,46 (0,00-1,21) <sup>a</sup>	2,59±2,56 (0,80-8,69) <sup>b</sup>	1,32±0,66 (0,74-2,59) <sup>a,b</sup>
<b>Cobalt</b>	0,004±0,007 (0,000-0,024) <sup>a</sup>	0,032±0,038 (0,000-0,097) <sup>b</sup>	0,012±0,012 (0,002-0,037) <sup>a,b</sup>
<b>Nickel</b>	0,16±0,43 (0,00-1,35) <sup>a</sup>	0,59±1,06 (0,00-0,61) <sup>b</sup>	2,74±5,73 (0,00-14,39) <sup>a,b</sup>
<b>Cuivre</b>	0,75±2,08 (0,00-6,60) <sup>a</sup>	0,98±0,95 (0,00-3,48) <sup>b</sup>	0,40±0,30 (0,19-0,96) <sup>a,b</sup>
<b>Zinc</b>	13,5±9,9 (1,0-32,8) <sup>a</sup>	19,9±12,7 (1,09-37,9) <sup>a</sup>	20,0±9,7 (11,52-38,39) <sup>a</sup>
<b>Arsenic</b>	6,85±1,38 (4,99-9,22) <sup>a</sup>	9,80±1,18 (7,87-11,38) <sup>b</sup>	8,59±1,33 (6,38-10,06) <sup>b</sup>
<b>Argent</b>	0,17±0,38 (0,00-1,11) <sup>a</sup>	0,44±1,24 (0,00-4,18) <sup>a</sup>	ND
<b>Cadmium</b>	0,003±0,006 (0,000-0,020) <sup>a</sup>	0,014±0,022 (0,000-0,073) <sup>a</sup>	0,005±0,006 (0,000-0,017) <sup>a</sup>
<b>Tin</b>	0,019±0,052 (0,000-0,167) <sup>a</sup>	0,001±0,003 (0,000-0,007) <sup>a</sup>	0,002±0,004 (0,000-0,008) <sup>a</sup>
<b>Tallium</b>	0,001±0,001 (0,000-0,003) <sup>a</sup>	0,005±0,008 (0,000-0,028) <sup>b</sup>	0,002±0,001 (0,001-0,005) <sup>a,b</sup>
<b>Plomb</b>	0,049±0,106 (0,000-0,335) <sup>a</sup>	0,120±0,128 (0,000-0,379) <sup>a</sup>	0,044±0,086 (0,000-0,218) <sup>a</sup>

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type (valeurs min-max). Les valeurs n'ayant pas de lettre commune en indice sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

**Tableau II.10: Concentration en métaux traces des foies de poissons provenant des différents circuits d'élevage ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  poids sec).**

	<b>Circuit Ouvert</b>	<b>Circuit Recyclé</b>	<b>Circuit Recyclé Laguné</b>
<b>Chrome</b>	0,04±0,09 (0,00-0,27) <sup>a</sup>	0,12±0,08 (0,00-0,23) <sup>b</sup>	0,13±0,08 (0,01-0,26) <sup>b</sup>
<b>Manganèse</b>	1,88±0,52 (1,11-2,59) <sup>a</sup>	2,44±0,78 (1,47-3,97) <sup>a</sup>	2,15±0,53 (1,58-2,93) <sup>a</sup>
<b>Cobalt</b>	0,029±0,013 (0,000-0,048) <sup>a</sup>	0,045±0,015 (0,028-0,071) <sup>b</sup>	0,048±0,019 (0,024-0,070) <sup>a,b</sup>
<b>Nickel</b>	0,08±0,21 (0,00-0,65) <sup>a</sup>	0,03±0,05 (0,00-0,12) <sup>a</sup>	0,13±0,15 (0,00-0,40) <sup>a</sup>
<b>Cuivre</b>	233±57 (137-313) <sup>a</sup>	237±82 (87-352) <sup>a</sup>	232±77 (155-327) <sup>a</sup>
<b>Zinc</b>	84,3±9,6 (68,8-103,5) <sup>a</sup>	83,1±25,6 (41,9-133,3) <sup>a</sup>	85,0±16,2 (67,9-112,6) <sup>a</sup>
<b>Arsenic</b>	2,39±0,34 (1,98-2,98) <sup>a</sup>	2,55±0,54 (1,29-3,26) <sup>a</sup>	2,85±0,56 (2,42-3,96) <sup>a</sup>
<b>Argent</b>	0,44±0,15 (0,24-0,63) <sup>a</sup>	0,48±0,30 (0,13-1,05) <sup>a</sup>	0,35±0,19 (0,14-0,63) <sup>a</sup>
<b>Cadmium</b>	0,25±0,13 (0,00-0,46) <sup>a</sup>	0,94±1,67 (0,27-5,94) <sup>b</sup>	0,32±0,05 (0,28-0,40) <sup>a,b</sup>
<b>Tin</b>	0,043±0,078 (0,000-0,249) <sup>a</sup>	0,009±0,009 (0,000-0,025) <sup>a</sup>	0,001±0,002 (0,000-0,005) <sup>b</sup>
<b>Tallium</b>	0,003±0,002 (0,000-0,005) <sup>a</sup>	0,004±0,002 (0,001-0,010) <sup>a</sup>	0,004±0,001 (0,003-0,006) <sup>a</sup>
<b>Plomb</b>	0,006±0,012 (0,000-0,036) <sup>a</sup>	0,070±0,078 (0,000-0,214) <sup>b</sup>	0,049±0,092 (0,000-0,237) <sup>a,b</sup>

Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart type (valeurs min-max). Les valeurs n'ayant pas de lettre commune en indice sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

#### II.4.2.4) Discussion sur la bioaccumulation des métaux traces

Les concentrations moyennes des métaux mesurés dans le muscle et dans le foie montrent de grands écarts types chez des poissons issus du même circuit. Ceci peut être en partie expliqué par des concentrations mesurées qui sont proches de la limite de détection (Co, Sn, Tl, Pb) mais également par une grande variabilité intra individuelle (Ni, Cu, Ag). Ces variations sont plus importantes dans le muscle que dans le foie où les concentrations en métaux sont plus fortes et plus homogènes. En conséquence, la comparaison des métaux dans les différents systèmes doit être interprétée avec précaution et un plus grand nombre de poissons devra être analysé au cours des études à venir.

Toutefois, l'analyse statistique des résultats révèle que sept et quatre des douze métaux testés sont plus élevés dans le muscle et le foie, respectivement, des poissons du circuit recyclé comparé au circuit ouvert. Pour les poissons du circuit recyclé-laguné, seuls le chrome dans le muscle et le foie et l'arsenic dans le muscle sont significativement plus élevés que dans ceux du circuit ouvert.

Nous avons vérifié qu'il n'existe pas de corrélation (Spearman) des concentrations en métaux dans le muscle et le foie avec la taille et le poids des poissons comme cela a été démontré pour certains métaux traces (Liang et al., 1999 ; Kljakovic Gašpic et al., 2002 ; Canli et Atli, 2003). Si on considère que les poissons ont été alimentés avec le même aliment industriel, l'accumulation des métaux chez les poissons des circuits recyclés provient donc d'une accumulation dans l'eau.

Le taux de renouvellement de l'eau dans les circuits recyclés ayant été en moyenne 60 fois plus faible que dans le circuit ouvert sur la durée d'élevage, les métaux traces contenus dans l'aliment ont dû se concentrer dans l'eau de ces circuits comme c'est le cas pour les nitrates ou le carbone organique dissous (Pedersen, 1998 ; Léonard et al., 2002). Toutefois on aurait pu s'attendre à une bioaccumulation plus forte dans ces circuits, mais la richesse en matières organiques dissoutes (COD, substances humiques...) et en particules (MES, bactéries...) des effluents en circuits recyclés (Leonard et al., 1999) par rapport à ceux d'un circuit ouvert doit réduire la biodisponibilité de ces métaux pour les poissons.

La réduction de la bioaccumulation de certains métaux par le LHRA est probablement due aux capacités des algues à absorber les métaux. Ces capacités d'absorption ont déjà été mises à profit dans le traitement des rejets (Aderhold et al., 1996 ; Davis et al., 2000) et dans l'évaluation de la pollution environnementale (Luoma et al., 1982 ; Caliceti et al.,



2002 ;Villares et al., 2002). L'élévation du pH par la photosynthèse des algues a pu également contribuer à précipiter des complexes métalliques hydroxydes ou carbonates dans les bassins de LHRA comme cela est le cas pour les phosphates (Moutin et al., 1992 ; Mesplé et al., 1996).

Parmi les métaux testés, seuls le chrome et l'arsenic, qui ne sont pas éliminés par le LHRA et qui s'accumulent dans les poissons des deux circuits recyclés, pourraient être à l'origine d'une réduction de leur croissance après 210 jours d'élevage (Chapitre I). Bogé et al. (1988) ont montré chez la truite arc en ciel que l'activité de certaines enzymes digestives sont réduites au contact du chrome dans la lumière intestinale. Néanmoins, même si certains auteurs ont montré qu'il existe une réduction de la croissance des poissons par certains métaux nous ne disposons pas de suffisamment d'éléments dans cette expérience pour faire une telle hypothèse.

La concentration de huit métaux sur douze dans le foie des poissons, quel que soit le circuit d'élevage, confirme que c'est un organe majeur de la détoxification et de l'accumulation des métaux dans ces organismes (Gaspic et al, 2002, Eastwood et Couture, 2002).

D'importants niveaux d'accumulation ont été trouvés par rapport au muscle pour le zinc (5 fois), le cadmium (80-90 fois) et le cuivre (310 fois). Les concentrations mesurées dans les foies de nos poissons sont comparables à celles de la bibliographie pour la même espèce (Tableau II.2), sauf pour le cuivre qui est en moyenne 10 fois plus élevé dans le foie de nos poissons. De tels niveaux de concentration de cuivre hépatique ont cependant déjà été trouvés dans d'autres espèces de poisson marin (le mullet chez Canli et Atli, 2003) et d'eau douce (la truite arc en ciel chez Grosell et al, 1998; la perche jaune chez Eastwood et Couture, 2002). L'arsenic est le seul métal qui est plus abondant dans le muscle que dans le foie des poissons. Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu pour le mullet pêché dans un estuaire en Espagne (Suner et al, 1999). La comparaison avec notre étude est cependant difficile car dans cette étude, il n'est pas possible de dissocier une contamination par l'eau ou par l'aliment et de plus, l'organe cible des métaux varie beaucoup selon l'espèce.

Parmi les éléments qui s'accumulent dans les circuits recyclés, certains sont toxiques (cuivre, chrome, zinc) et cancérigène (arsenic, cadmium, plomb) pour l'homme. Néanmoins, après une année d'élevage dans les circuits, les valeurs les plus fortes mesurées dans la chair des poissons sont équivalentes ou plus faibles que celles mesurées dans d'autres poissons pêchés ou élevés du bassin Méditerranéen (Tableau II.1) et elles sont en dessous des valeurs

recommandées pour la consommation humaine (Tableau II.3). Pour l'arsenic, la limite recommandée autoriserait à consommer 1,3 kilo de chair de poisson par kilo de poids corporel et par semaine et si l'on considère la concentration la plus élevée mesurée pour l'arsenic et entièrement sous forme inorganique toxique. Pour le chrome, la limite recommandée autoriserait à consommer 1,3 kilo de chair de poisson par jour dont la concentration est la plus élevée et si l'on considère que tout le chrome mesuré est trivalent.

### **II.4.3) Les biomarqueurs biochimiques**

L'ensemble de ces résultats sont représentés sur la figure II.5

#### **II.4.3.1) Les protéines totales**

Les résultats présentés ne montrent pas de différence significatives au niveau de la teneur protéique de la fraction S9 des foies pour les différents lots de poissons (ANOVA,  $p=0,14$ ). Les teneurs protéiques sont comprises entre  $34.4 \pm 8.8$  mg/g de foie pour le circuit ouvert et  $38.7 \pm 9.0$  mg/g de foie pour le circuit recyclé.

#### **II.4.3.2) L'EthoxyResorufine-O-Deethylase**

Il y a une différence significative de l'activité EROD entre les circuits recyclés et le circuit ouvert (NK test,  $p < 0,05$ ). Les valeurs mesurées sont égales à  $8,1 \pm 5,7$ ;  $12,2 \pm 6,7$  et  $13,1 \pm 6,6$  pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour le circuit ouvert, recyclé et recyclé-laguné, respectivement. Le facteur d'induction moyen de l'EROD par rapport au circuit ouvert est égal à 1,5 pour le circuit recyclé et 1,6 pour le circuit recyclé-laguné.

#### **II.4.3.3) La glutathion-S-transférase**

Les résultats ne montrent pas de différence significative (ANOVA,  $p=0,49$ ), pour cette enzyme de phase II, entre les poissons des différents circuits. Leurs valeurs sont comprises entre  $1183 \pm 298$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour les poissons prélevés dans le circuit ouvert et  $1297 \pm 361$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour les poissons issus du circuit recyclé-laguné.

#### II.4.3.4) Les enzymes antioxydantes

Exception faite de la SOD, les résultats obtenus pour les autres enzymes spécifiques du stress oxydant ne laissent pas apparaître de différences significatives entre les poissons issus des différents circuits.

C'est le cas pour la GPOX (ANOVA,  $p=0,41$ ) dont les valeurs sont comprises entre  $26,5\pm 18,4$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour le circuit recyclé laguné et  $31,5\pm 17,3$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour le circuit ouvert et pour la catalase (ANOVA,  $p=0,94$ ). Ces valeurs oscillent entre  $1974\pm 588$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour le circuit recyclé laguné et  $2029\pm 556$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine pour le circuit recyclé.

Par contre, pour la SOD, il apparaît une différence significative (NK test,  $p<0,05$ ) entre le circuit ouvert avec une valeur moyenne d'activité de  $15724\pm 5976$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine et le circuit recyclé avec une valeur moyenne d'activité de  $19424\pm 7402$  nmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine. Cette différence correspond à un facteur d'induction moyen de 1,2.

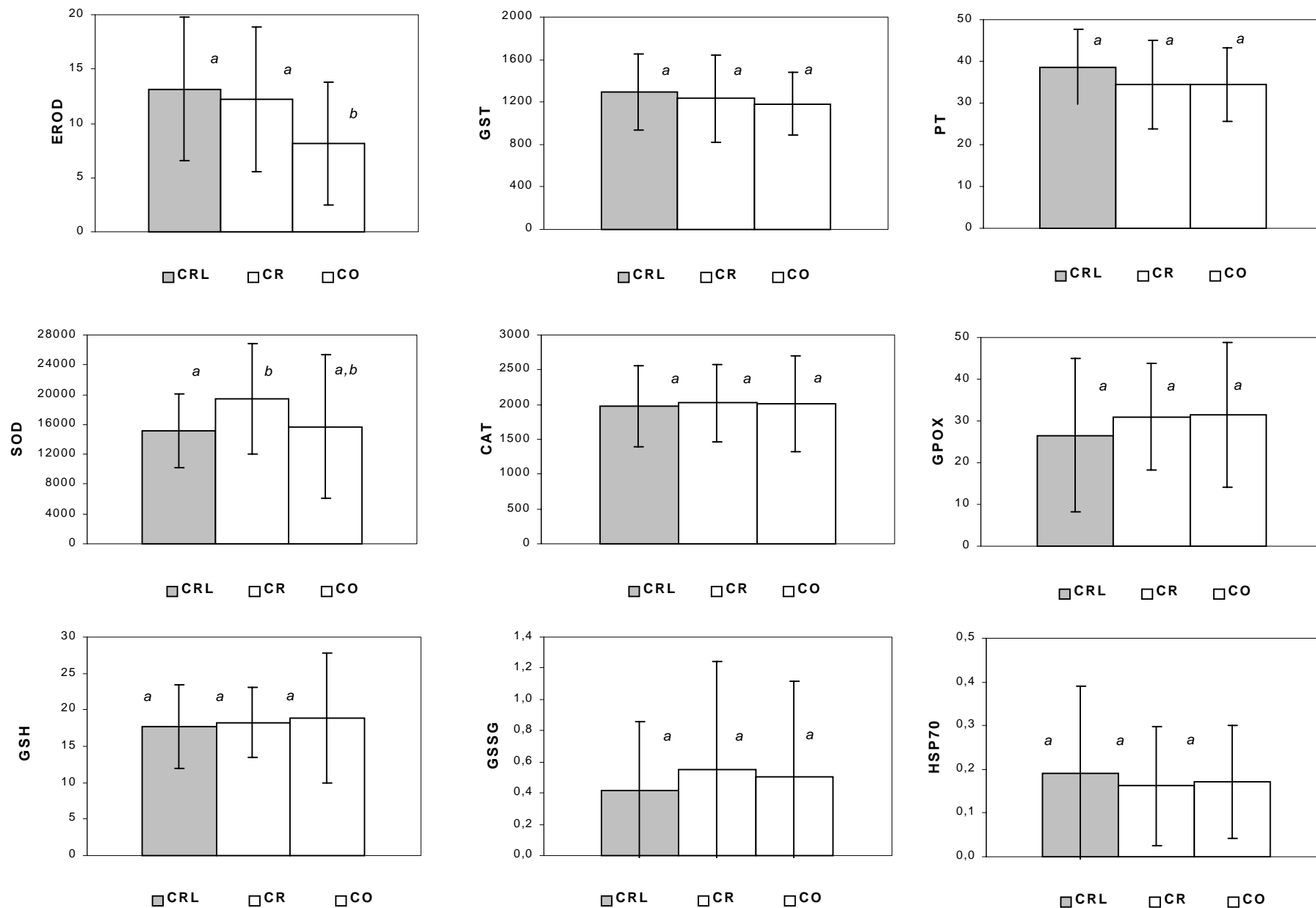
#### II.4.3.5) Le glutathion

Le glutathion total dont les valeurs sont comprises entre  $17,7\pm 5,8$  μmol.g<sup>-1</sup> de protéine pour le circuit recyclé laguné et  $18,9\pm 8,9$  μmol.g<sup>-1</sup> de protéine pour le circuit ouvert, n'est pas différent statistiquement chez les poissons des différents circuits (ANOVA,  $p=0,75$ ). Il en va de même pour le glutathion oxydé puisque, avec des valeurs comprises entre  $0,42\pm 0,44$  et  $0,55\pm 0,69$  μmol.g<sup>-1</sup> de protéine pour les circuits recyclé-laguné et recyclé, respectivement, il n'existe pas de différence significative entre les groupes (ANOVA,  $p=0,68$ ).

Il faut cependant noter qu'il existe pour ces dosages de glutathion, et pour la forme oxydée plus particulièrement, de forts écarts types qui traduisent une variabilité individuelle importante dans un même circuit d'élevage.

#### II.4.3.6) Les protéines de stress

Les protéines de stress HSP70 ne sont pas significativement différentes entre les groupes (KW test,  $p=0,94$ ) et leurs valeurs se situent entre  $0,16\pm 0,14$  UA dans le circuit recyclé et  $0,19\pm 0,20$  UA dans le circuit recyclé-laguné. Comme pour le glutathion, il existe une forte variabilité individuelle chez les poissons issus d'un même élevage.



**Figure II.5: Analyse des biomarqueurs biochimiques chez les bars des trois circuits d'élevage** : protéines totales (PT,  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de foie), Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD,  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéine), glutathion-S-transferase (GST,  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéine), superoxyde dismutase (SOD,  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéine), glutathion peroxydase (GPOX,  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéine), catalase (CAT,  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéine), glutathion total (GSH,  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  de protéine) et oxydé (GSSG,  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  de protéine), protéines de stress (HSP70, UA normalisées)

#### II.4.3.7) Discussion sur l'analyse des biomarqueurs

L'analyse des biomarqueurs biochimiques fait apparaître plusieurs résultats :

Tout d'abord les données biométriques montrent que les poissons issus du circuit ouvert sont plus grands et plus gros que ceux issus des circuits recyclés. Ce résultat confirme les résultats obtenus sur la croissance des poissons (cf. Chapitre I) et montre que les lots de poissons prélevés au hasard pour ces analyses sont représentatifs des circuits dont ils sont issus. Par contre il n'y a pas de modification des indices de condition chez ces poissons, ce qui signifie qu'il n'y a pas de réorganisation globale de leurs réserves énergétiques et que la taille de leurs foies est homogène. Toutefois ces résultats ne permettent pas de statuer sur la qualité de l'eau, car ces paramètres sont très peu sensibles. Les teneurs en protéines hépatiques trouvées identiques dans les circuits, montrent que la synthèse des protéines n'est pas perturbée et viennent renforcer l'hypothèse que les foies fonctionnent normalement chez tous les poissons.

Les mesures de l'activité EROD font apparaître une induction chez les poissons des circuits recyclés avec et sans lagunage suggérant que les poissons sont en contact avec un polluant dans ces circuits. Si cette induction est significative, elle est toutefois faible (1,5 et 1,6 fois pour le circuit recyclé et recyclé-laguné, respectivement) par rapport aux valeurs habituellement mesurées avec des polluants et on peut penser qu'en l'absence de référence standard on se situe dans une gamme de normalité physiologique de l'activité EROD pour cette espèce dans tous les circuits.

L'activité EROD est influencée par la maturation sexuelle, l'alimentation et les paramètres de qualité de l'eau (Whyte et al., 2000). Dans nos circuits la maturation sexuelle est inhibée grâce à une photopériode et une température constantes toute l'année, l'alimentation n'est pas limitée et les paramètres de qualité de l'eau ont été contrôlés. Néanmoins les différences moyennes de 1,5 point pH et de 2,5 mg.l<sup>-1</sup> de concentration en oxygène entre le circuit ouvert et les circuits recyclés le jour du prélèvement, bien que faibles, peuvent être à l'origine des différences d'EROD observées.

Cependant la plupart des fortes à très fortes inductions EROD mesurées proviennent d'études de laboratoire où les poissons sont exposés à des doses de contaminant très importantes alors que de faibles inductions ont déjà été observées lors d'expérience de terrain où la pollution est diluée ce qui correspond plus à nos conditions d'expérience (Tableau II.1). Des polluants traces, contenus dans l'aliment, pourraient s'accumuler dans les circuits d'élevage et provoquer une augmentation de l'EROD.

Parmi ces polluants, les HAP's et les PCB's sont des polluants agonistes avérés du récepteur Ah mais les substances jaunes ou substances humiques qui sont suspectés d'avoir un effet délétère sur la croissance des poissons (Hirayama et al., 1988) et qui s'accumulent dans les circuits recyclés, sont des composés organiques carbonés (Léonard, 2002) qui pourraient théoriquement avoir une affinité pour ce récepteur.

Il est également envisageable qu'il y ait plusieurs polluants traces qui s'accumulent dans les circuits recyclés et parmi eux des inducteurs et des inhibiteurs de l'activité EROD, ce qui expliquerait cette faible induction comme cela a été démontré pour des bars exposés à un rejet d'effluent urbain/industriel dans le milieu naturel (Gravato et Santos, 2003a).

Enfin une dernière hypothèse serait que l'activité EROD est inhibée dans le circuit ouvert par une exposition chronique à un polluant faiblement concentré dans l'eau de mer pompée pour alimenter les bassins. Ce phénomène a été observé chez des bars exposés à des effluents portuaires (Gravato et al., 2000) mais aussi aux HAP's et au B(a)P (Gravato et Santos, 2003b) à des concentrations habituellement rencontrées dans l'environnement.

Ces hypothèses doivent amener à rechercher une exposition des poissons à un ou plusieurs polluant présent(s) dans l'aliment ou dans l'eau de mer. L'activité EROD étant un biomarqueur prédictif d'un effet délétère sur la santé (Whyte et al., 2000). Il serait également intéressant de rechercher un effet possible du circuit d'élevage sur différentes fonctions biologiques des poissons.

Les résultats obtenus pour la GST, enzyme de transformation de phase II, ne montre pas de différence entre les circuits mais les valeurs observées ont la même tendance que celles de l'EROD. Bien que cette enzyme ne soit pas toujours modifiée par un site pollué, elle n'apporte pas d'élément en faveur de polluant(s) présent(s) dans les circuits recyclés.

En ce qui concerne les indicateurs du stress oxydant, les résultats ne sont pas homogènes puisque seule la SOD est augmentée dans le circuit recyclé sans lagunage. Cependant l'augmentation de la SOD a été décrite dans la plupart des études effectuées sur des sites pollués, alors que le plus souvent la GPOX n'est pas modifiée et la CAT est autant augmentée que non modifiée (Van der Oost et al., 2003). Dès lors, l'induction de la SOD signifierait qu'il existe un polluant inducteur d'un stress oxydant dans le circuit recyclé et que celui-ci est inhibé par le traitement par le LHRA dans le circuit recyclé-laguné.

L'accumulation de cadmium dans le foie des poissons recyclés pourrait être à l'origine d'un tel stress car la concentration hépatique de cadmium a été trouvée corrélée positivement avec la SOD dans nos circuits (Spearman,  $r=0,403$  ;  $P=0,037$ ) et un tel phénomène a déjà été

observé par Almeida et al. (2002) chez le tilapia du Nil. De plus le cadmium est un toxique connu pour sa capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène et créer des dommages au niveau cellulaire (Livingstone, 2001). Le faible niveau d'induction de la SOD, qui est en conformité avec les valeurs mesurées lors de précédentes études (Tableau II.2), ne permet pas de mesurer l'importance du stress oxydant dans le circuit recyclé mais le fait que ce facteur soit isolé parmi d'autres est en faveur d'un faible niveau de pollution.

L'étude du glutathion montre que ses teneurs en forme réduite et oxydée ne sont pas modifiées dans les circuits, ce qui est en faveur d'une absence de pollution mais qui ne permet pas de l'affirmer car ces composés sont restaurés dans la cellule par un phénomène de feedback. Toutefois le ratio GSH/GSSG moyen est égal  $107 \pm 95$ ,  $120 \pm 121$ ,  $133 \pm 112$  dans les circuits ouvert, recyclé et recyclé-laguné respectivement, et donc très supérieur à 10/1 malgré des variations individuelles importantes.

Les protéines de stress HSP70 ne sont pas différentes chez les groupes de poissons testés ce qui indique qu'il n'y a pas de conditions différentes en terme de stress dans les circuits. Il n'y aurait donc pas de paramètres de la qualité de l'eau (température, salinité, pH et concentration en oxygène) ou de présence de xénobiotiques (dont les métaux lourds), qui générerait un stress dans les différents circuits. Toutefois, l'interprétation des résultats HSP70 doit être prudente car ce biomarqueur est assez récent et il a surtout été étudié au laboratoire sur des cellules des poissons.

## **II. 5) Conclusion**

Des bars ont été élevés pendant un an dans trois circuits d'élevage : un circuit ouvert, un circuit recyclé et un circuit recyclé avec un lagunage à haut rendement algal (LHRA). Tous les poissons ont été nourris avec le même aliment, mais le taux de renouvellement de l'eau neuve dans le circuit ouvert a été en moyenne 60 fois plus important que dans les deux circuits recyclés. Pour expliquer la différence de croissance des poissons entre les circuits, nous avons d'une part mesuré la bioaccumulation des métaux et d'autre part dosé certains biomarqueurs de détoxification utilisés pour mesurer l'exposition à et/ou l'effet de polluants dans les milieux aquatiques environnementaux.

Le dosage des métaux montre des écarts importants entre les individus issus d'un même circuit mais l'analyse statistique révèle que sur les douze métaux analysés, sept et quatre d'entre eux s'accumulent, respectivement, dans le muscle et le foie des poissons du circuit recyclé. Le traitement par le LHRA permet de supprimer la bioaccumulation de ces métaux dans les poissons du circuit recyclé-laguné sauf pour le chrome et l'arsenic. Toutefois, les niveaux de métaux accumulés sont équivalents ou inférieurs à ceux mesurés habituellement dans les poissons élevés ou pêchés et ils sont très inférieurs aux concentrations recommandées par la FAO/WHO pour la consommation humaine.

L'analyse des biomarqueurs a révélé une faible induction de l'activité EROD chez les poissons des deux circuits recyclés évoquant un faible niveau de pollution organique dans ces circuits et une induction de la SOD dans le circuit recyclé sans lagunage, qui serait liée à l'accumulation de cadmium dans le foie de ces poissons.

Il apparaît donc que malgré, un bon état général des poissons dans tous les systèmes d'élevage, la réutilisation de l'eau est à l'origine d'une faible mais significative bioaccumulation de métaux dans le muscle et le foie des poissons et d'un faible niveau d'activation des enzymes de détoxification. Le traitement par le LHRA permet d'éviter l'accumulation de la majorité de ces métaux et de supprimer le stress oxydant à l'origine de l'induction de la SOD dans les poissons des circuits recyclés, mais n'élimine pas le ou les composés à l'origine de l'induction de l'EROD.

L'utilisation des biomarqueurs d'accumulation et biochimiques est puissante car elle permet d'intégrer les aspects environnementaux, toxicologiques et écologique qui contrôlent l'exposition et l'effet des contaminants. Il existe un intérêt majeur d'utiliser ces biomarqueurs en aquaculture : les principaux facteurs qui réduisent la signifiante de leurs résultats dans l'environnement (sex ratio, état nutritionnel, reproduction, croissance, saison, densité, température, salinité, pH, anoxie...) sont contrôlés ou connus. Il est donc envisageable d'établir des valeurs standards de biomarqueurs d'accumulation et biochimiques pour chaque espèce cultivée afin de pouvoir évaluer la qualité de l'eau d'élevage et de disposer d'outils précoces de diagnostic de la santé des poissons dans les élevages.



### III.1) Introduction

L'aquaculture, qui connaît un développement rapide depuis le début des années soixante dix, a pris très tôt en compte les problèmes de pollution et notamment celle des milieux aquatiques récepteurs des rejets d'élevage. Parmi les divers facteurs de pollution potentiellement présents dans ces rejets (bactéries, parasites, antibiotiques, gamètes, poissons...), les sels nutritifs contribuent au phénomène d'eutrophisation des milieux aquatiques, qui est un problème décrit à l'échelle mondiale. «La progression de l'enrichissement d'un milieu» est le sens étymologique de l'eutrophisation et on retiendra la notion d'état enrichi à un point tel qu'il en résulte des nuisances pour l'écosystème. Les conséquences de l'enrichissement sont la production d'une biomasse algale excessive et l'hypoxie plus ou moins sévère qui résulte de la dégradation de cet excès de matière organique.

En aquaculture, parmi les solutions recherchées pour limiter les rejets (réduction à la source, dilution au large des côtes, épandage en marais, polyculture...) le traitement par les algues est très prometteur. Le lagunage est une technique épuratoire qui a l'avantage d'être simple et de faible coût. Elle consiste à reproduire les phénomènes d'auto épuration qui sont réalisés naturellement dans les milieux aquatiques en réponse aux apports de matière organique et de sels nutritifs. Les bactéries aérobies et les algues agissent en coopération dans le processus d'épuration : les algues absorbent les sels nutritifs pour leur photosynthèse et libèrent de l'oxygène, qui est utilisé par les bactéries pour minéraliser la matière organique. Cependant, l'un des problèmes majeurs de cette technique est l'importante surface nécessaire pour les bassins ( $10 \text{ m}^2 \cdot \text{équivalent.habitant}^{-1}$ ; Moersdik, 1992). En 1963 Oswald propose la technique du lagunage à Haut Rendement Algal (LHRA), dont le but est d'améliorer l'épuration des eaux usées en favorisant une production algale intense.

L'utilisation du LHRA pour le traitement d'effluents piscicoles marins a fait l'objet, depuis plus de 10 ans, d'études conjointes entre le laboratoire « Environnement et santé publique » de l'université de Montpellier I et le « Laboratoire de Recherche Piscicole en Méditerranée » à la station Ifremer de Palavas-les-Flots.

Dans une étude récente, Pagand (1999) a montré que ce sont des macroalgues de la famille des Chlorophycées et plus particulièrement des ulvacées qui se développent toute l'année dans ce type d'effluent.

Ces algues ont d'intéressantes capacités épuratoires pour les nitrates, l'ammoniaque et les phosphates avec toutefois d'importantes fluctuations saisonnières. Au cours de cette étude, les temps de séjour testés ont été compris entre 4 à 8 jours, conformément aux recommandations pour le traitement des effluents domestiques et les algues n'ont pas été récoltées mais pouvaient sortir librement avec l'effluent traité.

Des études réalisées sur le traitement d'effluent piscicole marin de circuit ouvert en Israël et en Espagne ont établi qu'un taux de renouvellement des bassins supérieur à 4 volume par jour et une densité d'algue maintenue en dessous de  $2,5 \text{ gPF.l}^{-1}$  (Jiménez del Rio et al., 1994) ou de  $2 \text{ kgPF.m}^{-2}$  (Neori et al., 1991) sont nécessaires pour avoir une croissance algale et une absorption de l'azote maximales. Le taux d'épuration d'azote et la croissance des algues qu'ils ont mesuré sont supérieurs à ceux obtenus par Pagand (1999).

Au cours de ces études, certains auteurs ont émis l'hypothèse d'une limitation de la croissance algale par le carbone inorganique dissous (CID) pour des densités algales élevées et pour des taux de renouvellement faibles, tandis que d'autres études *in vitro*, ont mis en évidence une limitation des capacités photosynthétiques des algues par le CID en eau de mer naturelle (Frost-Christensen, 1990 ; Levavasseur et al., 1991).

Dans le cadre de cette étude, nous avons voulu tester les conditions de fonctionnement optimales du LHRA pour traiter un effluent recyclé. Les objectifs que nous nous sommes fixés pour y parvenir sont :

- de déterminer les densités algales et les taux de renouvellement des bassins, en fonction des conditions climatiques annuelles locales, pour optimiser l'épuration de l'azote et du phosphore ainsi que la croissance algale.

- d'établir, *in vitro*, l'existence éventuelle d'une limitation des capacités photosynthétiques des algues par le carbone inorganique dissous.

## III.2) Bibliographie

### III.2.1) Description du lagunage à haut rendement algal

Les travaux sur le lagunage se sont multipliés à partir des années 50 sous l'impulsion de Oswald (Oswald et Gotaas, 1957 ; Oswald, 1963 ; Nurdogan et Oswald, 1995) pour mettre au point une technique optimisant l'épuration des eaux et de la production d'algues : le lagunage à haut rendement algal ou LHRA.

Le LHRA diffère du lagunage classique par une plus faible profondeur des bassins (quelques dizaines de centimètres), un brassage intermittent ou continu, un temps de séjour bref (quelques jours) et une absence d'accumulation de boues (Fallowfield et Garrett, 1985). L'agitation modifie le cycle lumière obscurité des algues puisqu'elles sont entraînées par la masse d'eau. Elles sont soumises à une succession de flashes lumineux qui favorisent leur croissance (Richmond et al., 1980 ; Bosca et Dauta, 1991).

Les bassins de LHRA étaient d'abord destinés à recevoir des eaux usées, eaux douces d'origine domestique (Canovas et al., 1991 ; Shelef et al., 1978), eaux industrielles comme pour les effluents d'industrie de fertilisants (Przytocka et al., 1984) ou eaux agricoles comme pour les effluents de porcherie (De Pauw et al., 1980). Dans ces eaux usées douces se sont des microalgues qui assurent le traitement de l'effluent.

Les différentes espèces d'algues qui se développent dépendent des caractéristiques physico chimique de l'effluent et du milieu extérieur : la composition en nutriments, la température et l'éclairement.

Pagand (1999) a observé que la biomasse algale qui se développe toute l'année dans un bassin de LHRA alimenté avec un effluent marin de lous (*Dicentrarchus labrax*) en circuit recyclé est à 99% de type macroalgale. Le développement du phytoplancton, (quelques pics pendant l'année), est en compétition défavorable avec celui des macroalgues.

Les espèces présentes ont été majoritairement des chlorophycées ubiquistes des genres *Ulva* et *Enteromorpha*. Quelques *Ectocarpus* se sont développés pendant la période hivernale puis ont disparu au printemps.

## **III.2.2) Absorption des nutriments et croissance chez les Chlorophycées**

### III.2.2.1) Présentation générale

En systématique, les algues majoritaires de nos LHRA appartiennent à la classe des Chlorophycées, l'ordre des *Ulothricales*, famille des Ulvacées. Dans le milieu naturel, ce sont des algues opportunistes qui se développent spontanément dans les zones riches en sels nutritifs dès que les conditions climatiques le permettent.

Les algues ont un thalle simple, non différencié, qui possède une activité photosynthétique intense et des vitesses d'absorption des sels nutritifs rapides.

Ce sont des espèces très cosmopolites qui tolèrent de fortes variations de salinité (de 16 à 50 g/l pour *Enteromorpha* et de 16 à 36 g/l pour *Ulva*) et de température (DeBusk et al., 1986). La température comme la salinité, interviennent au niveau de la diversité spécifique et des successions de population algale, l'importance des écarts réduisant la diversité (Chassagny de Casabianca, M.-L., 1988). La lumière est un facteur essentiel dans le développement des macrophytes puisque celle-ci intervient directement dans la photosynthèse.

### III.2.2.2) L'épuration de l'azote

#### **III.2.2.2.1) Mécanismes physiologiques d'absorption des algues**

Les ulvacées sont habituellement considérées comme nitrophiles (Zavodnik, 1987 ; Corzo et Niell, 1992). L'ion nitrate est transporté à l'intérieur de la cellule par un processus actif qui serait stimulé par la présence de l'anion dans le milieu (Lee et Drew, 1986 ; Hole et al., 1990). Il est réduit en nitrite sous l'action de la nitrate réductase qui serait le facteur limitant de la réaction globale, car elle a une faible affinité pour son substrat. Sa synthèse est néanmoins induite par le substrat (Falkowski, 1975; Hole et al., 1990) et par la lumière mais serait réprimée par l'ammoniaque (Guerrero et al., 1981). Les nitrites sont secondairement réduits en ammonium par la nitrite réductase qui est très affine pour son substrat. L'ammonium constitue la forme d'incorporation dans les molécules organiques.

La cinétique d'absorption des nitrates dépend de l'espèce algale, de la disponibilité en nutriments et de la température à laquelle sont sensibles les systèmes enzymatiques.

Ceci permet de mettre en évidence la complexité du mécanisme d'absorption des algues qui utilisent les nitrates pour leur croissance au cours de leur photosynthèse, mais qui sont également capables de stocker les nitrates dans leur vacuole quand l'énergie n'est pas disponible en quantité suffisante c'est à dire quand la lumière est insuffisante. Plusieurs auteurs (Lundberg et al., 1989 ; Corzo et Niell, 1992) ont mis en évidence un phénomène de stockage des nitrates chez plusieurs espèces de macroalgues dont *Ulva lactuca*. Ce stockage temporaire entre l'absorption et l'assimilation permettrait à l'algue de ne pas être totalement dépendante de la disponibilité immédiate dans le milieu extérieur en anticipant sur ses besoins ultérieurs.

Les cinétiques d'absorption des nitrates les plus couramment observées dans la littérature ont l'allure d'une fonction hyperbolique de la concentration dans le milieu extérieur et sont modélisées par l'équation de Michaelis-Menten (Gordon et al., 1981 ; Wallentinus, 1984). Pourtant, Lavery et Mc Comb (1991b) ont mis en évidence des cinétiques linaires d'absorption de l'azote d'ulves lagunaires qui révèle une adaptation de l'algue aux conditions hypertrophiques. Cette adaptation consisterait en une diminution de l'affinité des systèmes responsables de l'assimilation, en réponse à une disponibilité des nitrates importante et continue sur de longues périodes.

Les paramètres cinétiques de l'absorption des nitrates pour les chlorophycées des genres *Ulva*, *Enteromorpha* et *Cladophora* sont comprises entre 0,4 et 2,3 mgN.gPS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour la vitesse maximale et entre 1,4E-02 et 0,25 mgN.l<sup>-1</sup> pour la constante de demi saturation. Cependant, ces études concernent des algues prélevées dans l'environnement et les gammes de concentrations testées ne dépassent pas 5 mg.l<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

#### **III.2.2.2.2) Traitement d'effluent marin piscicoles**

Les effluents piscicoles issues des circuits recyclés industriels ont couramment des concentrations de l'ordre de la dizaine de mg.l<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Or, d'après Duke et al. (1986) une trop forte concentration en nutriment serait toxique pour les ulves.

En 1997, Ausseil, O. a réalisé, à l'Ifremer Palavas, une étude sur l'absorption des nutriments par des ulves issues des bassins de LHRA et cultivées en aquarium sous lumière saturante et température non limitante. Il a observé que la vitesse d'absorption des nitrates est deux fois plus élevés à 28 mg.l<sup>-1</sup> qu'à 7 mg.l<sup>-1</sup>, mais que la croissance n'est pas significativement différente. Cela signifie que, dans ces conditions de fortes concentrations, les ulves ne périssent pas et stockent la plus grande partie des nitrates.

Pagand (1999) a étudié pendant 2 ans l'épuration des nutriments dans le LHRA. Les concentrations moyennes de l'effluent de circuit recyclé ont été de  $10,2 \pm 7,05 \text{ mg-N.l}^{-1}$  en azote inorganique total, dont 90% sous forme de nitrates. Le taux de renouvellement du bassin était de  $0,25 \text{ vol.j}^{-1}$  sauf pendant 6 mois où il a été de  $0,13 \text{ vol.j}^{-1}$  et les algues n'étaient pas récoltées dans le bassin mais pouvaient sortir librement par une surverse en même temps que l'eau. Les prélèvements en entrée et en sortie de lagunage ont été effectués à 14 heures c'est à dire au moment où, théoriquement, la photosynthèse est maximale dans le LHRA.

Il observe une épuration globale sur l'année de 52% de l'azote inorganique total avec une forte influence saisonnière c'est à dire des minima en hiver (24-31%) et des maxima pendant la période estivale (70-98%). L'épuration montre de grande différences selon la forme azotée : l'ammoniacale est éliminé à 94%, le nitrate à 50% et le nitrite à 21%. Il constate également que l'apport d'azote en entrée de LHRA a un effet sur le rendement épuratoire. Plus l'apport est important et plus le rendement est faible mais plus la quantité d'azote éliminée est importante. Pagand observe une absorption annuelle moyenne de  $1,6 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour un influx annuel de  $0,8$  à  $1,9 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ . Il ne constate pas d'amélioration avec l'augmentation du temps de séjour à 8 jours.

Les études réalisées en Israël par Cohen et Neori (1991) ont montrés l'efficacité d'une culture d'ulve (*Ulva lactuca*) pour absorber l'azote sous forme ammoniacale d'un effluent marin provenant d'un élevage de Daurade (*Sparus aurata*). Ils ont montré que la cinétique d'absorption s'ajuste à une courbe Michaëlienne où l'assimilation maximale de  $\text{N-NH}_4^+$  est proche de  $2,5 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ . Les prélèvements ont été effectués à 9h00 du matin car ils ont montré qu'à cette heure, la concentration de l'effluent en entrée et en sortie de lagunage est représentative de la concentration moyenne sur la journée. Elle a été comprise entre  $0,1$ - $1 \text{ mg-N.l}^{-1}$  dans l'effluent d'entrée. Les taux de renouvellement testées ont été de  $4$  à  $12 \text{ vol.j}^{-1}$ .

Jimenez Del Rio et al. (1994) a mesuré que les conditions optimales d'épuration de l'ammoniacale d'un effluent d'élevage de Daurades (*Sparus aurata*) par *Ulva rigida* étaient obtenues avec une densité algale de  $2,7 \text{ g PF.l}^{-1}$ , un influx d'ammoniacale d'au moins  $2,1 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  et un taux de renouvellement d'au moins  $12 \text{ vol.j}^{-1}$ . Sous ces conditions, on obtient une production algale de  $27 \text{ gPS.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  et une absorption d'ammoniacale de  $1,5 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ . En 1996, Jimenez Del Rio et al. ont obtenus les taux d'absorption maximaux de  $2,2 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  en juillet et de  $1,1 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  en hiver avec les influx maximaux de  $6,7 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  correspondant à un taux de renouvellement de  $12 \text{ vol.j}^{-1}$ . Pour l'épuration de l'azote, les calculs ont été faits à partir de moyennes sur 24 heures avec des prélèvements toutes les trois heures.

Neori (1996) a mis en évidence, sur le même circuit que précédemment, que pour une même efficacité d'épuration de l'azote il faut un apport trois fois plus important de nitrate que d'ammoniaque. De plus, l'ammoniaque inhiberait l'absorption des nitrates à partir d'une concentration de 0,03 mg-N.l<sup>-1</sup>.

### III.2.2.3) L'épuration des phosphates

#### III.2.2.3.1) Mécanismes physiologiques d'absorption des algues

Le phosphore joue un rôle majeur dans la cellule algale car il intervient notamment dans de nombreux processus enzymatiques et entre dans la composition des acides nucléiques (ADN,ARN) et des composés énergétiques (ATP). Ces interventions à de multiples niveaux rendent complexes les facteurs qui régulent son assimilation et sa compartimentation interne. Ceux-ci sont encore relativement mal connus. Il semble cependant acquis que le transport à l'intérieur de la cellule est un processus actif qui fait intervenir la polarité membranaire et le pH, au travers d'un co-transport avec des protons. La pompe à protons serait d'autant plus active que la concentration en phosphate dans le milieu extérieur serait élevée. La concentration cytoplasmique de phosphate fait l'objet d'une régulation stricte, dont le principal mécanisme s'effectue au niveau de l'absorption par un système de régulation en retour ou feed-back (Lundberg et al., 1989). Cela se traduit chez *Ulva lactuca* par une absorption qui ne peut avoir lieu qu'avec une énergie suffisante pour permettre une transformation immédiate des ions absorbés sous une forme de stockage. Ce mécanisme, qui dépend de l'énergie fournie par l'activité photosynthétique, aurait pour but de ne pas influencer sur la concentration cytoplasmique. Ces stocks potentiellement importants demeureraient dans les vacuoles jusqu'à ce que l'absorption ne permette plus de subvenir aux besoins de la croissance.

Ces mécanismes complexes de régulation de la concentration cytoplasmique, se traduisent par des cinétiques qui sont aussi bien dans le sens d'un afflux que d'un efflux de phosphate (Bialeski et Ferguson, 1983). Comme pour les nitrates, la résultante globale est, alors, dans la plupart des cas, une fonction hyperbolique simple de la concentration extérieure (modèle michaelien) mais des cinétiques plus complexes où semblent intervenir plusieurs systèmes d'absorption sont néanmoins observées par certains auteurs (Bialeski et Ferguson, 1983). D'une manière générale, l'augmentation de la vitesse maximale (qui révèle la réponse aux fortes concentrations) s'accompagne d'une diminution des potentialités aux faibles concentrations.

Les paramètres cinétiques de l'absorption des phosphates pour les chlorophycées (genres *Ulva*, *Enteromorpha* et *Cladophora*), trouvés dans la littérature, sont compris entre  $5E-03$  et  $0,2 \text{ mgP.l}^{-1}$  pour la constante de demi saturation et entre  $0,03$  et  $1,09 \text{ mgP.gPS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  pour la vitesse maximale (Gordon et al., 1981 ; Wallentinus, 1984 ; Lavery et McComb, 1991b). Les gammes de concentrations de phosphates testées sont conformes à celles trouvées dans l'environnement et ne dépassent pas  $0,25 \text{ mgP.l}^{-1}$ .

### III.2.2.3.2) Traitement des effluents marins piscicoles

Comme dans le cas des nitrates, Ausseil, O. (1997) a montré que l'absorption des phosphates par les ulves du LHRA est 4 fois plus élevée à  $4,8 \text{ mgP.l}^{-1}$  qu'à  $1,6 \text{ mgP.l}^{-1}$  alors que la croissance algale n'est pas significativement différente. Cela confirme que dans les conditions de fortes concentrations, les ulves stockent la plus grande partie des nutriments.

Un autre phénomène important intervient dans l'épuration des phosphates en milieu marin. En effet, l'eau de mer a la particularité d'être riche en calcium, capable de réagir avec les phosphates pour former du phosphate tricalcique amorphe qui précipite lorsque le pH est supérieur à 8, ce qui favorise l'abattement de ce sel nutritif (Mesplé et al, 1996). Il faut préciser que ce phénomène est réversible et que le précipité de phosphate tricalcique peut se dissoudre dans l'eau lorsque le pH est inférieur à 8.

Doran et Boyle (1979) ont étudié, à l'échelle du laboratoire, l'abattement du phosphore par les algues. L'abattement total varie de 70 à 95% suivant le temps de séjour (respectivement de 4 et 12 heures) et la précipitation chimique est à l'origine de 90% de l'abattement total, les 10% restant se trouvant dans la biomasse algale. Pour Moutin (1992) la concentration en phosphate dans le LHRA dépend uniquement du pH, l'assimilation algale étant considérée comme un phénomène secondaire. Par contre, Mesplé et al. (1996) dans leur modèle des bassins de LHRA montre que la quantité de phosphore absorbée par les algues est toujours supérieure à celle précipitée, ce qui est important pour la gestion de ce type de lagunage : en effet, si maintenir le pH à des valeurs élevées permet de favoriser l'élimination par précipitation il est possible, selon eux, d'au moins doubler l'abattement du phosphore total en récoltant les algues.

Dans l'étude de Pagand (1999), sur 2 ans les concentrations moyennes en phosphates de l'effluent de circuit recyclé ont été de  $1,45 \pm 5,43 \text{ mg-P.l}^{-1}$ . L'épuration annuelle globale des phosphates a été de 54% avec d'importantes fluctuations saisonnières : les meilleurs



rendements sont observés pendant la période estivale alors que les plus faibles, parfois négatifs, sont observés l'hiver. L'augmentation des apports de phosphate en entrée de lagunage semble diminuer le rendement épuratoire mais augmenter la quantité totale de phosphates éliminés. Une absorption maximale de  $0,27 \text{ gP}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$  est obtenue pour un influx moyen de  $0,39 \text{ gP}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$  et un temps de séjour de 7,5 jours.

#### III.2.2.4) La croissance algale

##### III.2.2.4.1) Généralités

L'assimilation des nutriments pour la production primaire des macroalgues est exprimée par un rapport molaire C/N/P de 550/30/1 (Atkinson et Smith, 1983).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'azote et le phosphore ne sont pas limitants dans le LHRA : leurs concentrations sont toujours supérieures au seuil en dessous duquel elles limiteraient la croissance algale. Pagand (1999) a montré que dans le LHRA alimenté avec des effluents de circuit recyclé riches en carbone organique dissous, ce dernier n'est pas assimilé pour la croissance des algues. Pour leur photosynthèse, les algues assimilent le carbone inorganique dissous sous forme de  $\text{CO}_2$  ou sous forme  $\text{HCO}_3^-$  (Björk et al., 1992). Or, dans les circuits recyclés, la concentration en  $\text{CO}_2$  est contrôlée et maintenue en dessous de 20-30  $\text{mg}\cdot\text{C}\cdot\text{l}^{-1}$  pour ne pas altérer la croissance des poissons de l'élevage (Blancheton, 2000).

La production de la biomasse algale dans les LHRA dépend quasi uniquement des variables non contrôlables que sont la température et l'intensité lumineuse (Azov et Shelef, 1982). La température peut moduler l'activité photosynthétique et donc la croissance des algues, des températures extrêmes limitant l'activité photosynthétique (mort des cellules ou réduction de l'activité métabolique cellulaire).

Cependant, Fallowfield et Garrett (1985) insistent sur le fait que plus que le rayonnement incident, c'est la concentration en algues influençant la pénétration de la lumière dans les bassins qui est importante pour la production de biomasse.

Ce phénomène, appelé auto ombrage, provoque une extinction de la lumière incidente en fonction de la profondeur et peut atteindre 98% d'abattement au fond de nos bassins de LHRA (Deville, 1999). Pour Mesplé (1993), une périodicité adéquate des récoltes permet une meilleure pénétration de la lumière dans la masse d'eau et donc favorise la croissance algale.

#### III.2.2.4.2) Traitement d'effluent marin piscicoles

Vandermeulen et Gordin (1990) ont étudié la croissance d'ulves en culture avec un effluent piscicole riche en ammoniacale. D'après leurs travaux, le taux de croissance augmente avec la lumière et la température. Augmenter la densité algale ne réduit pas significativement le taux de croissance jusqu'à une densité testée de  $4 \text{ kgPF.m}^{-2}$ , mais le carbone peut devenir limitant au delà. Augmenter le taux de renouvellement de l'effluent augmente le taux de croissance, mais la différence est significative seulement pour les taux élevés (de 6 à  $8 \text{ vol.j}^{-1}$ ).

Une étude similaire menée par Neori et al. (1991), montre que le rendement maximal d'*Ulva lactuca* est de  $55 \text{ g PS.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  et que lorsque la densité algale augmente jusqu'à  $6 \text{ kg PF.m}^{-2}$ , le rendement algal et le ratio C:N diminuent. Ceci s'explique probablement par un stockage de l'azote et une limitation de la croissance par la lumière. Enfin, pour un rendement algal et une teneur en azote algal optimales, *U. lactuca* doit avoir une densité comprise entre 1 et  $2 \text{ kg PF.m}^{-2}$  et le flux d'ammonium doit être de l'ordre de  $7 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ .

Pour Jiménez del Rio et al. (1996) qui ont étudié le même type de culture d'ulve, le rendement algal maximal de  $40 \text{ g PS.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  est atteint pour une densité de  $2,5 \text{ g PF.l}^{-1}$  et diminue aux hautes densités ( $6 \text{ g PF.l}^{-1}$ ). De plus, l'augmentation du flux de  $4 \text{ vol.j}^{-1}$  à  $12 \text{ vol.j}^{-1}$  n'a pas d'effet sur le rendement algal et ce dernier est limité pour des flux inférieurs à  $1,2 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  toute l'année.

Au cours de son étude, Pagand (1999) n'a pas mesuré les densités algales dans les bassins de LHRA, mais il a récupérées sur un tamis les algues qui sortaient librement avec l'eau de sortie, les a séchées puis pesées. La biomasse de macroalgues exportées du bassin suit une évolution saisonnière avec une moyenne de  $16 \text{ gPS.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  en été et de  $1 \text{ gPS.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  en hiver.

### **III.2.3) L'activité photosynthétique des algues**

#### III.2.3.1) Les ulves

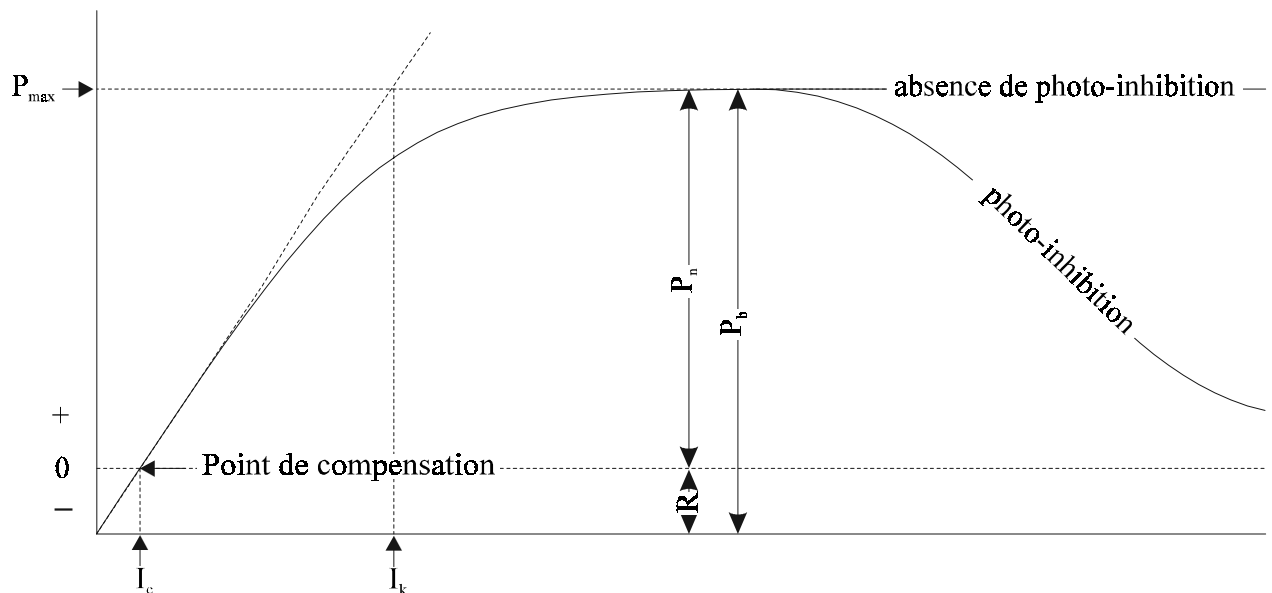
Les ulves sont des algues opportunistes et ubiquistes de l'environnement que l'on retrouve en quantité importante lorsqu'il y a eutrophisation d'un milieu aquatique marin.

C'est pour cette raison qu'elles ont beaucoup été étudiées à travers le monde et que leur photosynthèse, notamment, est bien détaillée dans la littérature. De plus, elles se développent et sont majoritaires toute l'année dans nos bassins de LHRA alimentés en effluent marin recyclé. C'est pour ces raisons que nous avons choisi cette espèce pour mesurer les capacités photosynthétiques des algues dans les LHRA.

#### III.2.3.2) Les courbes P/I

La photosynthèse est un processus physiologique qui permet aux organismes autotrophes de synthétiser de la matière organique à partir de l'énergie lumineuse. L'activité photosynthétique des ulves se caractérise notamment par une courbe décrivant la production d'oxygène en fonction de l'intensité lumineuse, linéairement corrélée à celle-ci jusqu'à un certain seuil. Au delà de ce seuil apparaît soit un plateau de saturation soit une photoinhibition si l'exposition à la lumière est trop brutale (Arnold et Murray, 1980 ; Henley et al., 1991a et b ; Franklin et al, 1992). Si l'exposition à une lumière intense (supérieure au seuil de saturation) est progressive, elle conduit au contraire à une photoacclimatation. Celle-ci se manifeste par une augmentation de la production maximale et de la respiration, une synthèse de Rubisco qui constitue la carboxylase majeure chez les Chlorophycées et une adaptation qualitative et quantitative du contenu pigmentaire (Rosenberg et Ramus, 1982 ; Henley et al., 1991a et b).

Largement répandues dans la littérature, les courbes P/I (Fig.III.1) sont très utilisées, en particulier dans les modèles de production de macrophytes (Menesguen, 1992, Solidoro et al., 1997), et décrivent les variations de la production photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse.



**Figure III.1 : Courbe P/I décrivant la production photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse.**

En abscisse on porte l'intensité lumineuse incidente et en ordonnée le taux de production (ou de respiration lorsque la lumière est insuffisante). Avec  $P_{max}$ , la production maximale,  $P_n$ , la production nette,  $P_b$ , la production brute,  $R$ , la respiration,  $I_c$ , l'intensité de compensation et  $I_k$ , l'intensité de saturation.

L'intensité de compensation correspond à l'intensité lumineuse nécessaire pour que la production d'oxygène par la photosynthèse compense la consommation d'oxygène par la respiration et l'intensité de saturation correspond à l'intensité lumineuse à partir de laquelle l'algue ne peut pas produire plus d'oxygène. La respiration correspond à la consommation d'oxygène de l'algue lorsque l'intensité lumineuse est nulle.

Un modèle de régression est en général ajusté sur les mesures pour obtenir les paramètres suivant: l'intensité lumineuse de saturation, l'intensité lumineuse de compensation, la production maximale, la respiration.

Dans la littérature, trois principaux modes d'expression des capacités photosynthétiques sont rencontrés : par unité de pigment, par quantité de biomasse et par unité de surface.

Bien que l'expression des résultats par unité de pigment soit plus proche de la réalité, de nombreuses études donnent les résultats en unité de biomasse ou de surface pour des raisons pratiques.

Les valeurs des paramètres photosynthétiques trouvés dans la littérature proviennent d'études réalisées sur des ulves prélevées dans le milieu naturel à différentes saisons (Levavasseur et Giraud, 1982 ; Rosenberg et Ramus, 1982 ; Fillit, 1995).

Les valeurs sont comprises entre :

375 et 1690  $\mu\text{O}_2 \cdot \text{gPS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pour la production maximale.

38 et 75  $\mu\text{O}_2 \cdot \text{gPS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  pour la production maximale.

80 et 250  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  pour l'intensité de saturation

10 et 40  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  pour l'intensité de compensation

### **III.3) Matériels et méthodes**

#### ***III.3.1) L'absorption des nutriments et la production algale***

##### **III.3.1.1) Schéma expérimental**

Afin de déterminer quel est le mode de fonctionnement annuel optimal pour le lagunage à haut rendement algal, nous avons décidé d'établir quelles sont les influences de la densité algale et du taux de renouvellement des bassins sur l'épuration d'azote et de phosphore ainsi que sur la croissance algale. Quatre séries d'expérience ont été menée dans ce but, à différentes périodes de l'année, en enregistrant la lumière incidente et la température de l'eau des bassins.

On a considéré le printemps et l'été comme saisons favorable à la photosynthèse et l'automne et l'hiver comme saisons défavorables. Plusieurs densités algales et taux de renouvellement sont testés pour chaque type de saison favorable ou défavorable à la photosynthèse.

Les expériences 1 et 2 se sont déroulés pendant 8 semaines en hiver (décembre, janvier & février) et au printemps ( mars, avril, mai). Quatre densités (0.1 ; 0.2 ; 0.4 et 0.6  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) ont

été testées pendant 2 semaines à différents taux de renouvellement (0.25 ; 1 ; 2 et 4 vol. j<sup>-1</sup>). Les algues ont été récoltées tous les 15 jours.

Les expériences 3 et 4 se sont déroulées pendant 8 semaines en été ( juillet & août) et en automne (octobre, novembre). Quatre taux de renouvellements (0.25 ; 1 ; 2 et 4 vol.j<sup>-1</sup>) ont été testées pendant 4 semaines à une densité algale de 0,1 g.l<sup>-1</sup>, qui c'est avérée non limitante pour la photosynthèse au cours des 2 expériences précédentes. Les algues ont été récoltées tous les 6 jours.

Les conditions testées et leur durée sont résumées dans le tableau III.1.

**Tableau III.1: Fréquence de récolte des algues, densités algales et taux de renouvellement testés dans les paramètres les deux LHRA**

	Fréquence de récolte (j)	Densité algale initiale (g PS.l <sup>-1</sup> )		Taux de renouvellement (vol.j <sup>-1</sup> )	
		Lagunage 1	Lagunage 2	Lagunage 1	Lagunage 2
<b>Hiver</b>	15	0,4	0,6	1	1
		0,1	0,2	1	1
		0,6	0,6	1	2
		0,4	0,4	4	0,25
<b>Printemps</b>	15	0,4	0,4	2	1
		0,6	0,6	4	0,25
		0,4	0,6	1	1
		0,2	0,1	1	1
		0,1	0,1	2	4
<b>Eté</b>	6	0,1	0,1	2	1
		0,1	0,1	4	0,25
<b>Automne</b>	6	0,1	0,1	1	0,25
		0,1	0,1	4	2

### III.3.1.2) Détermination taux de renouvellement, densité algale et rendement algal

### III.3.1.2.1) Le taux de renouvellement

Le taux de renouvellement est réglé à l'aide des débitmètres situés dans la salle d'élevage et la valeur du débit en entrée des deux lagunages est mesurée chaque jour à l'aide d'une éprouvette de deux litres et d'un chronomètre.

Il s'exprime en volume de lagunage par jour et se calcule avec la formule suivante :

$$\text{Taux de renouvellement} = Q_{\text{LHR}} / V_{\text{LHR}}$$

Avec :  $Q_{\text{LHR}}$  = débit du bassin de lagunage en  $\text{l.j}^{-1}$

$V_{\text{LHR}}$  = volume du bassin de lagunage en litres

### III.3.1.2.2) La densité algale

Elle est mesurée à l'aide d'un cylindre en PVC ouvert en haut et en bas. Il est plongé en six points du bassin et les algues piégées dans le cylindre sont récoltées avec une épuisette, puis essorées. Les six échantillons d'algues sont pesés, sur une feuille d'aluminium préalablement tarée, permettant de calculer le "poids frais". Ils sont ensuite mis à l'étuve à  $110^{\circ}\text{C}$  pendant 48 heures. Une fois sec, les échantillons sont pesés à nouveau pour obtenir le "poids sec" (PS).

On calcule la densité algale dans les LHRA avec la formule suivante :

$$Da = [\mu \times 1000] / [\Pi \times r^2 \times h]$$

avec:

$Da$  = densité algale en  $\text{g PS.l}^{-1}$

$\mu$  = poids moyen des échantillons (g PS)

$r$  = rayon du cylindre = 0,1 mètre

$h$  = hauteur d'eau dans les bassins = 0,55 mètres

### III.3.1.2.3) Le rendement algal

Il est calculé pour mesurer la croissance algale dans les bassins de lagunages entre deux dates et s'exprime en gramme de poids sec par mètre carré de lagune et par jour ( $\text{gPS.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ ).

Ce paramètre est calculé à partir des résultats de deux biométries algales consécutives grâce à la formule suivante:

$$Ra = [(Da_{i+1} - Da_i) \times V_{\text{LHR}}] / [S_{\text{LHR}} \times t]$$

avec:

Da  $i$  = densité algale initiale (gPS.l<sup>-1</sup>)

Da  $i+1$  = densité algale suivante au bout du temps t (gPS.l<sup>-1</sup>)

V<sub>LHR</sub> = volume du bassin de lagunage (litre)

S<sub>LHR</sub> = surface du bassin de lagunage (m<sup>2</sup>)

t = durée entre les deux biométries successives (jour)

### III.3.1.3) Les analyses physico-chimiques

#### III.3.1.3.1) Les analyses chimiques de l'eau

Les prélèvements d'eau en entrée et en sortie des lagunages (L1 & L2), ont été réalisés 3 fois par semaine à 9h00. L'effluent d'entrée dans les deux lagunages est le même et correspond à l'effluent prélevé en entrée de filtre biologique dans le circuit pilote. L'effluent de sortie des deux lagunages a été prélevé dans les bacs collecteurs correspondant.

Le traitement d'analyse des échantillons a été le même que celui décrit dans le paragraphe I.3.3. Le pH a été mesuré à l'aide d'une électrode combinée Ag/AgCl (ORION®) et les analyses effectués sur ces échantillons ont été :

L'ammoniaque, le nitrite et le nitrate pour calculer l'azote inorganique dissous (NID) et les phosphates (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Les méthodes utilisées sont décrites dans le paragraphe I.3.3.

Le carbone inorganique dissous (CID) mesuré à l'aide du TOC 5000 (Shimadzu®).

Les résultats ont été moyennés en fonction de la période de récolte des algues. Pour chaque rendement algal, on a calculé :

- le taux de renouvellement moyen des bassins de LHRA
- les influx moyens en nutriments en entrée de LHRA qui s'expriment en gramme d'azote ou de phosphore par mètre carré de lagunage et par jour (g .m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup>):

$$\text{Influx} = C_{\text{ENT}} \times Q_{\text{LHR}} / S_{\text{LHR}}$$

avec C<sub>ENT</sub> = concentration moyenne en nutriments dans l'effluent d'entrée en mg.l<sup>-1</sup>

Q<sub>LHR</sub> = débit moyen de l'effluent dans le LHR en l.j<sup>-1</sup>

S<sub>LHR</sub> = surface du LHR en m<sup>2</sup>

- l'absorption moyenne en nutriments dans le LHRA qui s'exprime dans la même unité que l'influx :



$$\text{Absorption} = [ (C_{\text{ENT}} - C_{\text{SOR}}) / 1000 ] \times Q_{\text{LHR}} / S_{\text{LHR}}$$

avec :  $C_{\text{SOR}}$  = concentration moyenne en nutriments dans l'effluent de sortie en  $\text{mg.l}^{-1}$

### **III.3.1.3.2) Les variables climatiques**

Pour mesurer la température de l'eau et la lumière incidente auxquelles les algues sont soumises au cours de l'étude, on utilise des enregistreurs étanches (HOBO Temp /externe Pro et RH/Temp/Lumière) qui mémorisent les valeurs avec un pas de temps de 5 minutes.

Les enregistreurs de lumière ont été placés juste au dessus des bassins et les valeurs sont exprimées en  $\text{lumens.ft}^{-2}$  et converties en  $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Pour chaque rendement algal mesuré, on a calculé :

la lumière incidente moyenne qui prend en compte l'intensité lumineuse incidente et la photopériode.

la température moyenne.

### **III.3.1.4) L'analyse statistique des résultats**

Les résultats ont été étudiés par des analyses de corrélation de Pearson réalisées à l'aide du logiciel Sigmastat<sup>®</sup>. Les paires de variables ayant un coefficient de corrélation ( $\rho$ ) associée à une probabilité (P) inférieure à 0,05 tendent à évoluer ensemble (dans le même sens si  $\rho$  est positif et de façon opposée si  $\rho$  est négatif). Plus  $\rho$  est proche de  $\pm 1$  et plus P est faible, plus la corrélation entre les deux variables est forte.

## **III.3.2) L'activité photosynthétique des algues**

### **III.3.2.1) Schéma expérimental**

Une première expérience cherche à comparer les capacités photosynthétiques des ulves issues du LHRA dans deux types d'eau différent :

les effluents du LHRA

une eau de mer « naturelle » (étang du Prévost).

Quatre échantillons sont testés dans les deux types d'eau et proviennent de thalles différents prélevés au hasard dans les LHRA.

Une deuxième série d'expérience cherche à observer les capacités photosynthétiques instantanées d'une ulve du LHRA soumise à des variations brutales de concentration en carbone inorganique dissous (CID).

Les solutions ont été préparées avec de l'eau de mer du LHRA à laquelle on a rajouté plus ou moins de CID à l'aide d'une solution mère de carbone inorganique titrée à  $1000 \text{ mg-C.l}^{-1}$  ( $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

Six échantillons provenant de thalles différents prélevés au hasard dans les LHRA ont été testés. Chaque échantillon a été passé avec trois concentrations différentes en CID.

### III.3.2.2) Matériel de mesure

#### III.3.2.2.1) Les ulves

Au mois de septembre, les ulves sont prélevées au hasard, la veille de la mesure, dans un des deux LHRA. De petits rectangles d'environ  $0.53 \text{ cm}^2$  sont découpés dans les thalles à l'aide d'un scalpel. Le milieu à tester est prélevé (eaux des LHRA ou de l'étang du Prévost) puis filtré sur filtre Whatman (GF/F,  $0.45 \mu\text{M}$ ) et conservé dans des flacons placés au bain marie à la température du milieu au moment du prélèvement ( $20^\circ\text{C}$ ). Les échantillons d'ulves sont conservés, à l'ombre, dans les flacons correspondant à l'expérience. Cette précaution permet d'éviter une augmentation de la respiration des algues due au traumatisme de la coupe.

#### III.3.2.2.2) Le respiromètre

L'activité photosynthétique des algues est mesurée par un respiromètre Hansatech<sup>®</sup> décrit par Henly et al. (1991). Il comporte une chambre de mesure parfaitement étanche à la lumière, une lampe à intensité réglable et une sonde à oxygène de Clark (platine et argent).

Le morceau de thalle, maintenu dans une grille en plastique de  $0.53 \text{ cm}^2$ , est placé dans la chambre de mesure. Celle-ci contient l'eau de mer à étudier qui est maintenue à  $20^\circ\text{C}$  grâce à un thermo-cryostat. L'eau de mer est homogénéisée en permanence par un agitateur magnétique, afin d'éliminer les erreurs dues à la consommation d'oxygène par la sonde.

Avant chaque manipulation, l'eau de mer est désaturée en oxygène par un bullage d'azote qui permet de faire le zéro. Dans l'obscurité et après un temps de stabilisation, on mesure la respiration de l'algue. Ensuite l'échantillon est exposé à une lumière d'intensité croissante (10, 30, 60, 100, 150, 300, 500 et 1000  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{j}^{-1}$ ) pendant des intervalles de temps de 3 minutes chacun.

Pendant toute la manipulation, les concentrations en oxygène dissous sont mesurées instantanément par la sonde et enregistrées toutes les secondes. Les pentes de l'évolution de la concentration en oxygène en fonction du temps sont déterminées pour chaque période de 3 min. sous Excel<sup>®</sup>.

Pour pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs, les valeurs de production ont été exprimées par unité de surface et par unité de biomasse. Après la mesure, le morceau de thalle est pesé dans une coupelle d'aluminium tarée afin de connaître son poids frais, puis il est placé à l'étuve (50°C pendant 48 heures) et repesé pour déterminer son poids sec.

### III.3.2.2.3) Les analyses chimiques de l'eau

Elles sont effectuées sur l'eau provenant du LHRA et de l'étang du Prévost quand les ulves sont prélevées, et sur les différents milieux d'incubation après adjonction de CID.

Elles concernent :

- l'azote ammoniacal, les nitrites, les nitrates et les phosphates : références et matériels sont décrits dans le paragraphe I.3.3.
- le carbone inorganique dissous : références et matériels sont décrits dans le paragraphe III.3.1.3.1.

### III.3.2.3) L'analyse statistique des résultats

Les paramètres caractérisant les courbes P/I seront déterminés par ajustement sous SigmaPlot<sup>®</sup> d'une courbe de type exponentiel sans photoinhibition (Webb *et al.*, 1974) :

$$P_b = P_{max} \times \left[ 1 - e^{-\left(\frac{I}{I_k}\right)} \right]$$

avec :  $P_b$ , la production brute ( $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{gPS}^{-1}$ ),  $P_{max}$ , le taux maximal de production ( $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{gPS}^{-1}$ ),  $I$ , l'intensité lumineuse ( $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et  $I_k$ , l'intensité de saturation ( $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

### III.4) Résultats et discussions

#### III.4.1) Etude de l'épuration de l'azote, du phosphore et de la croissance algale dans le LHRA

##### III.4.1.1) Absorption de l'azote inorganique dissous dans le LHRA

###### III.4.1.1.1) Caractérisation de l'effluent en entrée des lagunages

La composition en azote inorganique dissous (NID) de l'effluent en entrée des bassins de LHRA a peu varié au cours des différentes saisons étudiées (Tableau III.2). C'est la gestion des apports d'eau neuve en fonction du ratio R dans la boucle primaire de traitement qui a permis de maintenir cette stabilité.

**Tableau III.2: concentrations moyennes en azote inorganique dissous de l'effluent en entrée de LHRA**

	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg.l <sup>-1</sup> ± σ	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg.l <sup>-1</sup> ± σ	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg.l <sup>-1</sup> ± σ	N-NID mg.l <sup>-1</sup> ± σ
<b>Hiver</b>	9,79 ± 2,19	0,05 ± 0,02	0,14 ± 0,08	9,98 ± 2,19
<b>Printemps</b>	10,84 ± 2,37	0,15 ± 0,07	0,29 ± 0,15	11,28 ± 2,51
<b>Été</b>	11,87 ± 2,01	0,10 ± 0,02	0,35 ± 0,13	12,32 ± 2,09
<b>Automne</b>	15,48 ± 3,17	0,13 ± 0,03	0,40 ± 0,10	16,02 ± 3,51

##### III.4.1.1.2) Absorption de l'azote en fonction de l'influx d'azote en entrée de LHRA

L'absorption de différentes formes de NID, en fonction de leurs influx en entrée de lagunage pendant un an, est représenté par la figure III.2

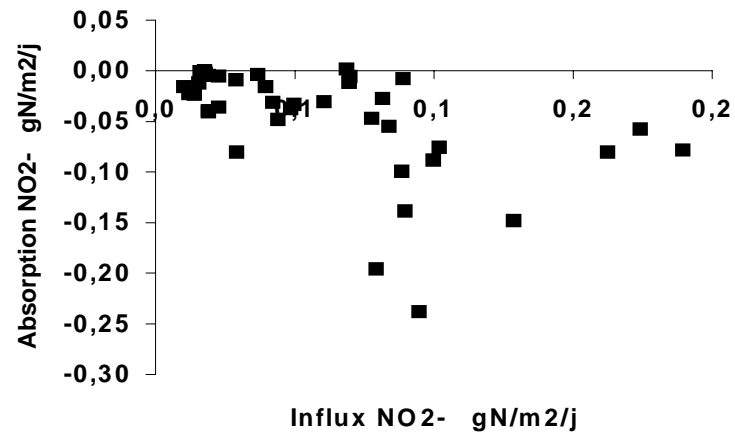
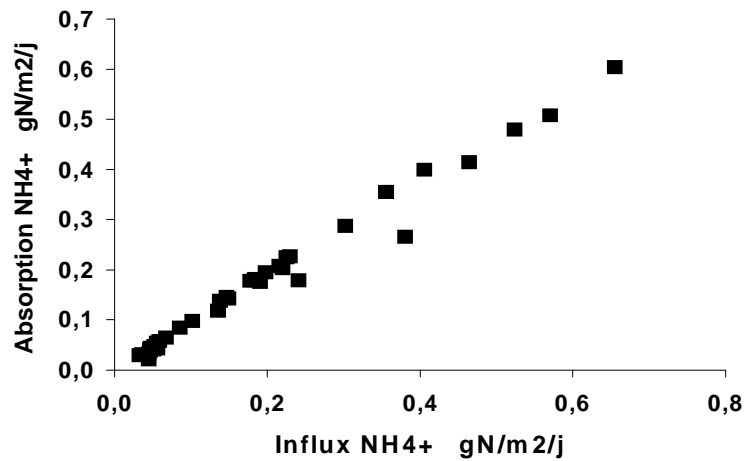
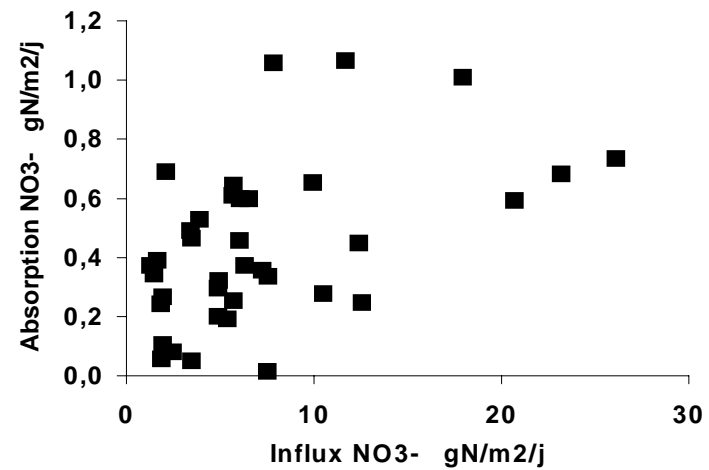
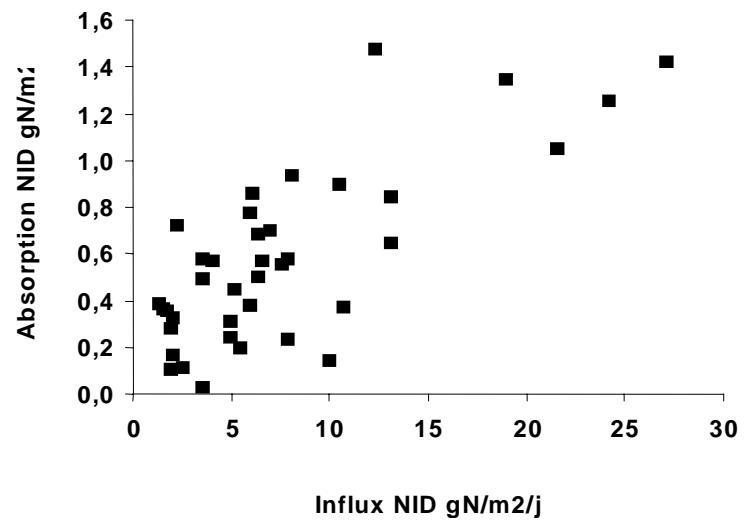


Figure III.2: Absorption des différentes formes de NID en fonction de leurs influx en entrée de LHRA

L'absorption de l'azote inorganique dissous total dans le LHRA est statistiquement et fortement corrélée à son influx en entrée de lagunage (Pearson,  $\rho=0,54$  ;  $P=2,9.E-04$ ) au cours de l'année. L'absorption de l'ammoniaque par les algues est très fortement corrélée à son influx en entrée de LHRA (Person,  $\rho =0,94$  ;  $P=1,2E-018$ ), ce qui signifie que la quasi totalité de l'ammoniaque qui entre dans le LHRA est absorbé par les algues quelle que soit la saison. Par contre le nitrate n'est pas corrélé avec son influx en entrée de lagunage pendant l'année (Person,  $\rho=0,29$  ;  $P=0,065$ ).

Ce résultat est en adéquation avec les travaux de Rosenberg et Ramus (1982) qui obtiennent un taux d'absorption de l'ammonium supérieur à celui des nitrates, ce qui reflète le coût énergétique qu'utilise la cellule pour réduire le nitrate en ammonium via la nitrate réductase. Par ailleurs Neori (1996) montre qu'il faut trois fois plus de nitrate que d'ammoniaque pour la même absorption d'azote et que la concentration de l'ammoniaque dans l'effluent ( $> 0,03$  mg-N.l<sup>-1</sup>) est susceptible d'inhiber l'absorption des nitrates par les algues dans le LHRA.

L'absorption maximale de nitrates est de  $1,1 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour un influx minimum de  $7 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ . Si on ramène ce résultat à la biomasse initiale contenue dans le bassin, on obtient une vitesse maximale d'absorption des nitrates dans nos LHRA de  $3,06 \text{ mgN.gPS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , qui est légèrement supérieure aux valeurs les plus hautes de la littérature pour des gammes de concentration de nitrate ne dépassant pas  $5 \text{ mg-N.l}^{-1}$ . Il semble donc que par rapport à celles étudiées dans la littérature, l'absorption maximale des nitrates est augmentée pour des concentrations comprises entre 10 et  $15 \text{ mgN.l}^{-1}$ .

Les nitrites ne sont pas absorbés par les algues et on observe des concentrations plus élevés en sortie qu'en entrée de lagunage ce qui signifie qu'il y a une production de nitrites dans le LHRA. On observe une forte corrélation négative entre l'absorption de nitrites et l'influx de nitrites (Person,  $\rho=-0,77$  et  $P=6,2E-09$ ). Au contraire, Pagand (1999) a observé un abattement annuel de 21% des nitrites dans le LHRA. La production de nitrites dans le lagunage est réalisée par les bactéries. Cette différence est peut être due aux plus forts taux de renouvellement expérimentés au cours de notre expérience qui augmenterait l'activité bactérienne dans les bassins.

L'absorption annuelle moyenne de NID est de  $0,51 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour un influx annuel moyen de  $7,9 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  dans nos LHRA. Cette moyenne est inférieure à celle observée par Pagand (1999) avec un effluent de concentration similaire et des influx en entrée de lagunage inférieur à  $2 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ .

Cette différence s'explique par l'heure à laquelle Pagand a effectué ses prélèvements qui correspond à une intensité lumineuse incidente maximale et donc à une absorption théorique maximale de NID pendant la journée.

Les valeurs obtenues pour l'épuration de NID dans nos LHRA sont proches de celles de la littérature. L'épuration algale des nitrates d'un effluent recyclé est donc du même ordre de grandeur que celle de l'ammoniaque d'un effluent en circuit ouvert.

#### **III.4.1.1.3) Influence des facteurs climatiques**

La lumière incidente et la température de l'eau dans les bassins sont des variables fortement corrélées entre elles en toutes saisons (Pearson,  $\rho=0,849$  et  $P=3,181E-011$ ).

L'influence des facteurs climatiques sur l'absorption de NID sont représentées par la figure III.3. L'absorption de NID dans le LHRA est fortement et positivement corrélée avec la lumière incidente (Pearson,  $\rho=0,642$  et  $P=8,1E-06$ ), la photopériode (Pearson,  $\rho=0,51$  et  $P=1,1E-03$ ) et la température de l'eau (Pearson,  $\rho=0,586$  et  $P=1,4E-04$ ).

Ces résultats s'expliquent par la photodépendance et la thermodépendance des systèmes enzymatiques qui interviennent dans l'absorption des nitrates pour la production primaire et pour le stockage.

L'absorption de NID est fortement corrélée avec la lumière et la photopériode ce qui peut faire penser que la durée d'éclairage est plus importante que la valeur de l'intensité lumineuse pour l'épuration de NID.

L'absorption maximale de NID de  $1,5 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  a été observée pendant l'été pour un influx de  $12,3 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ .

#### **III.4.1.1.4) Influence de la densité algale initiale et du taux de renouvellement**

L'absorption en NID en fonction de la densité d'algue initiale dans le LHRA est représentée sur la figure III.4. Ces deux paramètres ne sont pas corrélés statistiquement en saison défavorable (Person,  $\rho=0,14$  ;  $P=0,61$ ) mais ils sont négativement corrélée en saison favorable (Person,  $\rho=-0,43$ ;  $P=0,049$ ). Lorsqu'il n'y a pas de limitation climatique l'absorption de NID est maximale lorsque la densité algale est inférieure à  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ .



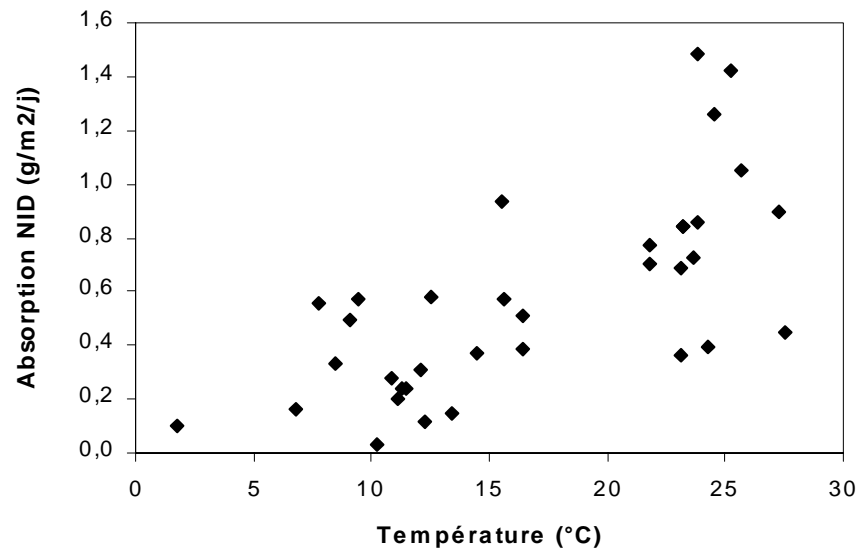
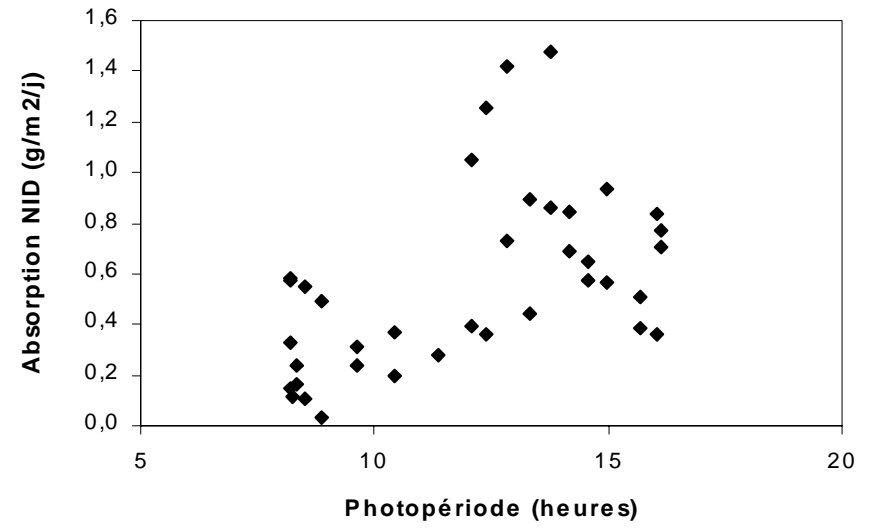
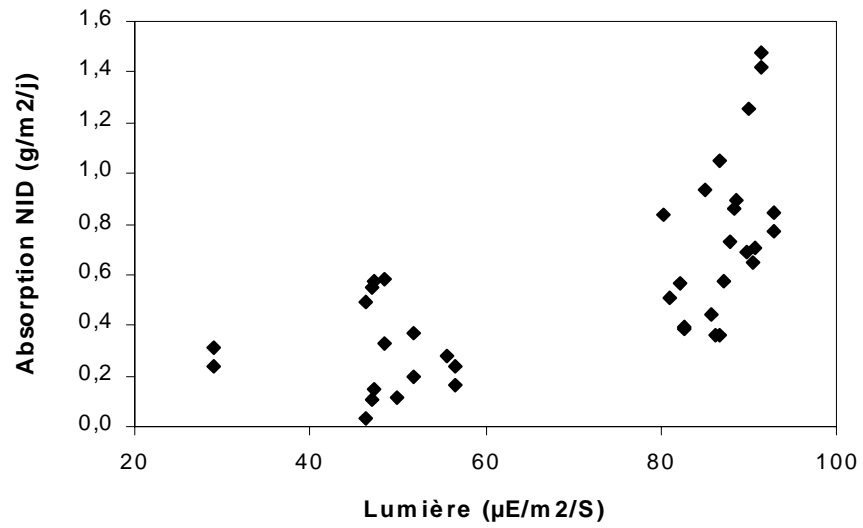
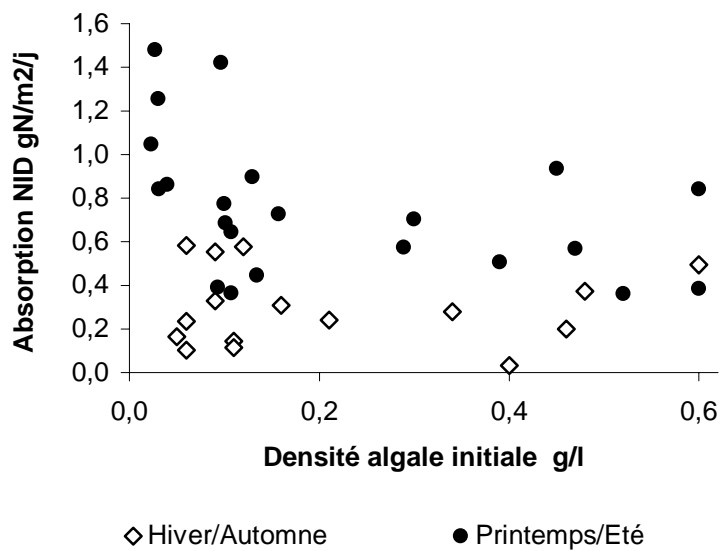
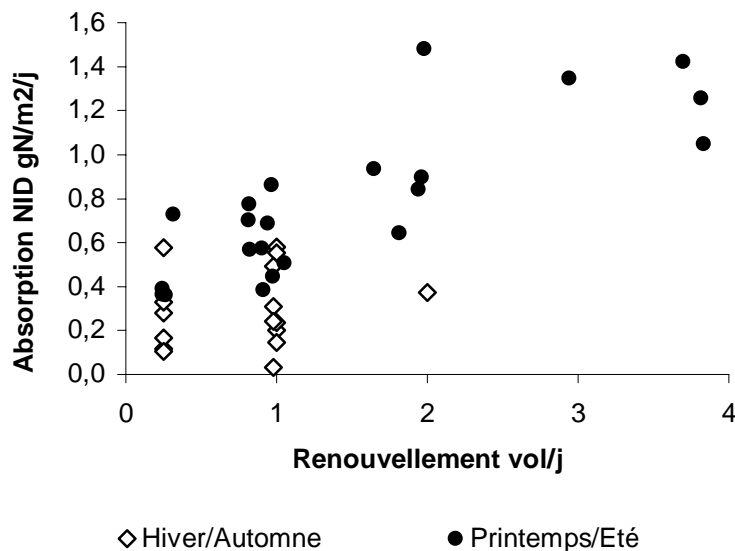


Figure III.3 : Absorption de NID dans les LHRA en fonction de la lumière incidente, de la photopériode et de la température



**Figure III.4: Absorption de NID en fonction de la densité algale initiale**

L'évolution de l'absorption de NID en fonction du taux de renouvellement est représentée par la figure III.5.



**Figure III.5: Absorption de NID en fonction du taux de renouvellement**

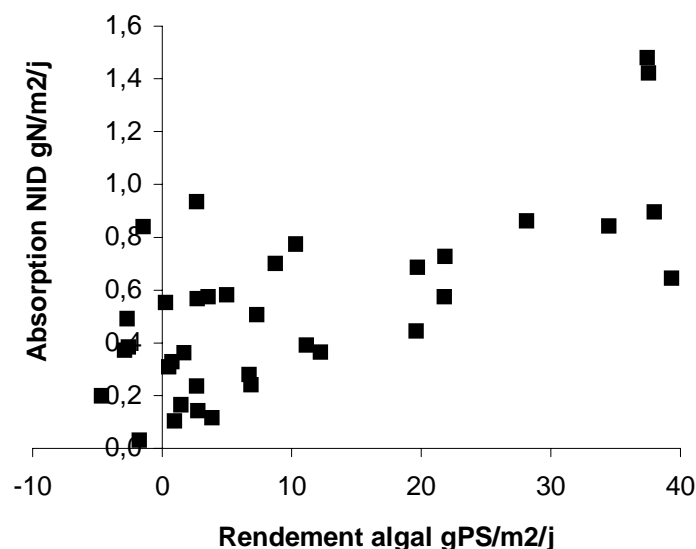
Il n'y a pas d'influence du taux de renouvellement de l'eau dans les bassins sur l'absorption de NID lorsque l'on est en saison défavorable (Person,  $\rho=-0,15$  ;  $P=0,59$ ). Par contre, lorsque l'absorption de NID n'est pas limitée par la lumière et/ou la température, il existe une corrélation positive et significative entre ces deux facteurs (Person,  $\rho=0,66$  ;  $P=4,4E-04$ ).

Si les conditions climatiques ne sont pas favorables, l'absorption de NID est limitée dans le LHRA et l'influence de la densité algale initiale et du taux de renouvellement dans les bassins est négligeable. En revanche, pendant la saison favorable, l'absorption de NID est favorisée pour de faible densité algale ( $< 0,2 \text{ gPS.l}^{-1}$ ) et un fort taux de renouvellement ( $4 \text{ vol.j}^{-1}$ ). Ces résultats sont conformes à ceux de la bibliographie et il faut rappeler que l'absorption peut théoriquement être améliorée en augmentant le taux de renouvellement de 4 à  $12 \text{ vol.j}^{-1}$  (Jiménez del Rio & al., 1996).

Lorsque les conditions climatiques ne sont pas limitantes, il semble donc que l'épuration de NID dépend principalement de la production primaire algale, favorisée par un faible auto-ombrage et un fort apport de nutriment, alors que son stockage dans les algues, favorisé par une forte densité algale, est un phénomène secondaire pour son épuration dans le LHRA.

#### III.4.1.1.5) Relation entre la croissance algale et l'absorption de NID

Cette relation est représentée sur la figure III.6. Il existe une forte corrélation positive entre le rendement algale et l'absorption de NID quelle que soit la saison dans les bassins de LHRA (Person,  $\rho=0,62$  ;  $P=1,9E-05$ ). Il semble donc que la croissance algale soit le phénomène majoritaire d'épuration de NID dans le LHRA et que le stockage d'azote dans les algues soit un phénomène secondaire. Par contre, ce phénomène de stockage permettrait d'expliquer des valeurs positives d'absorption de NID alors que le rendement algale est négatif.



**Figure III.6: Absorption de NID en fonction du rendement algale**

### III.4.1.2) Absorption des phosphates dans le LHRA

#### III.4.1.2.1) Caractérisation de l'effluent en entrée des lagunages

Comme pour l'azote inorganique dissous, la concentration en phosphates de l'effluent en entrée des bassins de LHRA a peu varié au cours de l'année d'étude (Tableau III.3).

**Tableau III.3: Concentrations en phosphates de l'effluent en entrée de LHRA**

	<b>P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> mg.l<sup>-1</sup> ± σ</b>
<b>Hiver</b>	1,51 ± 0,41
<b>Printemps</b>	1,53 ± 0,28
<b>Eté</b>	1,20 ± 0,29
<b>Automne</b>	1,82 ± 0,18

#### III.4.1.2.2) Absorption des phosphates en fonction de l'influx de phosphate en entrée de LHRA

Comme on le voit sur la figure III.7, il y a autant d'absorption que de désorption des phosphates dans le LHRA et cela ne dépend pas de l'influx de phosphate en entrée de lagunage (Person,  $\rho = -0,22$  P = 0,17).

#### III.4.1.2.3) Influence du taux de renouvellement et de la densité algale initiale

Les absorptions de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> en fonction du taux de renouvellement de l'eau et de la densité algale dans les bassins de LHRA sont représentées par la figure III.7.

Sur l'année, il n'y a pas de corrélation entre l'absorption de phosphates et le taux de renouvellement (Person,  $\rho = -0,14$  ; P=0,38). Par contre, sur la figure on observe que les phénomènes d'absorption se situent aux taux de renouvellement extrêmes (0,25 et 4 vol.j<sup>-1</sup>) alors que les phénomènes de désorption ont lieu aux taux de renouvellement intermédiaires (1 et 2 vol.j<sup>-1</sup>). Ce résultat est à mettre en relation d'une part avec l'influence du taux de renouvellement sur le pH dans les bassins de LHRA et d'autre part avec les phénomènes de précipitation et de solubilisation du phosphate tricalcique amorphe qui dépend du pH.

Il n'y a pas de corrélation statistique entre l'absorption de phosphates et la densité algale initiale même pour les taux de renouvellement favorables (Person,  $\rho=-0,16$  ;  $P=0,59$ ). Toutefois, les valeurs d'absorption les plus élevées sont observées pour les plus faibles densités testées ( $\leq 0,2 \text{ g.l}^{-1}$ ).

Le taux de renouvellement agit directement et indirectement sur le pH par deux phénomènes qui s'opposent. Son augmentation stabilise le pH sur la journée et réduit les pics de pH liés à la photosynthèse et à la respiration des algues. Dans le même temps, son augmentation favorise la photosynthèse en augmentant les flux de nutriments disponibles pour les algues, ce qui fait augmenter le pH dans lagunage.

Pour Moutin et al (1992), la précipitation des phosphates lorsque le pH est supérieur à 8 est le phénomène majeur expliquant l'épuration des phosphates dans le LHRA.

Afin de s'affranchir de ces phénomènes de solubilité, l'influence des autres paramètres sur l'absorption des phosphates sera étudiée en fonction des taux de renouvellement favorables ( $0,25$  et  $4 \text{ vol.j}^{-1}$ ) ou défavorables ( $1$  et  $2 \text{ vol.j}^{-1}$ ) à l'épuration des phosphates.

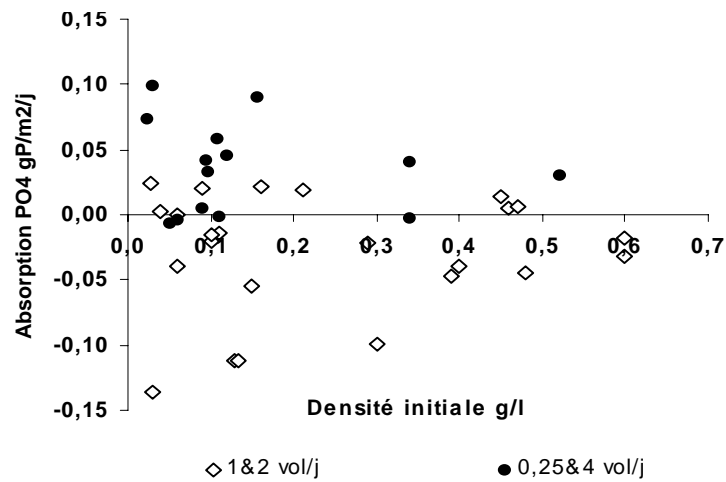
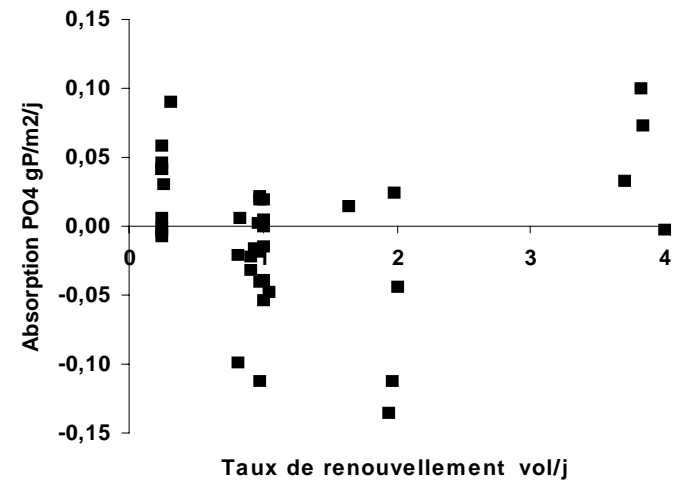
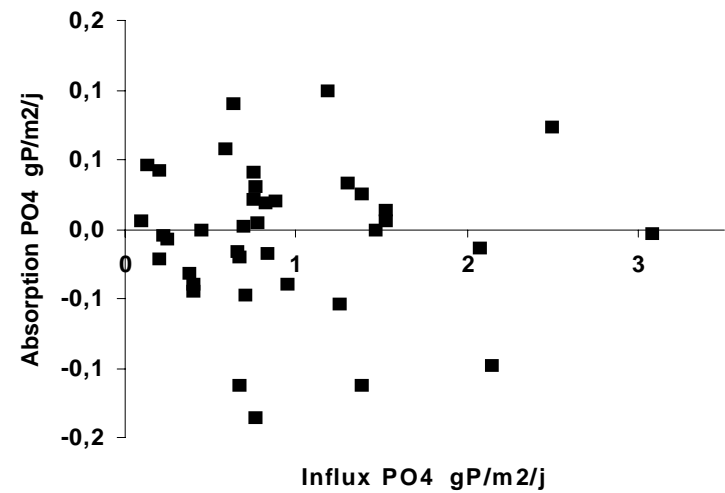
#### **III.4.1.2.4) Influence des facteurs climatiques**

Les absorptions de  $\text{PO}_4^{3-}$  en fonction des facteurs climatiques sont représentées par la figure III.8.

Il n'y a pas de corrélation entre l'absorption des phosphates et la lumière sur l'année (Person,  $\rho=-0,19$  ;  $P=0,23$ ). Par contre il existe une corrélation positive entre l'absorption de phosphate et la lumière, lorsque le taux de renouvellement est favorable (Person,  $\rho=0,69$  ;  $P=6,3\text{E-}03$ ).

Il n'y a pas de corrélation entre l'absorption des phosphates et la photopériode même lorsque le taux de renouvellement est favorable (Person,  $\rho=0,51$  ;  $P=0,06$ ).

Il n'y a pas non plus de corrélation entre l'absorption des phosphates et la température de l'eau sur l'année (Person,  $\rho=-0,15$  ;  $P=0,39$ ). Par contre il existe une corrélation positive entre l'absorption de phosphate et la température, lorsque le taux de renouvellement est favorable (Person,  $\rho=0,70$  ;  $P=7,3\text{E-}03$ ).



**Figure III.7 : Absorption des phosphates en fonction de l'influx de phosphates, du taux de renouvellement et de la densité algale initiale dans les bassins de LHRA**

Les corrélations positives observées entre la lumière, la température et l'absorption des phosphates peuvent s'expliquer par la stimulation des systèmes enzymatiques régulant l'absorption des phosphates pour le stockage et la photosynthèse. Notons que la photopériode est insuffisante pour expliquer l'influence de la lumière sur l'absorption des phosphates et qu'il faut tenir compte de l'intensité lumineuse incidente. Ces corrélations sont en accord avec l'étude de Pagand (1999) qui a travaillé avec un taux de renouvellement constant sur l'année favorable pour la précipitation ( $0,25 \text{ vol.j}^{-1}$ ) : il a observé les meilleurs épurations pendant la période estivale alors que les plus faibles, et même négatives, sont observées l'hiver, ce qui est concordant avec les fluctuations saisonnières de la croissance algale.

#### **III.4.1.2.5) Relation entre la croissance algale et l'absorption des phosphates**

L'absorption de  $\text{PO}_4^{3-}$  en fonction de la croissance des algues est représentée par la figure III.8.

Sur l'année, il n'y a pas de corrélation entre l'absorption des phosphates et le rendement algal (Person,  $\rho=-0,15$  ;  $P=0,37$ ). Par contre cette corrélation est positive lorsque le taux de renouvellement est favorable (Person,  $\rho=0,73$  ;  $P=3,1\text{E}-03$ ) c'est à dire qu'il ne favorise pas une désorption des phosphates dans le LHRA (probablement due à la solubilisation du phosphate tricalcique).

Il n'est toutefois pas possible ici de pouvoir quantifier qu'elle est la part de l'épuration qui incombe à la précipitation et celle qui incombe à la production primaire. Etant donné l'influence du taux de renouvellement sur le pH et sur le rendement algal, il est probable qu'à un temps de séjour de  $0,25 \text{ vol.j}^{-1}$  c'est la précipitation qui est le phénomène majoritaire de l'épuration des phosphates alors qu'à  $4 \text{ vol.j}^{-1}$  c'est la production primaire. Cette hypothèse est confirmée par Mesplé (1993) dans son modèle des bassins de LHRA, qui montre que si maintenir le pH à des valeurs élevées permet de favoriser l'élimination par précipitation, il est possible d'au moins doubler l'abattement du phosphore total en favorisant la croissance algale.

L'épuration maximale obtenue pour les phosphates est de  $0,1 \text{ gP.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour un influx de  $2,1 \text{ gP.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pendant l'été et avec un taux de renouvellement de  $4 \text{ vol.j}^{-1}$ . Si on ramène ce résultat à la biomasse initiale contenue dans le bassin, on obtient une vitesse maximale d'absorption des phosphates dans nos LHRA de  $0,28 \text{ mgP.gPS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , qui est comparables aux

plus fortes valeurs trouvées dans la littérature pour des gammes de concentration de phosphates ne dépassant pas  $0.25 \text{ mg-N.l}^{-1}$ . Il est cependant difficile de comparer notre résultat à ceux de la littérature car contrairement aux études *in vitro*, l'absorption algale n'est pas le seul phénomène d'épuration des phosphates et on ne connaît pas la part imputable à la précipitation dans cette épuration.

Dans l'étude de Pagand (1999), une absorption maximale de  $0,27 \text{ gP.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  est obtenue pour un influx moyen de  $0,39 \text{ gP.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  et un taux de renouvellement  $0,13 \text{ vol.j}^{-1}$ . Cette forte épuration résulte d'un temps de séjour très favorable à la précipitation et d'une photosynthèse maximale journalière compte tenu de l'heure à laquelle les échantillons ont été prélevés.

### III.4.1.3) La croissance algale dans les bassins de LHRA

#### III.4.1.3.1) Caractérisation de la production algale dans le LHRA

Au cours de cette période d'étude, 3 espèces algales majoritaires : *Ulva sp.*, *Enteromorpha sp.* et *Cladophora sp.* se sont développées dans les bassins de LHRA en proportions variables durant l'année (Fig. III.9, III.10 et III.11).

Elles appartiennent toutes à la famille des Chlorophycées et sont caractéristiques des milieux lagunaires. Au cours des saisons défavorables, des algues rouges se sont développées en épiphyte sur ces algues. Elles se développent sur les parois des bassins dans un premier temps puis se détachent et circulent librement dans la colonne d'eau (Fig.III.12). Elles sont entraînées avec le courant et se retrouvent plus ou moins morcelées par la roue à aube.



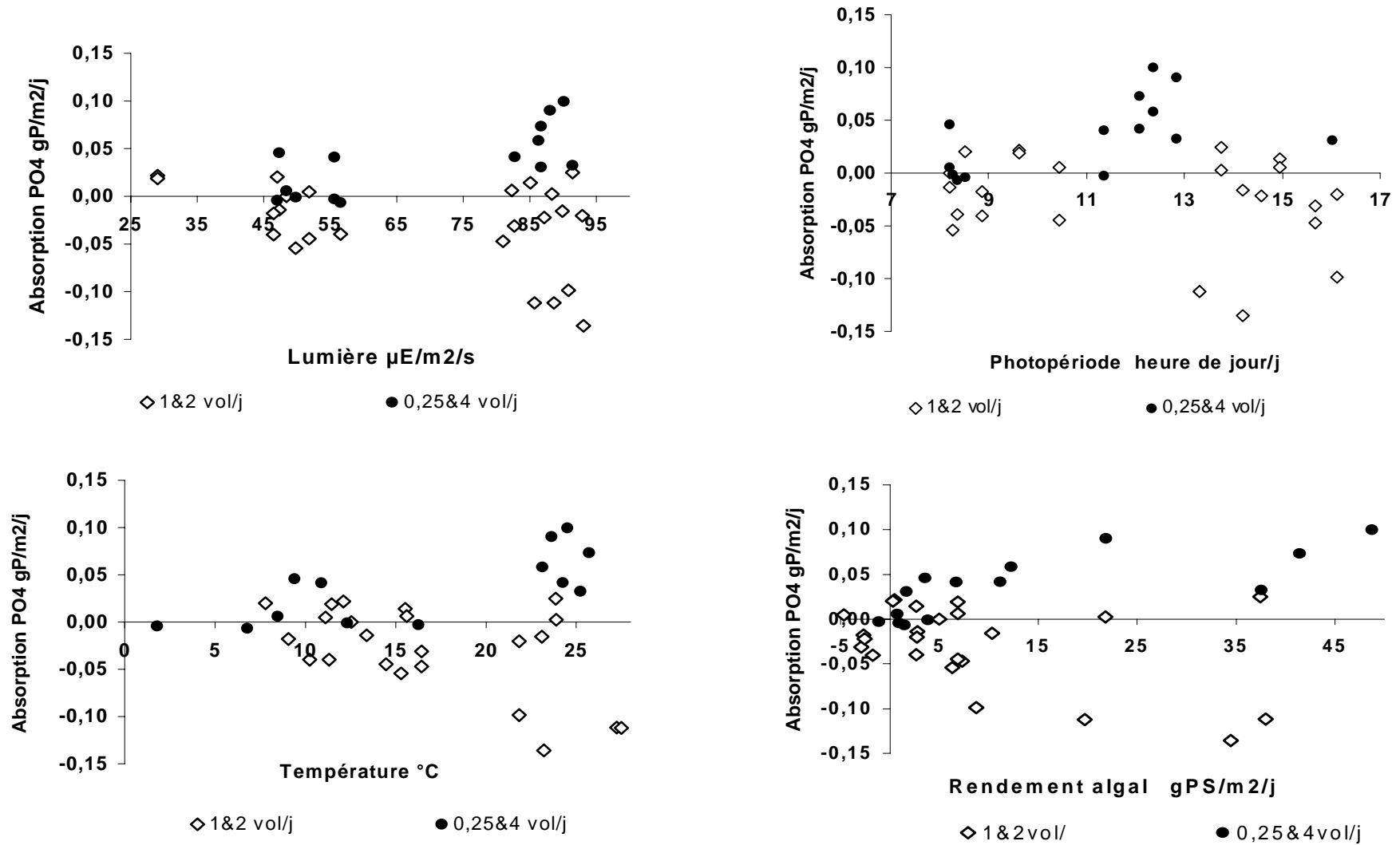


Figure III.8 : Absorption de  $\text{PO}_4^{3-}$  en fonction de la lumière incidente, de la photopériode, de la température et du rendement algal dans les bassins de LHRA



**Figure III.9: Détail d'algue majoritaire dans le LHRA en toutes saisons : *Ulva sp.***



**Figure III.10: Détail d'algue majoritaire dans le LHRA en toutes saisons : *Enteromorpha sp.***



Figure III.11: Détail d'algue majoritaire dans le LHRA en toutes saisons : *Cladophora sp.*

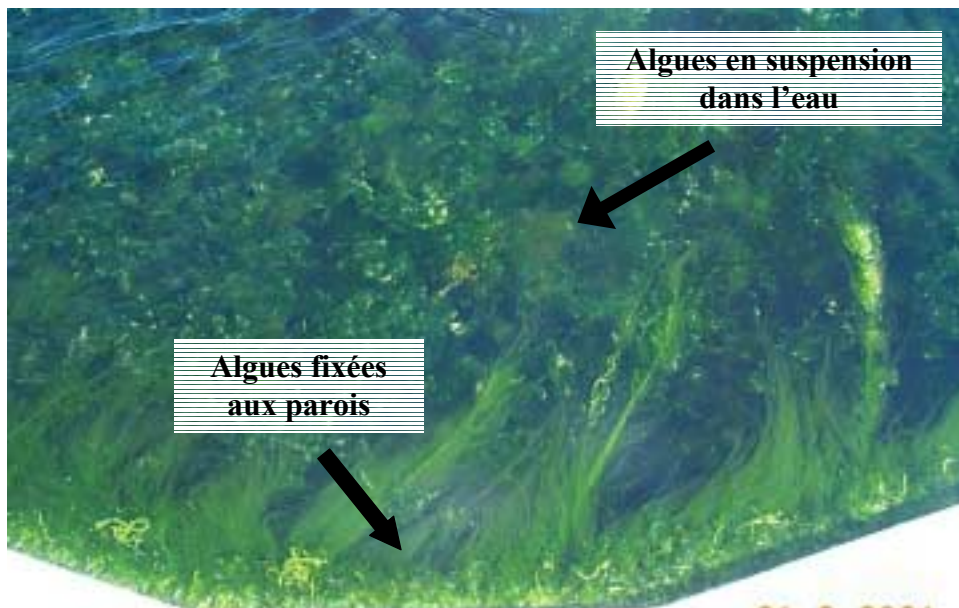


Figure III.12 : Détail d'algues libres et fixées dans le LHRA

#### **III.4.1.3.2) Influence des facteurs climatique**

L'évolution de la croissance des algues en fonction des facteurs climatiques pendant l'année est montrée par la figure III.13.

Toute l'année, il existe une forte corrélation positive entre la lumière et le rendement algal (Person,  $\rho=0,64$  ;  $P=9,6E-06$ ). La corrélation est encore plus importante lorsque la densité initiale est inférieure à  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ , c'est à dire lorsque l'auto-ombrage est minimal dans le LHRA (Person,  $\rho=0,86$  ;  $P=6,5E-08$ ) et elle dépend alors essentiellement de la photopériode (Person,  $\rho=0,82$  ;  $P=1,2E-06$ ). Si la densité algale est supérieure à  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ , le rendement algal ne dépend plus de la photopériode (Person,  $\rho = -0,04$  ;  $P = 0,89$ ).

Il existe également une forte corrélation positive entre le rendement algal et la température de l'eau en toute saison (Person,  $\rho=0,74$ ;  $P=2E-07$ ). La corrélation est encore plus importante quand l'auto-ombrage est minimal (densité initiale  $< 0,2 \text{ g.l}^{-1}$ ) dans le LHRA (Person,  $\rho=0,83$  ;  $P=2,3E-06$ ).

Comme on s'y attendait, la croissance algale dépend essentiellement des facteurs climatiques sur l'année (Azov & Shelef, 1982). La lumière et la température étant fortement corrélées au cours des saisons, il est difficile de dissocier l'impact de chacun de ces facteurs sur la croissance. En ce qui concerne la lumière, la durée d'éclairement pendant la journée apparaît comme étant plus importante que l'intensité lumineuse pour le rendement algal. Ceci paraît logique puisque même en saison défavorable, l'intensité lumineuse incidente est souvent supérieure à l'intensité de saturation pour la photosynthèse.

#### **III.4.1.3.3) Influence de la densité algale et du taux de renouvellement**

Le rendement algal est négativement corrélé avec la densité algale initiale dans le LHRA en toute saison (Person,  $\rho=-0,54$ ;  $P=3,7E-04$ ) comme on peut le voir sur la figure III.14. La densité algale maximale mesurée dans les bassins a été de  $0,6 \text{ g.l}^{-1}$ .

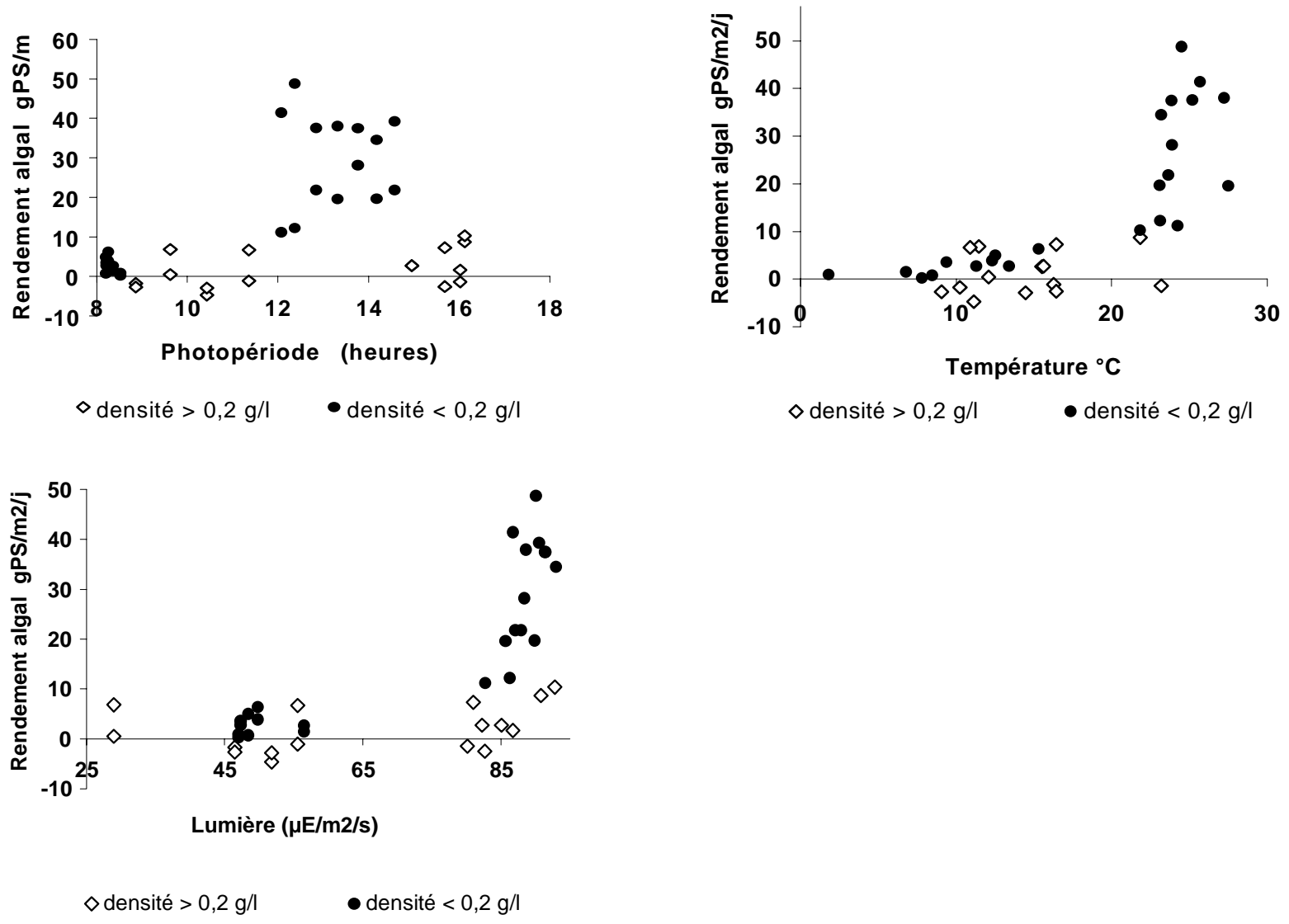
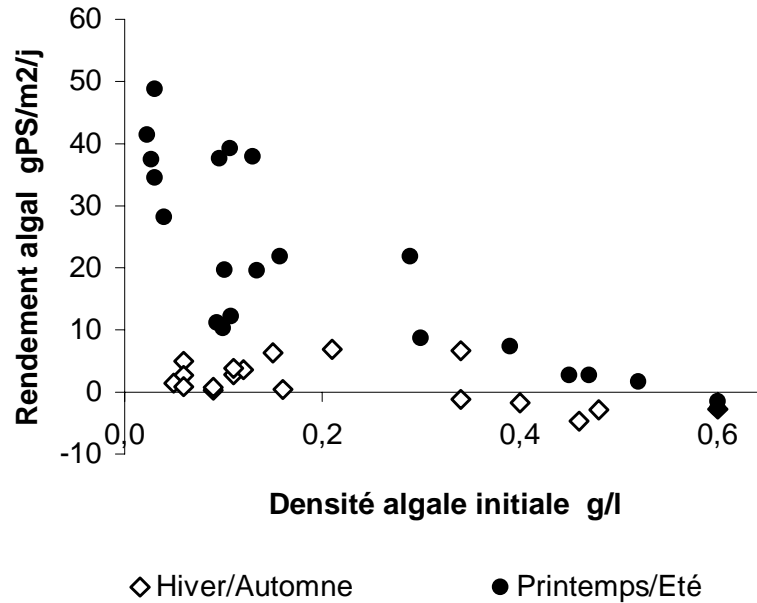


Figure III.13 : Rendement algal en fonction de la lumière, de la photopériode et de la température



**Figure III.14 : Rendement algal en fonction de la densité algale initiale dans les bassins de LHRA**

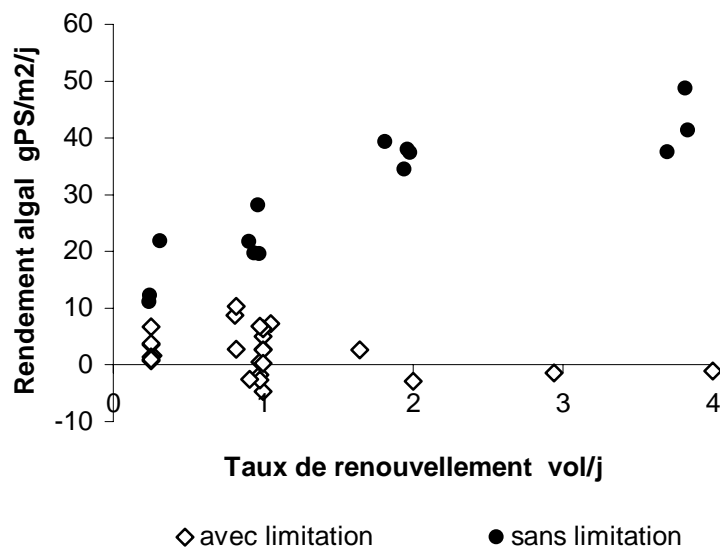
Comme nous l'avons vu précédemment, le rendement algal est plus important lorsque les conditions climatiques sont favorables. Pendant les saisons favorables, le coefficient de corrélation entre le rendement algal et la densité algale initiale est plus fort que pour l'ensemble des saisons (Person,  $\rho=-0,64$  ;  $P=9,5E-05$ ).

Lorsque les conditions climatiques pour la photosynthèse sont remplies, la densité algale dans le bassin est le facteur le plus important pour la croissance des algues comme l'on décrit Fallowfield et Garrett (1985). La densité maximale que l'on a mesurée dans les bassins est de  $0,6 \text{ gPS.l}^{-1}$ . A cette densité, il n'y a plus de croissance algale du fait de l'auto ombrage.

La densité algale doit être maintenue en dessous de  $0,2 \text{ gPS.l}^{-1}$  pour limiter l'auto ombrage et favoriser une croissance algale maximale. Dans la littérature les concentrations algales optimales sont exprimées en poids frais et parfois en surface, ce qui rend les comparaisons difficiles. Néanmoins, notre expérience nous a permis de déterminer un pourcentage moyen poids sec/poids frais de 10 à 15%. La densité optimale serait alors comprise entre 0,25 et 0,38  $\text{gPS.l}^{-1}$  pour Jiménez del Rio et al. (1996) et entre 0,17 et 0,26  $\text{gPS.l}^{-1}$  pour Neori, A. et al. (1991). Ces valeurs sont proches de celles que nous avons obtenues.

La figure III.15 montre le rendement algal en fonction du taux de renouvellement dans les bassins.

Ces paramètres sont corrélés positivement en toutes saisons (Person,  $\rho=0,50$  ;  $P=1E-03$ ) mais cette corrélation est plus forte (Person,  $\rho=0,88$  ;  $P=3,1E-05$ ) lorsque la saison est favorable (été/printemps) et l'auto-ombrage est minimal (densité initiale  $< 0,2 \text{ g.l}^{-1}$ ) ce qui correspond à la série « sans limitation » sur la figure III.15.



**Figure III.15 : Rendement algal en fonction du taux de renouvellement de l'eau**

Lorsque les conditions climatiques sont favorables et que la densité algale est optimale, alors l'augmentation du taux de renouvellement améliore la croissance algale. Ce résultat confirme ceux de la littérature (Neori, A. & al.,1991 ; Jiménez del Rio & al.,1996). Comme nous l'avons vu l'azote et le phosphore ne sont pas limitant pour la croissance algal dans nos bassins de LHRA. De nombreux auteurs ont décrits une limitation de l'intensité photosynthétique par la teneur en carbone inorganique dans les effluents piscicoles (Debusk et al., 1986 ; Vandermeulen et Gordin, 1990 ; Jiménez del Rio et al., 1994) à partir d'une certaine densité algale. Parker (1981) a montré qu'en augmentant le taux de renouvellement, on augmente l'influx de carbone et on diminue les pics de pH, ce qui empêche l'assimilation du carbone par les algues.

Le rendement maximal obtenu est de  $50 \text{ gPS.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pendant l'été. Le rendement minimal obtenu en hiver est de  $-5 \text{ gPS.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ . Il est négatif, ce qui signifie que durant cette période la mortalité algale a été supérieure à la croissance algale.

Ce rendement maximal est proche des valeurs les plus hautes trouvées dans la littérature pour des fréquences de récolte similaires (6-7 jours) mais il est très supérieur à la valeur trouvée par Pagand (1999). Cette différence est probablement due à l'absence de récolte des algues au cours de son étude et à la limitation de la croissance algale par l'auto ombrage.

La fréquence de récolte est donc une donnée importante : elle permet de limiter l'auto ombrage et ainsi de favoriser la croissance algale et également d'éviter une dégradation algale qui entraînerait un relargage des nutriments accumulés (Vandermeulen et Gordin, 1990).

### **III.4.2) Etude de l'activité photosynthétique des ulves**

#### III.4.2.1) Comparaison eau de LHRA – eau du milieu naturel

Au cours de cette étude, on cherche à savoir si la capacité photosynthétique des ulves de notre lagunage est modifiée en présence d'une eau issue d'un milieu « naturel ». Des échantillons d'ulve ont donc été successivement mis en présence d'eaux issues du LHRA et de l'étang du Prévost.

Les caractéristiques chimiques des deux types d'eaux sont détaillées dans le tableau III.4.

**Tableau III.4 : Concentrations en nutriments des eaux issues du LHRA et de l'étang**

	C-CID mg/l	N-NH <sub>4</sub> mg/l	N-NO <sub>2</sub> mg/l	N-NO <sub>3</sub> mg/l	P-PO <sub>4</sub> mg/l	C/N/P
LHRA	16,97	0,14	0,38	11,07	0,56	30/20/1
Etang	29,50	0,07	0,01	0,05	0,04	738/3/1
Etang /LHRA	1,7	0,5	0,03	4,5E-03	7E-02	25/0,2/1



Les eaux du LHRA présentent des valeurs plus élevées en azote ammoniacal, nitrites, phosphates mais surtout en nitrates, A l'inverse, les concentrations en CID sont environ deux fois plus faibles dans l'eau du LHRA par rapport à l'eau de l'étang.

Si on compare ces résultats avec le rapport molaire pour la production des macroalgues (C/N/P = 550/30/1), on s'aperçoit que le rapport entre l'azote et le phosphore est presque idéal alors qu'il faudrait 18 fois plus de CO<sub>2</sub> dans notre effluent recyclé piscicole. Dans le milieu naturel, il semble que c'est l'azote qui soit l'élément limitant pour la photosynthèse.

Les capacités photosynthétiques des ulves testées sont résumées dans le tableau III.5.

**Tableau III.5 : paramètres photosynthétiques d'ulves dans l'eau du LHRA et de l'étang**

	R (LHRA)	Resp (ETANG)	P <sub>M</sub> (LHRA)	P <sub>M</sub> (ETANG)	I <sub>K</sub> (LHRA)	I <sub>K</sub> (ETANG)	I <sub>C</sub> (LHRA)	I <sub>C</sub> (ETANG)
Ulve A	-38,6	-27,1	296,0	958,2	44,6	129,9	13,5	7,6
Ulve B	-108,4	-130,7	559,8	1023,2	53,5	81,3	26,2	24,0
Ulve C	-28,9	-30,4	233,5	684,1	48,1	119,0	13,7	11,1
Ulve D	-75,9	-49,3	202,9	563,1	34,5	104,2	47,6	20,0
Moyenne	-63,0	-59,4	323,1	807,2	45,2	108,6	25,3	15,7
Ecart type	36,4	48,5	162,5	219,2	8,0	21,0	16,0	7,6

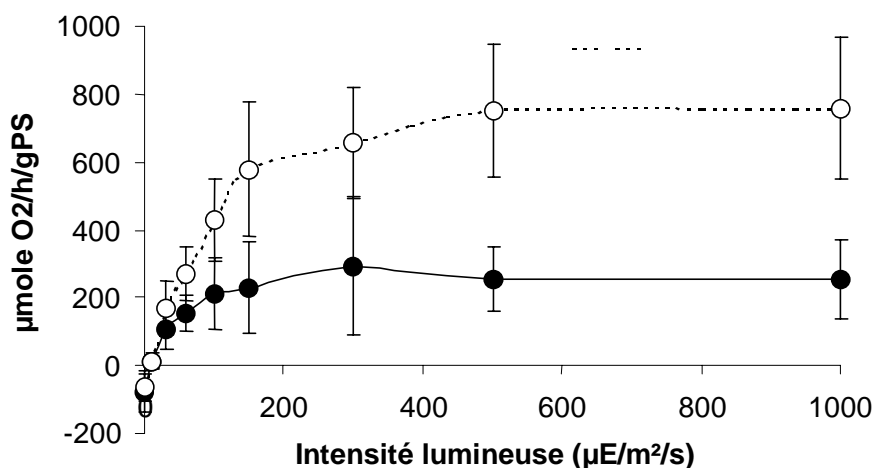
R : respiration (μmol O<sub>2</sub>/h/gPS) ; P<sub>M</sub> : Production maximale (μmol O<sub>2</sub>/h/gPS) ; I<sub>K</sub> et I<sub>C</sub> : Intensité de saturation et de compensation (μE/m<sup>2</sup>/s)

Chaque échantillon d'ulve possède une respiration (Resp) et une intensité de compensation (I<sub>C</sub>) indépendantes des conditions du milieu (eau issue du LHRA ou de l'étang). Les mesures de respiration montrent une forte variabilité entre les différents échantillons, sans doute liée à une différence de l'état physiologique des ulves dans le lagunage.

La production maximale (P<sub>M</sub>) et l'intensité de saturation (I<sub>K</sub>) sont deux fois et demi plus importantes dans l'eau du milieu naturel que dans l'eau du lagunage pour le même échantillon. Sachant que la concentration en CID est 1,7 fois plus importante dans l'eau de l'étang, il semble que l'augmentation de P<sub>M</sub> et de I<sub>K</sub> soit proportionnelle à la concentration en CID.

Les concentrations en oxygène moyennes des échantillons trouvées pour chaque type d'eau sont représentées par une courbe P/I sur la figure III.16.

La réponse physiologique instantanée est en moyenne deux fois et demi plus élevée avec l'eau de l'étang qu'avec l'eau du LHRA. Il y a donc dans le lagunage soit une limitation par le CID, soit un élément toxique qui empêche les ulves d'avoir une production primaire identique à celle observée dans le milieu naturel.



**Figure III.16 : Capacités photosynthétiques moyennes d'ulves mises en présence d'eaux : ● issues du LHRA ; ○ issues de l'étang du Prévost**

#### III.4.2.2) Réponse de la production primaire des ulves à des variations instantanées du carbone inorganique dissous

Afin de savoir si c'est le CID qui est limitant pour la photosynthèse dans les LHRA on mesure la production primaire d'échantillons d'ulve du LHRA à différentes concentrations en CID en ajoutant successivement une solution mère de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans la chambre de mesure.

##### III.4.2.2.1) Série A

Cette première série d'échantillons a été testée avec 3 concentrations différentes en CID dont les valeurs sont indiquées dans le tableau III.6.

**Tableau III.6 : Concentrations en nutriments des eaux testées pour la série A**

	C-CID mg/l	N-NH <sub>4</sub> mg/l	N-NO <sub>3</sub> mg/l	N-NO <sub>2</sub> mg/l	P-PO <sub>4</sub> mg/l
Eau +0	5,97	0,13	20,11	0,42	0,99
Eau +15	18,95	0,14	22,71	0,44	0,98
Eau +45	47,75	0,14	22,28	0,42	0,98

Eau+15 est trois fois plus concentrée en CID que l'eau du lagunage sans ajout et Eau +45 est 8 fois plus concentrée que Eau+0.

Le tableau III.7 donne les résultats des paramètres de la photosynthèse de 3 échantillons. provenant d'algues différentes dans les trois solutions décrites ci-dessus :

**Tableau III.7 : Paramètres photosynthétiques d'ulves (série A) soumises à des variations de CID**

	CID	Resp	P <sub>M</sub>	I <sub>K</sub>	I <sub>C</sub>	Resp'	P' <sub>M</sub>
Ulve 1	5,97	-20,30	158,80	43,3	12,8	-2,2	17
	18,95	-32,30	368,80	87	16,8	-3,5	39,6
	47,75	-35,40	547,40	138,9	19,2	-3,8	58,7
Ulve 2	5,97	-77,80	303,70	55,6	39,9	-5	19,5
	18,95	-66,80	660,60	95,2	21,5	-4,3	42,5
	47,75	-79,00	864,10	140,8	28,4	-5,1	55,6
Ulve 3	5,97	-83,40	324,00	43,9	31,7	-5,5	21,2
	18,95	-81,70	617,10	73,5	22,6	-5,3	40,4
	47,75	-98,80	837,40	117,6	31,7	-6,5	54,8
<b>Moyenne</b> Ecart type	<b>5,97</b>	<b>-60,50</b> 34,93	<b>262,17</b> 90,09	<b>47,60</b> 6,93	<b>28,13</b> 13,90	<b>-4,23</b> 1,78	<b>19,23</b> 2,11
	<b>18,95</b>	<b>-60,27</b> 25,34	<b>548,83</b> 157,42	<b>85,23</b> 10,96	<b>20,30</b> 3,08	<b>-4,37</b> 0,90	<b>40,83</b> 1,50
	<b>47,75</b>	<b>-71,07</b> 32,44	<b>749,63</b> 175,65	<b>132,43</b> 12,88	<b>26,43</b> 6,48	<b>-5,13</b> 1,35	<b>56,37</b> 2,06

Resp et Resp' : respiration en  $\mu\text{mol O}_2/\text{h/gPS}$  et en  $\mu\text{mol O}_2/\text{m}^2/\text{s}$  ; P<sub>M</sub> et P'<sub>M</sub> : production maximale en  $\mu\text{mol O}_2/\text{h/gPS}$  et en  $\mu\text{mol O}_2/\text{m}^2/\text{s}$  ; I<sub>K</sub> et I<sub>C</sub> : intensité de saturation et de compensation en  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  ; CID : concentration en carbone inorganique dissous en mg-C/l

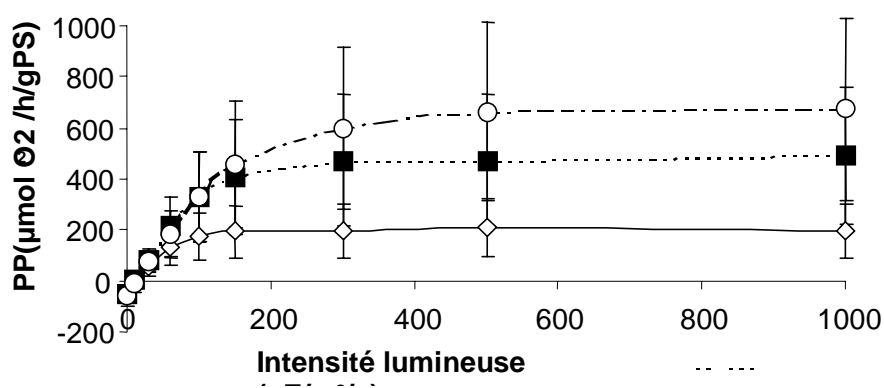
La respiration ne varie pas avec l'augmentation du CID dans les solutions d'eau de mer, quelque soit la façon dont elle est exprimée (en fonction du poids sec ou de la surface exposés à la lumière). L'intensité de compensation n'est pas affectée non plus par les variations de concentrations de CID.

Par contre, on observe une augmentation de la production maximale d'un facteur 2 entre l'eau du lagunage sans ajout (Eau +0) et celle avec un petit ajout de CID (Eau +15) et d'un facteur 3 entre l'eau du lagunage sans ajout (Eau +0) et celle avec un fort ajout de CID (Eau +45).

Ceci est vrai quelle que soit l'unité utilisée pour exprimer la quantité d'algue exposée à la lumière (en fonction du poids sec ou de la surface).

Ces résultats sont identiques pour l'intensité de saturation.

Les capacités photosynthétiques de ces échantillons d'algue sont représentés sur la figure III.17.



**Figure III.17 : Capacités photosynthétiques moyennes d'ulves soumises à des concentrations en CID de : ◇ 5,98 mg-C/l ; ■ 18,95 mg-C/l ; ○ 47,75 mg-C/l**

Les réponses physiologiques instantanées des algues augmentent en moyenne de deux fois entre l'eau du lagunage sans ajout de CID (5,98 mg-C/l) et avec un petit ajout de CID (18,95 mg-C/l) ; et de trois fois entre l'eau du lagunage sans ajout de CID et avec un fort ajout de CID (47,75 mg-C/l).

Cette fois l'augmentation des réponses physiologiques n'est pas directement proportionnelle à l'augmentation de la concentration en CID.

### III.4.2.2.2) Série B

Cette deuxième série d'algue a été soumise à de nouvelles concentrations en nutriments qui sont résumées dans le tableau III.8.

**Tableau III.8 : Concentrations en nutriments des eaux testées pour la série B**

	C-CID mg/ l	N-NH <sub>4</sub> mg/ l	N-NO <sub>2</sub> mg/ l	N-NO <sub>3</sub> mg/ l	P-PO <sub>4</sub> mg/ l
Eau +0	4,38	0,13	0,39	19,36	1,13
Eau +7	11,62	0,12	0,39	21,10	1,12
Eau +25	29,55	0,11	0,38	22,56	1,12

Eau+7 est deux fois et demi plus concentrée en CID que l'eau du lagunage sans ajout et Eau +25 est 7 fois plus concentrée en CID que Eau+0.

Le tableau III.9 donne les paramètres de la photosynthèse de 3 échantillons. provenant d'algues différentes. dans les trois solutions décrites ci-dessus :

**Tableau III.9 : Paramètres photosynthétiques d'ulves (série B) soumises à des variations de concentration en CID**

	CID	Resp	P <sub>M</sub>	I <sub>K</sub>	I <sub>C</sub>	Resp'	P' <sub>M</sub>
Ulve 4	4,38	-31,4	158,50	43,7	22,0	-2,4	12,0
	11,62	-17,0	271,30	75,2	10,1	-1,3	20,6
	29,55	-43,9	432,30	88,5	20,1	-3,3	32,8
Ulve 5	4,38	-25,9	186,70	39,7	12,9	-1,7	11,9
	11,62	-56,5	397,20	63,7	21,3	-3,6	25,4
	29,55	-64,8	740,50	94,3	18,2	-4,1	47,3
Ulve 6	4,38	-92,6	147,70	51,0		-9,6	15,4
	11,62	-71,6	274,10	82,0	60,5	-7,5	28,5
	29,55	-69,1	357,00	109,9	53,8	-7,2	37,2
<b>Moyenne</b> Ecart type	<b>4,38</b>	<b>-49,97</b> 37,02	<b>164,30</b> 20,14	<b>44,80</b> 5,73	<b>17,45</b> 6,43	<b>-4,57</b> 4,37	<b>13,10</b> 1,99
	<b>11,62</b>	<b>-48,37</b> 28,19	<b>314,20</b> 71,89	<b>73,63</b> 9,25	<b>30,63</b> 26,46	<b>-4,13</b> 3,13	<b>24,83</b> 3,98
	<b>29,55</b>	<b>-59,27</b> 13,48	<b>509,93</b> 203,20	<b>97,57</b> 11,07	<b>30,70</b> 20,03	<b>-4,87</b> 2,06	<b>39,10</b> 7,43

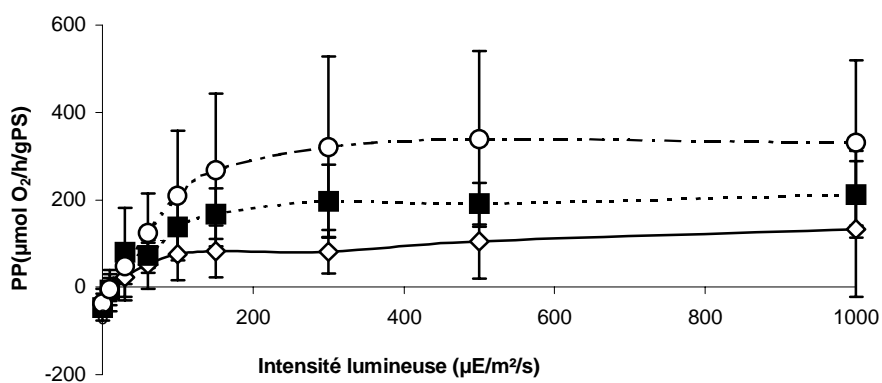
Resp et Resp' : respiration en  $\mu\text{mol O}_2/\text{h/gPS}$  et en  $\mu\text{mol O}_2/\text{m}^2/\text{s}$  ; P<sub>M</sub> et P'<sub>M</sub> : production maximale en  $\mu\text{mol O}_2/\text{h/gPS}$  et en  $\mu\text{mol O}_2/\text{m}^2/\text{s}$  ; I<sub>K</sub> et I<sub>C</sub> : intensité de saturation et de compensation en  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  ; CID : concentration en carbone inorganique dissous en mg-C/l

La respiration ne varie pas avec l'augmentation du CID dans les solutions d'eau de mer, quelle que soit la façon dont elle est exprimée (en fonction du poids sec ou de la surface exposés à la lumière). L'intensité de compensation n'est pas affectée non plus par les variations de concentrations de CID.

Par contre, on observe un doublement de la production maximale entre l'eau du lagunage sans ajout de CID (Eau +0) et celle avec un petit ajout de CID (Eau +7) ; et un triplement entre l'eau du lagunage sans ajout de CID et avec un fort ajout de CID (Eau +25). Ceci est vrai quelque soit l'unité utilisée pour exprimer la quantité d'algue exposée à la lumière (en fonction du poids sec ou de la surface).

On observe, également, une augmentation de l'intensité de saturation de une fois et demi entre l'eau du lagunage sans ajout de CID (Eau +0) et celle avec un petit ajout de CID (Eau +7) ; et de deux fois entre l'eau du lagunage sans ajout de CID et avec un fort ajout de CID (Eau +25).

Les capacités photosynthétiques de ces échantillons d'algue sont représentés par la figure III.18.



**Figure III.18 : Capacités photosynthétiques moyennes d'ulves (série B) soumises à des concentrations en CID de ◇ 4,38 mg-C/l ; ■ 11,62 mg-C/l ; ○ 29,55 mg-C/l**

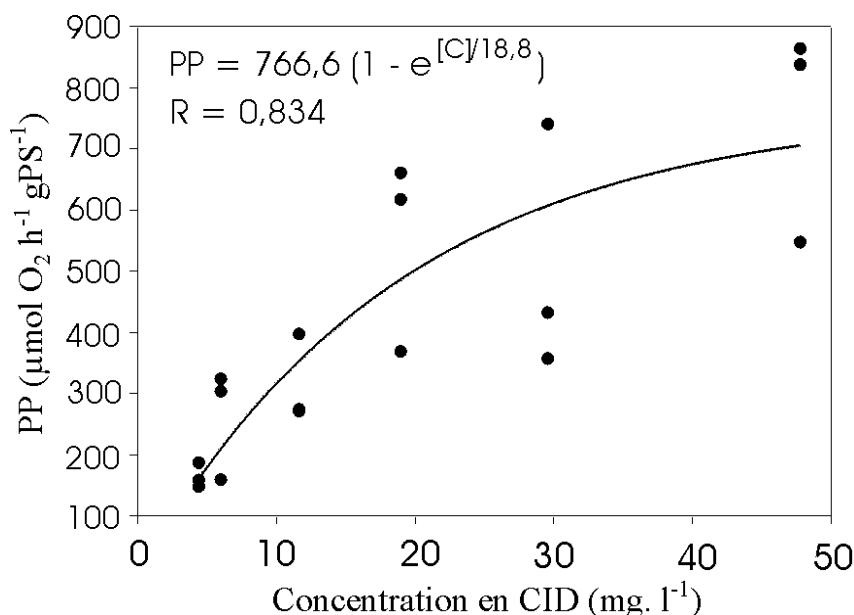
Les réponses physiologiques instantanées des algues augmentent en moyenne d'une fois et demi entre l'eau du lagunage sans ajout de CID (4,38 mg-C/l) et avec un petit ajout de CID (11,62 mg-C/l) ; et de deux fois entre l'eau du lagunage sans ajout de CID et avec un fort ajout de CID (29,55 mg-C/l).

Cette fois encore l'augmentation des réponses physiologiques n'est pas directement proportionnelle à l'augmentation de la concentration en CID.

### III.4.2.2.3) Estimation de la concentration de demi saturation en CID

#### Pour la production maximale

L'ajustement sous Sigmaplot® d'une courbe de régression de type exponentielle du modèle de Webb *et al.* (1974) sur nos données de production maximale en fonction de la concentration en CID est représentée par la figure III.19.

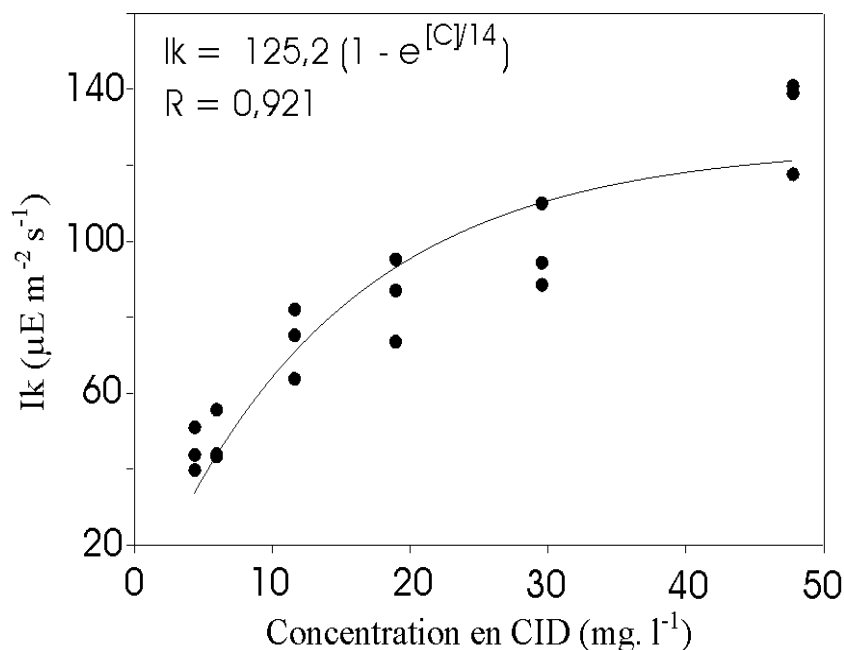


**Figure III.19 : Production maximale des échantillons d'algues de la série A&B en fonction de la concentration en carbone inorganique dissous (C-CID)**

La courbe de régression explique 70% des variations observées et donne une valeur maximale de  $P_{max} = 767 \mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{gPS}^{-1}$  ( $P < 0,0001$ ) et la concentration de demi saturation de C-CID =  $18,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  ( $P = 0,009$ ).

#### Pour l'intensité de saturation

L'ajustement sous Sigmaplot® d'une courbe de régression de type exponentielle du modèle de Webb *et al.* (1974) sur nos données d'intensité de saturation en fonction de la concentration en CID est représentée par la figure III.20.



**Figure III.20 : Intensité de saturation des échantillons d'algues de la série A&B en fonction de la concentration en carbone inorganique dissous (C-CID)**

La courbe de régression explique 85% des variations observées et donne une valeur maximale de  $I_k = 125 \mu E. m^{-2}. s^{-1}$  ( $P < 0,0001$ ) et la concentration de demi saturation de C-CID = 14  $mg.l^{-1}$  ( $P < 0,0001$ ).

#### III.4.2.3) Discussion sur les capacités photosynthétiques

Dans ces trois expériences, on peut observer une variation des résultats assez importante entre les échantillons. Les variations de la respiration et de la production primaire d'une algue à une autre sont probablement dues à des âges différents des thalles prélevés au hasard dans le lagunage. Les triplicats sont donc un minimum pour ces manipulations.

Lors de ces expériences sur les ulves du lagunage à haut rendement algal, nous avons cherché à savoir si les conditions du milieu étaient favorables à la production primaire. En effet les caractéristiques chimiques des eaux du lagunage sont assez différentes de celle du milieu naturel.



La première expérience de comparaison entre le lagunage et le milieu naturel (l'étang du Prévot) a permis de mettre en évidence une limitation de la production primaire des ulves dans les eaux du lagunage. Si la respiration et l'intensité de compensation sont conformes aux valeurs de la littérature, la production maximale et l'intensité de saturation correspondent à des valeurs hivernales quand la photosynthèse est minimale (Levasseur et Giraud, 1982; Fillit, 1995), alors que les algues testées ont été prélevées en septembre.

Les grandes différences chimiques entre les eaux du lagunage et de l'étang sont la très forte concentrations en azote dissous des eaux du LHRA et sa relativement faible teneur en carbone inorganique dissous (CID). Il peut donc y avoir dans le lagunage soit une toxicité due aux trop fortes teneurs en azote dissous, soit une limitation due aux faibles teneurs en CID.

Les deux expériences avec des solutions de plus en plus concentrée en CID ont montré que la production primaire est en relation avec la teneur en CID de l'eau du lagunage. Pour les valeurs de CID correspondant à l'eau de mer naturelle (24 mg-C.l<sup>-1</sup> environ), on trouve une production maximale et une intensité de saturation de nos algues conformes aux données de la littérature pour les mêmes conditions climatiques (Levasseur et Giraud, 1982 ; Guo et Mathieson, 1992 ). En comparant les productions maximales moyennes obtenues avec l'eau de l'étang ( $P_{max}=803 \mu\text{mol O}_2/\text{h/gPS}$  ) à celle obtenues avec de l'eau du lagunage enrichie en CID ( $P_{max}=767 \mu\text{mol O}_2/\text{h/gPS}$ ), on n'observe pas de différences significatives permettant de penser qu'il y aurait une toxicité dans le lagunage.

Dans la gamme de concentration testée, qui correspond aux valeurs moyennes en CID de l'effluent en circuit recyclé, la constante de demi saturation du C-CID pour la photosynthèse maximale se situe à 19 mg.l<sup>-1</sup> environ. En maintenant l'eau du lagunage à une concentration en CID supérieure à la constante de demi saturation, on peut donc lever la limitation de la production primaire chez les ulves dans nos LHRA.

Cependant, les plus fortes valeurs obtenues pour le  $P_{max}$  et  $I_k$  restent inférieures aux plus fortes valeurs de la littérature (Fillit, 1995). Ces valeurs correspondent à une concentration en CID de 60 mg-C.l<sup>-1</sup>. On peut donc penser qu'au cours de ces expériences, les concentrations testées étaient trop faibles pour atteindre les valeurs maximales de la photosynthèse. Cette hypothèse semble confirmée par Levasseur et al. (1991) qui ont montré que la photosynthèse est augmentée de 10 à 90% par l'addition de 240 mg-C.l<sup>-1</sup> de CID par rapport à l'eau de mer naturelle et en fonction de la saison.

Il est également possible que le CID mesuré dans notre expérience n'ait pas été entièrement disponible pour la photosynthèse. En effet, il faut que le pH soit en dessous de 9 pour que le CID soit sous une forme assimilable par les algues car la croissance des algues diminue davantage lorsque  $\text{HCO}_3^-$  diminue avec le pH que lorsque le CID diminue à pH constant (Frost-Christensen et Sand-Jensen, 1990). Dans les bassins de LHRA, la photosynthèse fait augmenter le pH comme l'a observé Pagand (1999) en mesurant un pH à 14 heures proche de 9 la majorité de l'année. Pour éviter que le CID assimilable soit réduit et pour augmenter les apports globaux de CID pour la photosynthèse des algues, il semble que le moyen le plus simple soit d'augmenter le taux de renouvellement de l'effluent d'élevage dans le LHRA comme cela a déjà été suggéré par plusieurs auteurs (Vandermeulen et Gordin, 1990 ; Jimenez del Rio et al., 1996).

### **III.4.3) L'analyse statistique descriptive des résultats**

Il s'agit de déterminer quelles sont les principales variables qui expliquent l'épuration de l'azote inorganique dissous, des phosphates et la croissance des algues dans les bassins de LHRA. Aux variables précédemment décrites nous avons ajouté les valeurs mesurées pour le pH et le CID.

Les neuf variables explicatives testées ont donc été : la densité initiale, le taux de renouvellement, la lumière, la photopériode, la température, le pH et les concentrations en NID,  $\text{PO}_4^{3-}$  et CID de l'effluent qui alimente le lagunage.

#### **III.4.3.1) Les régressions linéaires multiples**

Afin de sélectionner les variables explicatives les plus significatives du rendement algal, de l'absorption de NID et de l'absorption de  $\text{PO}_4^{3-}$ , nous avons utilisé une régression dite « pas à pas » puis une régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Sigmastat<sup>®</sup>.

##### **III.4.3.1.1) Pour le rendement algal**

Pour l'ensemble des saisons nous avons obtenu la droite de régression suivante :

Rendement algal =  $-11,8 - (40 \times \text{densité initiale}) + (4 \times \text{taux de renouvellement}) + (0,37 \times \text{lumière})$

(N = 40 ;  $R^2 = 0,88$ ).

La valeur de la densité initiale dans le LHRA est le paramètre qui explique le mieux la variation du rendement algal au cours de l'année. Lorsque la densité augmente, le rendement diminue. Ensuite c'est le taux de renouvellement dans les bassins qui influence positivement la croissance algale puis la lumière incidente dans le même sens. Cette droite de régression multiple permet d'expliquer 88% de la variabilité du rendement algal pendant l'année dans nos lagunages.

Maintenant, si on étudie les valeurs de l'été et de l'automne au cours desquelles les densités initiales étaient inférieures ou égales à 0,1 gPS.l<sup>-1</sup> on obtient la droite suivante :

$$\text{Rendement algal} = -26 + (7 \times \text{taux de renouvellement}) + (0,5 \times \text{lumière})$$

(N = 24 ; R<sup>2</sup> = 0,97).

Le rendement algal ne dépend plus que du taux de renouvellement et de la lumière incidente.

#### **III.4.3.1.2) Pour l'absorption de NID**

Pour l'ensemble des saisons nous avons obtenu la droite de régression suivante :

$$\text{Absorption NID} = 0,39 + (0,09 \times \text{taux de renouvellement}) + (0,01 \times \text{lumière})$$

(N = 40 ; R<sup>2</sup> = 0,69)

La variation de l'épuration de l'azote inorganique dissous au cours des saisons est expliquée à 69% par le taux de renouvellement et la lumière incidente. Lorsque ces deux paramètres augmentent dans les LHRA, l'épuration de NID est améliorée de même que le rendement algal avec lequel elle est fortement corrélée.

#### **III.4.3.1.3) Pour l'absorption de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>**

Pour l'ensemble des saisons nous avons obtenu la droite de régression suivante :

$$\text{Absorption PO}_4^{3-} = 8,85 - (4,97 \times \text{densité initiale}) - (0,16 \times \text{température}) - (0,20 \times \text{concentration en NID}) - (2,09 \times \text{concentration en PO}_4^{3-})$$

(N = 37 ; R<sup>2</sup> = 0,70)

L'évolution de l'absorption des phosphates au cours de l'année est expliquée à 70% par 4 facteurs qui sont, en ordre décroissant d'importance : la densité initiale, la concentration en PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, la concentration en NID et la température.

Lorsque ces facteurs augmentent dans le LHRA, l'absorption des phosphates diminue. La densité algale est le facteur qui a le plus d'influence sur cette absorption et également sur le rendement algal.

Le rendement algal est le paramètre le mieux expliqué sur l'année (88%) avec trois variables, alors que les absorptions de NID et du phosphate sont moins bien expliquées (70%) et nécessitent 2 et 4 variables respectivement.

#### III.4.3.2) L'analyse en composante principale (ACP)

Nous avons réalisé une ACP normée pour mesurer la variabilité globale de tous les paramètres mesurés afin d'expliquer le rendement algal (Rendt) et les épurations de NID (Abs NID) et de  $\text{PO}_4^{3-}$  (Abs  $\text{PO}_4$ ) dans le LHRA. Trente cinq séries de valeurs ont été utilisées au lieu de 40, car une valeur manquante pour un paramètre a exclu de l'analyse l'ensemble des valeurs correspondantes pour les autres paramètres.

Cette analyse révèle que trois axes permettent d'expliquer 81 % de la variabilité observée : 41% pour l'axe 1 ; 22% pour l'axe 2 et 18% pour l'axe 3.

Les variables qui sont bien représentées sont :

Sur l'axe 1: la lumière, la température et la photopériode ou plus globalement les variables climatiques qui évoluent toutes dans le même sens.

Sur l'axe 2 : la densité initiale et la concentration en CID qui évoluent en sens inverse.

Sur l'axe 3 : le pH et le taux de renouvellement qui évoluent en sens inverse.

Le rendement algal est représenté majoritairement par les variables climatiques, la concentration en CID dans l'effluent et la densité algale initiale

L'absorption de NID est représentée essentiellement par les variables climatiques, notamment la lumière et la température et, dans une moindre mesure, par le taux de renouvellement dans les bassins.

L'absorption de  $\text{PO}_4^{3-}$  est peu représentée par les variables testées. Le taux de renouvellement et le pH dans le LHRA sont cependant les variables qui la représente le mieux.

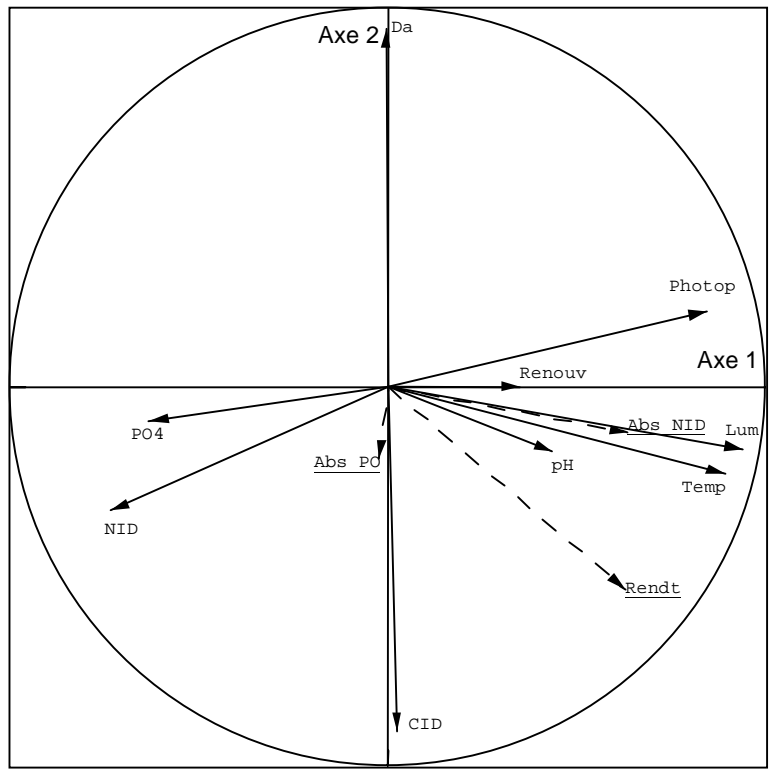


Figure III.21 : Projection des variables sur les axes 1 et 2

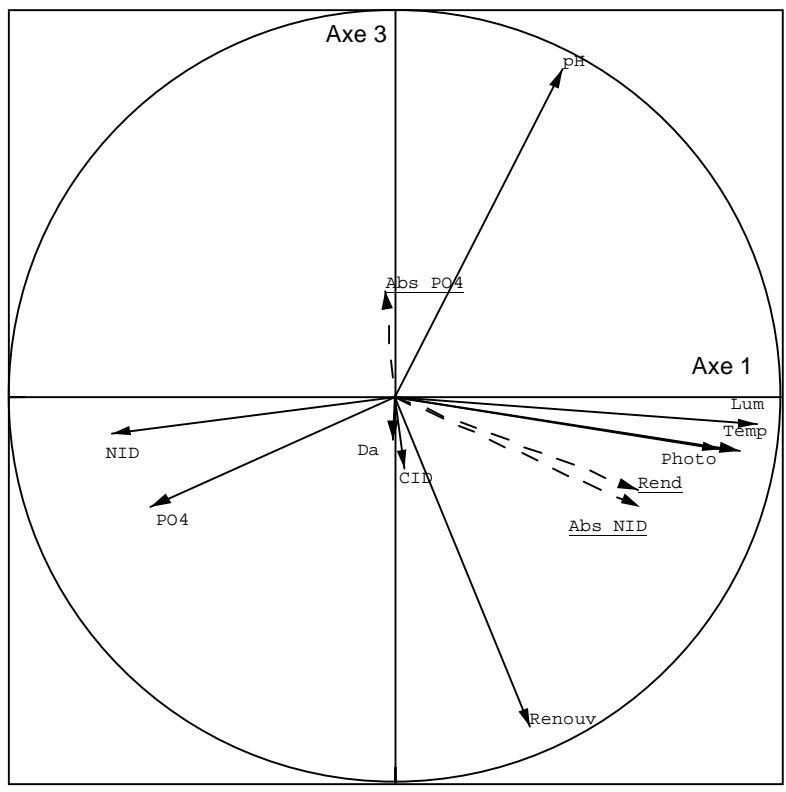
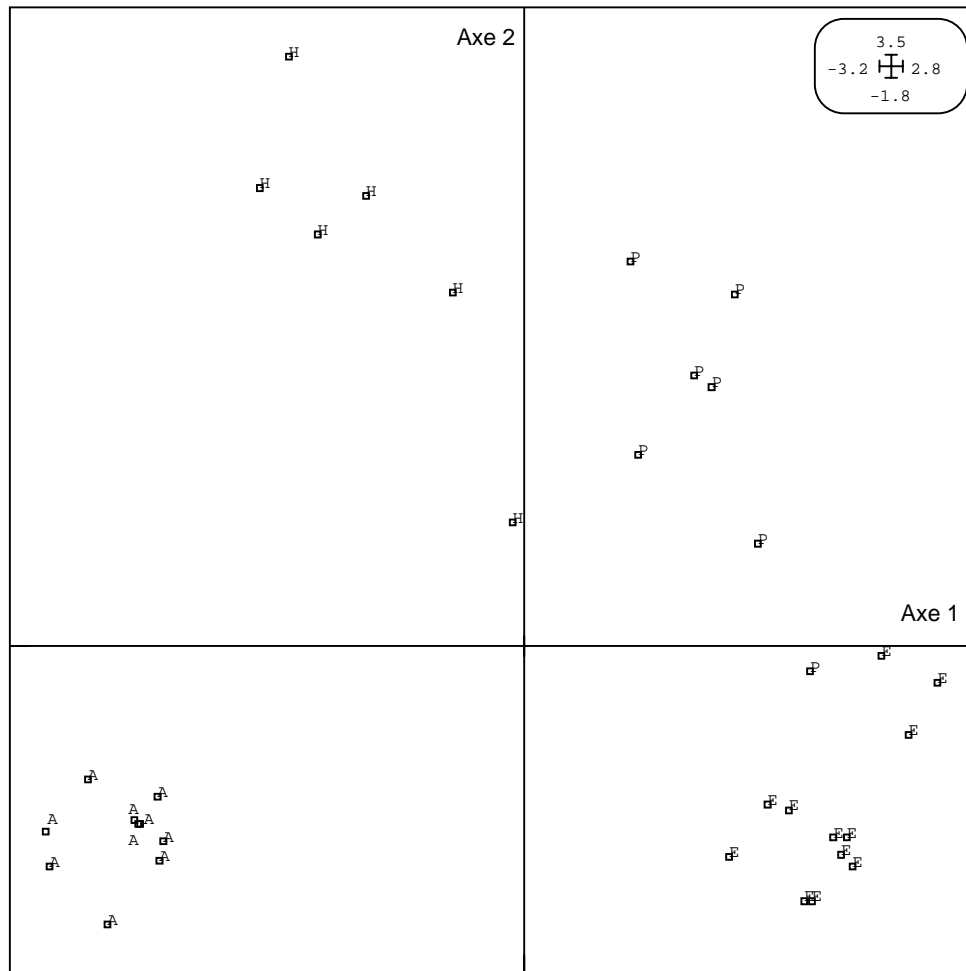


Figure III.22 : Projection des variables sur les axes 1 et 3

La projection des valeurs sur le plan (1, 2) montre une structuration des saisons en fonction des variables climatiques sur l'axe 1 et en fonction de la densité algale initiale et de la concentration en CID sur l'axe 2 (Fig. III.23).



**Figure III.23 : Projection des valeurs saisonnières (H :hiver ; P :printemps ; E : été et A : automne) sur les axes 1 et 2**

La structuration en fonction des variables climatiques montre logiquement des valeurs faibles en l'hiver et en l'automne et des valeurs fortes au printemps et en été. Sur ce même axe, les valeurs sont dispersées en hiver et au printemps alors qu'elles sont homogènes en été et en automne. Ce phénomène est certainement due au pas de temps utilisé pour mesurer ces valeurs car il a été de 15 jours pour les deux premières saisons contre 6 jours pour les deux dernières.

La structuration en fonction de l'axe 2 montre une plus forte variabilité en hiver et au printemps par rapport à l'été et à l'automne. Ce phénomène est dû aux densités algales initiales testées qui ont été comprises entre 0,1 et 1,6 gPS.l<sup>-1</sup> pour les deux premières saisons alors qu'elles ont été constantes (0,1 gPS.l<sup>-1</sup>) pour les deux dernières. La structuration en fonction de l'axe 2 montre également une augmentation graduelle des valeurs de la concentration en CID de l'hiver à l'automne. Ce phénomène s'explique par une augmentation de la charge en poisson dans le circuit d'élevage entre ces périodes (de 10 à 60 kg.m<sup>3</sup> environ) et donc par un enrichissement en CO<sub>2</sub> de l'effluent d'élevage alimentant le LHRA.

### **III.5) Conclusion**

L'aquaculture traditionnelle produit des rejets dilués dans de grands volumes d'eau, ce qui rend leur traitement difficile. Les techniques d'élevage de poissons utilisent de plus en plus des systèmes en eau recyclée qui permettent d'éliminer une grande partie des matières solides, mais concentrent l'azote et le phosphore dissous.

L'utilisation du Lagunage à Haut Rendement Algal (LHRA) pour le traitement du rejet de circuits recyclés en aquaculture marine a déjà fait l'objet de plusieurs études. Au cours de ce chapitre nous avons étudié les paramètres (climatiques, taux de renouvellement, densité algale et concentrations en nutriments) qui déterminent la cinétique d'épuration de l'azote et du phosphore dans les bassins de LHRA, la production d'algue associée à cette épuration ainsi que la limitation de la capacité photosynthétique des algues par le carbone inorganique dissous.

En ce qui concerne l'épuration de l'azote, les fortes concentrations en nitrates de l'effluent recyclé favorisent son absorption et la présence d'ammoniaque améliore le rendement épuratoire. Cette épuration dépend essentiellement des facteurs climatiques qui activent les systèmes enzymatiques responsables de l'absorption. L'azote absorbé par les algues est majoritairement utilisé pour la production primaire, alors que le stockage apparaît lorsque les conditions climatiques ne sont pas favorables à la croissance des algues ou que celles-ci ne

sont plus récoltées dans le LHRA. Lorsque les conditions climatiques sont favorables, une densité algale initiale inférieure à  $0,2 \text{ gPS.l}^{-1}$  et un taux de renouvellement de  $4 \text{ vol.j}^{-1}$  permettent une absorption maximale de  $1,5 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour un influx de  $12,3 \text{ gN.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ .

L'épuration des phosphates ne peut être expliquée par aucun phénomène simple dans le LHRA. La concentration en phosphate dépend de deux mécanismes qui s'opposent (1) la précipitation/solubilisation du phosphate tricalcique qui est sous l'influence du pH et (2) l'absorption des phosphates par les algues qui est favorisée par la production primaire. En effet, un faible taux de renouvellement dans le LHRA favorise l'augmentation du pH dans l'eau (par la photosynthèse) et donc la précipitation des phosphates dans le fond du bassin. En revanche, lorsque les conditions climatiques sont favorables pour la production primaire, l'absorption des phosphates est améliorée par l'augmentation du taux de renouvellement. Cette augmentation permet de stabiliser le pH et d'apporter le carbone nécessaire à la photosynthèse des algues, mais réduit le phénomène de précipitation des phosphates. La production primaire d'algues, contrairement à la précipitation permet d'éliminer définitivement le phosphate de l'effluent. Lorsque les conditions climatiques sont favorables une densité algale initiale inférieure à  $0,2 \text{ gPS.l}^{-1}$  et un taux de renouvellement de  $4 \text{ vol.j}^{-1}$  permettent une absorption maximale de  $0,1 \text{ gP.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$  pour un influx de  $2,1 \text{ gP.m}^{-2}.\text{j}^{-1}$ .

La dépendance de la croissance algale vis à vis de la lumière et de la température est largement décrite et se vérifie très bien dans nos lagunages. Par ailleurs, le rendement algal est aussi très dépendant de la densité algale dans les lagunages : il faut maintenir une densité algale inférieure à  $0,2 \text{ gPS.l}^{-1}$  pour ne pas limiter la croissance algale par l'auto ombrage. Si ces conditions sont remplies on atteint un rendement algal maximal en augmentant le taux de renouvellement à  $4 \text{ vol.j}^{-1}$ .

L'étude in vitro des capacités photosynthétiques des ulves montre que le carbone inorganique dissous dans l'effluent recyclé est un facteur limitant pour la photosynthèse. La production maximale et l'intensité de saturation des ulves sont réduites dans le LHRA par rapport au milieu naturel. Cette limitation n'est pas due à une toxicité de l'effluent recyclé vis à vis de la photosynthèse, mais à un manque de carbone inorganique dissous disponible. Une concentration en C-CID de  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  et un pH inférieur à 8 sont les conditions requises pour que la photosynthèse ne soit plus limitée dans le LHRA. La concentration en  $\text{CO}_2$  est contrôlée pour assurer la survie des poissons dans le circuit d'élevage. On peut cependant améliorer l'influx de C-CID disponible pour les algues en prélevant l'effluent en sortie de



bassin d'élevage ou de filtre biologique (concentration maximale en CO<sub>2</sub> dans le circuit) et en augmentant son débit (ou taux de renouvellement) dans les bassins de LHRA.

Au cours de cette thèse, nous avons comparé des élevages de bars Européens dans trois types de systèmes d'élevage : un circuit recyclé associé à un lagunage à haut rendement algal (LHRA), un circuit recyclé simple et un circuit ouvert.

L'étude des performances zootechniques a montré que l'eau issue du LHRA améliore sensiblement la survie des bars mais ne modifie pas leur croissance en circuit recyclé.

Par contre, les bars des deux circuits recyclés ont un poids moyen inférieur de 15 % à ceux du circuit ouvert au bout d'un an d'élevage. Cette baisse de croissance est associée à une diminution de l'alimentation. Une concentration excessive en dioxyde de carbone, lorsque la charge des poissons dépasse  $50 \text{ kg/m}^3$ , est probablement à l'origine de ce phénomène.

Le LHRA ne modifie pas les proportions des différentes formes de l'azote inorganique dissous (NID) dans les circuits recyclés. Pendant l'année d'expérimentation, le traitement par le LHRA a permis d'éliminer en moyenne 22 % du NID, principalement sous forme de nitrate, mais la concentration en phosphates n'a pas été significativement réduite. L'addition de soude dans le circuit recyclé pour maintenir un pH optimal a probablement pour conséquence une précipitation des phosphates.

Le taux de renouvellement de l'eau neuve dans le circuit ouvert a été en moyenne 60 fois plus important que dans les deux circuits recyclés. Pour évaluer l'effet de substances qui se concentrent dans les circuits recyclés, nous avons dosé d'une part quelques métaux dans le foie et le muscle et d'autre part certains biomarqueurs de détoxification dans le foie des poissons.

Le dosage des métaux montre une variabilité importante entre les individus issus d'un même circuit, mais l'analyse statistique révèle que sur les douze métaux analysés, sept d'entre eux s'accumulent dans le muscle et quatre dans le foie des poissons du circuit recyclé. Toutefois, les niveaux de concentration de métaux accumulés sont équivalents ou inférieurs à ceux mesurés habituellement dans les poissons élevés ou pêchés et ils sont très inférieurs aux concentrations recommandées par la FAO/WHO pour la consommation humaine.

L'analyse des biomarqueurs a révélé un bon état général des poissons, une faible induction de l'activité EROD dans les deux circuits recyclés, ce qui évoque un faible niveau de pollution organique dans ces circuits. Par ailleurs, une faible induction de la SOD dans le circuit recyclé serait liée à une accumulation de cadmium dans le foie de ces poissons.

Le traitement par le LHRA a permis d'éviter la bioaccumulation des métaux testés, à l'exception du chrome et de l'arsenic, de supprimer le stress oxydant à l'origine de l'induction de la SOD, mais pas d'éliminer le ou les composés à l'origine de l'induction de l'EROD.

La sensibilité des biomarqueurs utilisés a permis de mettre en évidence des différences de qualité d'eau entre les circuits et l'utilisation en aquaculture de ces indicateurs précoces de l'état de santé des poissons en élevage paraît pertinente.

Nous avons également étudié les paramètres qui déterminent la cinétique d'épuration de l'azote et du phosphore dans les bassins de LHRA, la production d'algue associée à cette épuration ainsi que la capacité photosynthétique des ulves dans l'effluent recyclé.

En ce qui concerne l'épuration de l'azote, les fortes concentrations en nitrates de l'effluent recyclé favorisent son absorption et la présence d'ammoniaque améliore le rendement épuratoire. Cette épuration dépend essentiellement des facteurs climatiques qui activent les systèmes enzymatiques d'absorption pour la production primaire ou pour le stockage lorsque les conditions sont favorables ou défavorables à la croissance des algues.

La concentration en phosphate dépend de deux mécanismes qui s'opposent : la précipitation/solubilisation du phosphate tricalcique, qui est favorisée par un faible taux de renouvellement dans le LHRA et l'absorption des phosphates par les algues pour la production primaire, qui est améliorée par l'augmentation du taux de renouvellement. Contrairement à la précipitation, l'absorption pour la production primaire n'est efficace que lorsque les conditions climatiques sont favorables, mais elle permet d'éliminer définitivement le phosphate de l'effluent.

La croissance algale dépend d'abord de la lumière et de la température puis de la densité algale et enfin du taux de renouvellement dans le LHRA. Lorsque les conditions climatiques sont favorables, une densité algale initiale inférieure à 0,2 gPS.l<sup>1</sup> et un taux de renouvellement de 4 vol.j<sup>-1</sup> permettent un rendement algal maximal avec une absorption maximale de NID (1,5 gN.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup>) et une absorption maximale de phosphate (0,1 gP.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup>).

L'étude in vitro des capacités photosynthétiques des ulves montre que le carbone inorganique dissous dans l'effluent recyclé est un facteur limitant. Une concentration en C-CID de 20 mg.l<sup>1</sup> et un pH inférieur à 8 sont les conditions requises pour que la photosynthèse ne soit plus limitée dans le LHRA. La concentration en CO<sub>2</sub> est contrôlée dans le circuit d'élevage mais on peut améliorer l'influx de C-CID disponible pour les algues en prélevant l'effluent en sortie de bassin d'élevage ou de filtre biologique et en augmentant son débit dans les bassins de LHRA.

- Adams, S.M., Crumby, W.D., Greeley, M.S., Jr, Shugart, L.R., Saylor, C.F., 1992. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 24: 347-360.
- Aderhold, D., Williams, C.J., Edyvean, R.G.J., 1996. The removal of heavy-metal ions by seaweeds and their derivatives. *Bioresource Technology*, 58: 1-6.
- Aït-Aïssa, S., Porcher, J.M., Arrigo, A.-P., Lambré, C., 2000. Activation of the hsp 70 promoter by environmental inorganic and organic materials : relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology*, 145: 147-157.
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C., Novelli, E.L.B., 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment international*, 27: 673-679.
- Arnold, K. E., Murray, S. N., 1980. Relationships between irradiance and photosynthesis for marine benthic green algae (Chlorophyta) of differing morphologies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 43: 183-192.
- Atkinson, M.J., Smith, S.V., 1983. C:N:P ratios of benthic marine plants. *Notes in Limnology and Oceanography*, 28, (3): 568-574.
- Au, D.W.T., Wu, R.S.S., 2001. A field study on EROD activity and quantitative hepatocytological changes in an immature demersal fish. *Environmental Pollution*, 115: 23-32.
- Ausseil, O., 1997. Etude en laboratoire de la croissance de macroalgues. Mémoire de DEA de sciences de l'eau dans l'environnement continental. Université Montpellier I.
- Austin, B, 1999. The effects of pollution on fish health. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 85: 234S-242S.
- Azov, Y., Shelef, G., 1982. Operation og high-rate oxydation ponds: theory and experiments. *Water Research*, 16: 1153: 1160.
- Babo, S., Vasseur, P., 1992. In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 22: 61-68.
- Bagenal, T.B., Tesch, F.W., 1978. Methods for assessment of fish production in fresh waters. In: Bagenal, T.B. (Ed.), *Age and growth*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 101-136.
- Baker, R.T.M., Handy, R.D., Davies, S.J., Snook, J.C., 1998. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet, *Chelon labrosus*. *Marine Environmental Research*, 45: 357-365.
- Baker, R.T.M., Martin, P., Davies, S.J., 1997. Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. *Aquatic Toxicology*, 40: 51-61.

Barnabé, G., 1976. Contribution à la connaissance de la biologie du loup *Dicentrarchus labrax* (L.) (Poisson Serranidae) de la région de Sète. Thèse de doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 426 pp.

Barnabé, G., 1990. Rearing bass and gilthead bream. In: Barnabé, G. (Ed.), Aquaculture. Ellis Horwood, New York, pp. 647-686.

Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.A., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdings, J., 1985. The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger, New York, USA.

Belfroid, A.C., Sijm, D.T.H.M., van Gestel, C.A.M., 1996. Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environmental Research*, 4: 276-299.

Benschneider, K., Robinson, R. J., 1952. A new spectrophotometric determination of nitrite in seawater. *Journal of Marine Research* 11, 87-96.

Bieleski, R.L., Fergusson, I.B., 1983. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Encyclopedia of plant physiology, New Series, Vol. 15A: Inorganic Plant nutrition. Springer-Verlag, pp. 449.

Björk, M., Haglund, K., Ramazanov, Z., Garcia-Reina, G., Pedersén, M., 1992. Inorganic carbon assimilation in the green seaweed *Ulva rigida* C. Ag. (Chlorophyta). *Planta*, 187: 152-156.

Blancheton, J.P., 2000. Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species. *Aquacultural Engineering*, 22: 17-31.

Blancheton, J.P., de la Pomélie, C., Vincent, M., 1996. Potential gains through new rearing technologies: culture in recirculation systems. Seabass and Seabream culture: problems and prospects. International workshop on Seabass and seabream culture, Verone, Italy. European Aquaculture Society, Oostende, pp. 189-205.

Boeuf, G., Le Bail, P.Y., 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture*, 177: 129-152.

Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130: 411-423.

Bogé, G., Bussiere, D., Pérès, G., 1988. Effets du chrome hexavalent sur les fonctions de la bordure en brosse de l'intestin de la truite arc en ciel (*Salmo gairdneri* R.). *Water research*, 22 (4): 441-447.

Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J., Yamada, K.M., 1999. Subcellular fractionation and isolation of organelles. *Current Protocols in Cell Biology*, 1: 3.0.1-3.11.22.

Bosca, C., Dauta, A., 1991. Effet des variations d'énergie lumineuse associées à l'agitation verticale sur le bilan photosynthétique de cultures intensives d'algues en bassin. *Revue des Sciences de l'eau*, 4: 381-392.

- Bower, C.E., Bidwell, J.P., 1978. Ionisation of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and salinity. *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 1012-1016.
- Bradford, M.M., 1976. "A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bruslé, J., Roblin, C., 1984. Sexualité du loup *Dicentrarchus labrax* en conditions d'élevage contrôlé. In : Barnabé, G., Billard, R. (Eds.), *L'aquaculture du bar et des sparidés*. Inra Publications, Paris, pp. 33-43.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Péres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: effect on digestive enzymes. *Aquaculture*, 161: 479-489.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula : a practical approach. *The Science of the Total Environment*, 247: 295-311.
- Caliceti, M., Argese, E., Sfriso, A., Pavoni, B., 2002. Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon. *Chemosphere*, 47: 443-454.
- Canli, M., Atli, G., 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental pollution*, 121:129-136.
- Canovas, S., Casellas, C., Picot, B., Pena, G., Bontoux, J., 1991. Evolution annuelle du peuplement zooplanctonique dans un lagunage à haut rendement et incidence du temps de séjour. *Revue des Sciences de l'Eau*, 4: 269-289.
- Chassagny de Casabianca, M.L., 1988. Production de macrophytes et épuration. Incidence de la récolte- en milieu lagunaire eutrophisé avec *Ulva lactuca* - sur eaux résiduares avec *Eichornia crassipes*. *Colloque VALVA*, 115-118.
- Claireaux, G., Lagardère, J.P., 1999. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research*, 42: 157-168.
- Cohen, I., Neori, A., 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents. I. Ammonia uptake kinetics and nitrogen content. *Botanica Marina*, 34: 475-482.
- Corsi, I., Aurigi, S., Focardi, S., 1998. Risposte deele monossigenasi a funzione mista in organismi provenienti da diversi impianti di acquacoltura. *Biol. Mar. Medit.*, 5 (3): 889-893.
- Corzo, A., Niell, F.X., 1992. Inorganic nitrogen metabolism in *Ulva rigida* illuminated with blue light. *Marine Biology*, 112: 223-228.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Vasseur, P., 1997. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux domestiques. In : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., (Eds). *Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux*. Masson, Londres, Paris, New York, pp. 125-147.

Craggs, R. J., Smith, V.J., McAuley, P.J., 1995. Wastewater nutrient removal by marine microalgae cultured under ambient conditions in mini-pond. *Water Science and Technology*, 31: 151-160.

Davis, T.A., Volesky, B., Vieira, R.H.S.F., 2000. *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. *Water Research*, 34 :4270-4278.

DeBusk, T. A., Blakeslee, M., Ryther, J.H., 1986. Studies on the outdoor cultivation of *Ulva lactuca* L.. *Botanica Marina*, 29: 381-386.

Deddouche, J., 2001. Etude des communautés (phytoplanctoniques, zooplanctoniques et macroalgues) dans un élevage de bars (*Dicentrarchus labrax*) en circuit recyclé. Mémoire de maîtrise de biologie des écosystèmes et des populations. Université Montpellier II.

De Pauw, N., Verlet, H., Deleenkeer, L., 1980. Heated and unheated outdoor cultures of marines algae with animal manure. *Algae Biomass*. S.S. Eds. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press. 315-341.

Deviller, G., 1999. Traitement d'effluent aquacole par lagunage à haut rendement : conditions de fonctionnement et modélisation. Mémoire de DEA de sciences de l'eau dans l'environnement continental, Université Montpellier I.

Dhainaut, A., Bonaly, J., Barque, J.P., Minier, C., Caquet, T., 1997. Protéines de choc thermique et résistance multixénobiotique. In : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., (Eds). *Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux*. Masson, Londres, Paris, New York, pp. 67-95.

Doran, M.D., Boyle, W.C., 1979. Phosphorus removal by activated algae. *Water Research*, 13: 805-812.

Duke, C.S., Lapointe, B., Ramus, E.J., 1986. Effects of light on growth, RuBPCase activity and chemical composition of *Ulva* species (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 22: 362-370.

Eastwood, S., Couture, P., 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. *Aquatic toxicology*, 58: 43-56.

Falkowski, P.G., 1975. Nitrate uptake in marine phytoplankton: comparaison of half-saturation constants from seven species. *Limnology and Oceanography*, 20 (3): 412-417.

Fallowfield, H. J., Garrett, M.K., 1985. The treatment of wastes by algal culture. *J. Appl. Bact., Symp. Suppl.*, 187S-205S.

FAO/WHO, 1989. Codex committee on food additives and contaminants. 24<sup>th</sup> session. Joint FAO/WHO food standards programme.

FAO/WHO, 1998. Codex committee on food additives and contaminants. 31<sup>st</sup> session. Joint FAO/WHO food standards programme.

FAO/WHO, 2001. Codex committee on food additives and contaminants. 33<sup>rd</sup> session. Joint FAO/WHO food standards programme.

Fenet, H., Casellas, C., Bontoux, J., 1998. Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in European eel and rainbow trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 137-143.

Fent, K., Bucheli, T.D., 1994. Inhibition of hepatic microsomal monoxygenase system by organotins in vitro in freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 28: 107-126.

Fillit M., 1995. Eutrophication et macroalgues dans une lagunes littorale méditerranéenne (étang de Méjean-Pérols) : L'étang change les ulves prospèrent. Thèse de doctorat. Université Montpellier II, 196 pp.

Flammarion, P., Migeon, B., 1998. Statistical Analysis of Cyprinid Ethoxyresorufin-O-deethylase data in a Large French Watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40 (1-2): 144-153.

Franklin, L.A., Levavasseur, G., Osmond, C.B., Henley, W.J., Ramus, J., 1992. Two components of onset and recovery during photoinhibition of *Ulva rotundata*. *Planta*, 183: 399-408.

Frost-Christensen, H., Sand-Jensen, K., 1990. Growth rate and carbon affinity of *Ulva lactuca* under controlled levels of carbon, pH and oxygen. *Marine Biology*, 104: 497-501.

Gardeur, J.N., Lemarié, G., Coves, D., Boujard, T., 2001. Typology of individual growth in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 14: 223-231.

Glibert, P.M., Landsberg, J.H., Evans, J.J., Al-Sarawi, M.A., Faraj, M., Al-Jarallah, M.A., Haywood, A., Ibrahim, S., Klesius, P., Powell, C., Shoemaker, C., 2002. A fish kill of massive proportion in Kuwait Bay, Arabian Gulf, 2001: the roles of bacterial disease, harmful algae and eutrophication. *Harmful Algae*, Vol. 1, Issue 2, pp. 215-231.

Gloyna, E.F., 1972. Bassins de stabilisation des eaux usées. OMS, Genève.

Goldman, J. C., Tenore, K.R., Stanley, H. I., 1974a. Inorganic nitrogen removal in a combined tertiary treatment-marine aquaculture system - II. Algal bioassays. *Water Research*, 8: 55-59.

Goldman, J.C., Tenore, K.R., Ryther, J.H., Norwin, N., 1974b. Inorganic nitrogen removal in a combined tertiary treatment-marine aquaculture system-I. Removal efficiencies. *Water Research*, 8: 45-54.



- Gordon, D.M., Birch, P.B., McComb, A.J., 1981. Effects of inorganic nitrogen on the growth of an estuarine *Cladophora* in culture. *Botanica Marina*, 24: 93-106.
- Gravato, C., Santos, M.A., 2003a. *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 300-306.
- Gravato, C., Santos, M.A., 2003b. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 352-358.
- Gravato, C., Santos, M.A., Magalhaes, I., 2000. Juvenile *Dicentrarchus labrax* L. biochemical and genotoxic responses after short-term exposure to  $\beta$ -naphthoflavone and contaminated harbour waters. *Fresenius Environmental Bulletin*, 9: 269-274.
- Grosell, M.H., Hogstrand, C., Wood, C.M., 1998. Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu-acclimated and non-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 40: 275-291.
- Guerin-Ancey, O., 1976. Etude expérimentale de l'excrétion azotée du bar (*Dicentrarchus labrax*) en cours de croissance. I. effets de la température et du poids du corps sur l'excrétion d'ammoniac et d'urée. *Aquaculture*, 9: 71-80.
- Guerrero, M.G., Vega, J.M., Losada, M., 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 32: 169-204.
- Guo, Z., Mathieson, A.C., 1992. Physiological ecology of four ulvoid green algae. *Botanica Marina*, 35: 523-533.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathion-S-transferases: the first enzymatic step in mercurapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Hagopian, D.S., Riley, J.G., 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering*, 18: 223-244.
- Haywood, G.P., 1983. Ammonia toxicity in teleost fish: a review. *Can. Tech. Rep. Aquatic Sciences*, 1177: 1-35.
- Henley, W.J., Levavasseur, G., Franklin, L.A., Lindley, S.T., Ramus, J., Osmond, C.B., 1991a. Diurnal responses of photosynthesis and fluorescence in *Ulva rotundata* acclimated to sun and shade in outdoor culture. *Marine Ecology-Progress Series*, 75: 19-28.
- Henley, W.J., Levavasseur, G., Franklin, L.A., Osmond, C.B., Ramus, J., 1991b. Photoacclimation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influenced by nitrogen availability. *Planta*, 184: 235-243.
- Hill, R., Bandall, F., 1960. Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature*, 186: 136-137.

- Hirayama, K., Mizuma, H., Mizue, Y., 1988. The accumulation of dissolved organic substances in closed recirculating culture systems. *Aquacultural Engineering*, 7: 73-87.
- Hoarau, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J.P., 2001. Differential induction of glutathione-S-transferases in the clam *Ruditapes decussates* exposed to organic compounds. *Environmental Toxicology Chemistry*, 20: 523-529.
- Hole, D.J., Emran, A.M., Fares, Y., Drew, M.C., 1990. Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiology*, 93: 642-647.
- Hollis, L., Burnison, K., Playle, R.C., 1996. Does the age of metal-dissolved organic carbon complexes influence binding of metals to fish gills? *Aquatic Toxicology*, 35: 253-264.
- Hollis, L., Muench, Playle, R.C., 1997. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. 50: 703-720.
- Hussenot, J., Lefebvre, S., Brossard, N., 1998. Open air treatment of wastewater from land-based marine fish farms in extensive and intensive systems: current technology and future perspectives. *Aquatic Living Resources*, 11 (4): 297-304.
- Jiménez del Rio, M., Ramazanov, Z., Garcia-Reina, G., 1994. Optimisation of yield and biofiltering efficiencies of *Ulva rigida* C. Ag. cultivated with *Sparus aurata* L. wastewaters. *Scientia Marina*, 58: 329-335.
- Jiménez del Rio, M., Ramazanov, Z., Garcia-Reina, G., 1996. *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. *Hydrobiologia*, 326/327: 61-66.
- Jobling, M., Baardvik, B.M., 1994. The influence of environmental manipulations on inter- and intra-individual variation in food acquisition and growth performance of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, 44: 1069-1087.
- Köhler, A., Pluta, H.J., 1995. Lysosomal injury and MFO activity in the liver of Flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to histopathology of hepatic degeneration and carcinogenesis. *Marine Environmental Research*, 39: 225-260.
- Kljakovic Gašpic, Z., Zvonaric, T., Vrgoc, N., Odzak, N., Baric, A., 2002. Cadmium and lead in selected tissues of two commercially important fish species from the Adriatic Sea. *Water Research*, 36: 5023-5028.
- Kraal, M.H., Kraak, M.H.S., De Groot, C.J., Davids, C., 1995. Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 179-183.
- Krom, M.D., Van Rijn J., 1989. Water quality processes in fish culture systems : processes, problems, and possible solutions. In N. De Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors & N. Wilkins (eds), *Aquaculture, A Biotechnology in Progress*, European Aquaculture Society, Berdene : 1091-1111.

- Lackner, R., 1998. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B., (Eds), *Fish Ecotoxicology*. Birkhauser, Basel, pp. 203-224.
- Lacut, A., 1999. Effet d'une hypoxie modérée et de chocs hypoxiques sur le métabolisme et la croissance du turbot juvénile (*Psetta maxima*). Université de Bretagne Occidentale. DEA d'océanologie biologique et environnement marin.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lavenant, M., de la Pomélie, C., Paquotte, P., 1995. Aquaculture en système clos: estimation des coûts de production pour l'élevage du bar et du turbot. *Cahiers Options Méditerranée*, 14: 149-168.
- Lavery, P.S., McComb, A.J., 1991b. The nutritional eco-physiology of *Chaetomorpha linum* and *Ulva rigida* in Peel Inlet, Western Australia. *Botanica Marina*, 34: 251-260.
- Lee, R.B., Drew, M.C., 1986. Nitrogen-13 studies on nitrate fluxes in barley roots. II. Effect of plant N-status on the kinetic parameters of nitrate influx. *Journal of Experimental Botany*, 37: 1768-1779.
- Lemaire, P., Förlin, L., Livingstone, D., 1996. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene,  $\beta$ -naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 36:141-160.
- Lemaire-Gony, S., Lemaire, P., Pulsford, A.L., 1995. Effects of cadmium and benzo(a)pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, 31: 297-313.
- Lemarié, G., Dosdat, A., Covès, D., Dutto, G., Gasset, E., Person-Le Ruyet, J., 2003. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, In press.
- Lemarié, G., Dutto, G., Le Roux, A., Lemoalle, J., Maxime, V., Person- Le Ruyet, J., 2000. Long-term effects of pH and carbon dioxide on growth and feed efficiency in European seabass. In: Rosa Flos, Leroy Creswell (eds.). *Responsible aquaculture in the new millennium AQUA 2000*, May 2-6, 2000, Nice, France. European aquaculture society special publication, 28 : 384.
- Lemarié, G., Martin, J.L.M, Dutto, G., Garidou, C., 1998. Nitrogenous and phosphorous waste production in a flow-through land-based farm of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 11: 247-254.
- Lemarié, G., Toften, H., 2003. Water quality, feed intake and growth in european seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) in relation to water renewal rate. Beyond monoculture International conference *Aquaculture Europe 2003*, Trondheim, Norway, August 8-12, 2003. European Aquaculture Society, Special Publication, No 33, p. 242-243. Abstract.

- Leonard, N., 2000. Recherche et élimination des facteurs inhibiteurs de croissance dans les élevages piscicoles en circuit fermé. Thèse de doctorat. Université Montpellier II, 165 pp.
- Leonard, N., Gasset, E., Cailleres, J.P., Guiraud, J.P., Blancheton, J.P., 1999. Bacteria and humic substances in a recirculating system for sea bass production. In : Towards predictable quality, Aquaculture Europe 99, Trondheim, Norway. Lindsay, L., Reinertsen, H., (Eds), European Aquaculture Society, Special Publication n°27, Oostende, Belgium, june, p. 149.
- Leonard, N., Guiraud, J.P., Gasset, E., Cailleres, J.P., Blancheton, J.P., 2002. Bacteria and nutrients-nitrogen and carbon-in a recirculating system for sea bass production. *Aquacultural Engineering*, 26: 11-127.
- Levavasseur, G., Edwards, G.E., Osmond, C.B., Ramus, J., 1991. Inorganic carbon limitation of photosynthesis in *Ulva Rotundata* (Chlorophyta). *Journal of. Phycology*, 27: 667-672.
- Levavasseur, G., Giraud, G. 1982. Modification de la photosynthèse nette d'une ulve de Roscoff en fonction de la durée d'éclairement. *Physiol. Veg.*, 20 : 143-154.
- Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billinghamurst, Z., Depledge, M.H., 1999. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8: 351-368.
- Liang, Y., Cheung, R.Y.H., Wong, M.H., 1999. Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish: bioaccumulation of trace metals in fish. *Water Research*, 33: 2690-2700.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 656-666.
- Lundberg, P., Weich, R.G., Jensen, P., Vogel, H.J., 1989. Phosphorus-31 and nitrogen-14 NMR studies of the uptake of phosphorus and nitrogen compounds in the marine macroalgae *Ulva lactuca*. *Plant Physiology*, 89: 1380-1387.
- Luoma, S.N., Bryan, G.W., Langston, W.J., 1982. Scavenging of heavy metals from particulates by brown seaweed. *Marine Pollution Bulletin*, 13: 394-396.
- Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee, M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L., McCume, D.C., Rattner, B.A., 1992. Metabolic products as biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 5-86.
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-16.
- Menesguen, A. 1992. Modelling coastal eutrophication: the case of French *Ulva* mass blooms. *Science of the Total Environment*, supplément 1992.
- Mesplé, F., 1993. Modélisation des processus biologiques et physico-chimiques dans un écosystème aquatique eutrophe : le lagunage à haut rendement. Thèse de doctorat. Université Montpellier I, 300pp.

- Mesplé, F., Casellas, C., Troussellier, M., Bontoux, J., 1996. Modelling orthophosphate evolution in a high rate algal pond. *Ecological Modelling*, 89: 13-21.
- Monnot, L., 1995. Mise au point d'un système de lagunage à haut rendement pour le traitement d'effluents piscicoles marins- étude du peuplement bactérien hétérotrophe aéro-anaérobie. Mémoire de DEA National d'hydrologie. Université Montpellier I.
- Morgan, J.D., Iwama, G.K., 1991. Effects of salinity on growth, metabolism and ion regulation in juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 2083-2094.
- Moutin, T., Gal, J.Y., El Halouani, H., Picot, B., Bontoux, J., 1992. Decrease of phosphate concentration in a high rate pond by precipitation of calcium phosphate: theoretical and experimental results. *Water Research*, 26: 1445-1450.
- Murphy, J., Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27: 31-36.
- Mushiake, K., Nakai, T., Muroga, K., 1985. Lowered phagocytosis in the blood of eels exposed to copper. *Fish Pathology*, 20: 49-53.
- Neori, A., 1996. The type of N-supply (ammonia or nitrate) determines the performance of seaweed biofilters integrated with intensive fish culture. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 48: 19-27.
- Neori, A. Cohen, I., Gordin, H., 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents, II. Growth rate, yield and C:N ratio. *Botanica Marina*, 34: 483-489.
- Neori, A., Krom, M.D., Ellner, S.P., Boyd, C.E., Popper, D., Rabinovitch, R., Davison, P.J., Dvir, O., Zuber, D., Ucko, M., Angel, D., Gordin, H., 1996. Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish-seaweed culture units. *Aquaculture*, 141:183-199.
- NRC: Committee on biological markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, 74: 3-9.
- Nurdoğan, Y., Oswald, W.J., 1995. Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. *Water Science and Technology*, 31: 33-43.
- Odzak, N., Zvonaric, T., 1995. Cadmium and lead uptake from food by the fish *Dicentrarchus labrax*. *Water Science and Technology*, 32: 49-55.
- Oswald, W.J., 1963. High rate pond in waste disposal. *Developments in Industrial Microbiology*, 4: 112-119.
- Oswald, W. J., Gotaas, H.B., 1957. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.*, 122: 73-105.
- Otto, D.M.E., Lindstrom-Seppa, P., Sen, C.K., 1994. Cytochrome P-450-dependent enzymes and oxidant-mediated responses in

- rainbow trout exposed to contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 27: 265-280.
- Pagand, P., 1999. Traitement des effluents piscicoles marins par lagunage à haut rendement algal. Thèse de doctorat. Université Montpellier I, 218pp.
- Pagand, P., Blancheton, J.P., Casellas, C., 2000a. A model for predicting the quantities of dissolved inorganic nitrogen released in effluents from a sea bass (*Dicentrarchus labrax*) recirculating water system. *Aquacultural Engineering*, 22: 137-153.
- Pagand, P., Blancheton, J.P., Lemoalle, J., Casellas, C., 2000b. The use of high rate algal ponds for the treatment of marine effluent from a recirculating fish rearing system. *Aquaculture Research*, 31: 729-736.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70: 158-169.
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 154: 536-541.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology*, 50: 109-124.
- Parker, H.S., 1981. Influence of relative water motion on the growth, ammonium uptake and carbon and nitrogen composition of *Ulva lactuca* (chlorophyta). *Marine Biology*, 63: 309-318.
- Pawson, M.G., Pickett, G.D., 1987. The bass, *Dicentrarchus labrax*, and management of its fishery in England and Wales. MAFF Directorate of Fisheries Research Lab., leaflet 59, Lowestoft.
- Pedersen, P.B., 1998. Status of recirculation technology in Denmark. ICES 1998/L:8.
- Pérez Cid, B., Boia, C., Pombo, L., Rebelo, E., 2001. Determination of trace metals in fish species of the Ria de Aveiro (Portugal) by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 75: 93-100.
- Person-Le-Ruyet, J., Bœuf, G., 1998. L'azote ammoniacal, un toxique potentiel en élevage de poissons : le cas du Turbot. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 350-351: 393-412.
- Person-Le-Ruyet, J., Chartois, H., Quemener, L., 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture*, 136: 181: 194.
- Pickett, G.D., Pawson, M.G., 1994. Sea Bass: Biology, Exploitation and Conservation. Fish and Fisheries Series 12, Chapman and Hall, London.
- Precht, H., Christophersen, J., Hensel, J., 1955. *Temperatur und Leben*. Springer, Berlin.

Przytocka, M., Duszota, K. Matusiak, M.R., 1984. Intensive culture of *Chlorella vulgaris*/AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters. *Water Research*, 18: 1-7.

Richmond, A., Vonshak, A., Shoshana (Malis) arad, 1980. Environmental limitations in outdoor production of algal biomass. In: Shelef and Soeder (Eds). *Algae Biomass*. Elsevier, Amsterdam, pp. 65-72.

Roesijadi, G., Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, pp. 387-420.

Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, 48: 185-194.

Rosenberg, G., Ramus, J., 1982. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): photosynthesis and antenna composition. *Marine Ecology-Progress Series*, 8: 233-241.

Schuenhoff, A., Shpigel, M., Lupatsch, I., Ashkenazi, A., Msuya, F.E., Neori, A., 2003. A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture*, 221: 167-181.

Shelef, G., Moraine, R., Oron, G., 1978. Photosynthetic biomass production from sewage. *Archives fur Hydrobiology*, 11: 3-14.

Slooff, W., van Kreijl, C.F., Baars, A.J., 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*, 4: 1-14.

Solidoro, C., Brando, V.E., Dejak, C., Franco, D., Pastres, R., Pecenic, G., 1997. Long term simulations of population dynamics of *Ulva* r. in the lagoon of Venice. *Ecological Modelling*, 102: 259-272.

Solorzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 14: 799-801.

Spallholz, J.E., Boylan, L.M., 1991. Gluthatione peroxidase: the two selenium enzymes. *Peroxidases in Chemistry and Biology*, 1: 259-272.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Richard, T.D.G., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.

Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds). Aquatic Toxicology; Molecular Biochemical and Cellular perspectives. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, pp. 87-206.

Stien, X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Lafaurie, M., 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. Environmental Pollution, 99: 339-345.

Sunde, L.M., Imstrand, A.K., Folkvord, A., Stefansson, S.O., 1998. Effects of size grading on growth and survival of juvenile turbot at two temperatures. Aquaculture International, 6: 19-32.

Suner, M.A., Devesa, V., Munoz, O., Lopez, F., Montoro, R., Arias, A.M., Blasco, J., 1999. Total and inorganic arsenic in the fauna of the Guadalquivir estuary: environmental and human health implications. The Science of the Total Environment, 242: 261-270.

Tanguy, R., Le Grel, L., 1989. Projet d'élevage de loups en mer : étude technico-économique du pré-grossissement et de grossissement. Rapport interne de la direction des ressources vivantes. DRV-89.021-RA/SDA Palavas, IFREMER, 91p.

Tuvikene, A., Huuskonen, S., Koponen, K., Ritola, O. Mauer, U., Lindstrom-Seppa, P., 1999. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. Environmental Health Perspectives, 107: 745-752.

US Food and Drug Administration, 1993. Guidance document for chromium in shellfish. Center for food safety and applied nutrition.

Vaglio, A., Landriscina, C., 1999. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. Ecotoxicology and Environmental Safety, 43: 111-116.

Vandeputte, C., Guizon, I., Genesti-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G., 1994. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. Cell Biology and Toxicology, 10: 415-421.

Vandermeulen, H., Gordin, H., 1990. Ammonium uptake using *Ulva* (Chlorophyta) in intensive fishpond systems: mass culture and treatment of effluent. Journal of Applied Phycology, 2: 363-374.

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

Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. Aquatic Toxicology, 36: 189-222.

Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicology, 5: 217-225.



Varanasi, U., Stein, J.E., Nishimoto, M., Reichert, W.L., Collier, T.K., 1987. Chemical carcinogenesis in feral fish: uptake, activation and detoxification of organic xenobiotics. *Environmental Health Perspectives*, 71: 155-170.

Viarengo, A., Bettella, E., Fabbri, R., Burlando, B., Lafaurie, M., 1997. Heavy metals inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metals effects. *Marine Environmental Research*, 44: 1-11.

Villares, R., Puente, X., Carballeira, A., 2002. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds. *Environmental Pollution*, 119: 79-90.

Villon, N., Phelepp, C., Martin, Y., 1989. Traitement et valorisation des eaux usées de bassins d'élevage de poissons marins: production de plancton et utilisation en élevages larvaires de lousps ou de daurades. *Vie Marine*, 10: 39-50.

Wallentinus, I., 1984. Comparaisons of nutrient uptake rates for Baltic macroalgae with different thallus morphologies. *Marine Biology*, 80: 215-225.

Wang, N., Hayward, R.S., Noltie, D.B., 1998. Variation in food intake, growth and growth efficiency among juvenile hybrid sunfish held individually. *Aquaculture*, 167: 43-52.

Webb, W.L., Newton, M., Starr, D., 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia*, 17 : 281-291.

Westfall, B.A., 1945. Coagulation film anoxia in fishes. *Ecology*, 26: 283-287.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.

Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 30: 347-570.

Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Jr, Fong, J.H., Blanchard, K.A., 1998. A rapid gas-chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 24: 480-493.

Wood, E.D., Armstrong, F.A.J., Richards, F.A., 1967. Determination of nitrate in seawater by cadmium-copper reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 47: 23-31.

Zavodnik, N., 1987. Seasonal variations in the rate of photosynthetic activity and chemical composition of the littoral seaweeds *Ulva rigida* and *Porphyra leucostica* from the North Adriatic. *Botanica Marina*, 30: 71-82.

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Caractéristiques physico-chimiques de quelques effluents issus d'élevage en circuits ouverts et recyclés	16
Tableau I.2 : Caractéristiques techniques des bassins de lagunage	26
Tableau I.3 : Données biométriques des poissons élevés	28
Tableau I.4 : Composition moyenne des aliments utilisés au cours de l'expérimentation	29
Tableau I.5 : Périodes d'utilisation des différents types d'aliment	29
Tableau I.6 : Fréquence, point de prélèvement et matériel de mesure des paramètres de qualité d'eau	30
Tableau I.7 : Valeurs théoriques et fréquence de contrôle des différents débits dans les circuits testés	30
Tableau I.8 : Calendrier des rations libérées par les distributeurs d'aliment	31
Tableau I.9 : Natures et méthodes d'analyse des échantillons d'eau prélevés dans les circuits	33
Tableau II.1: Concentrations de métaux mesurés dans le muscle de quelques poissons du bassin Méditerranéen.	65
Tableau II.2 : Concentrations de métaux mesurés dans le foie de quelques poissons du bassin Méditerranéen	66
Tableau II 3 : Doses maximales de métaux toxiques recommandées par la FAO/WHO pour la consommation humaine	64
Tableau II.4 : Activité EROD dans le foie de bars ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) pêchés ou élevés avec et/ou sans stimulation chimique	69
Tableau II.5 : Biomarqueurs biochimiques mesurés dans le foie de <i>Dicentrarchus labrax</i> , <i>Brachydanio rerio</i> et <i>Sparus aurata</i> pêchés ou élevés avec et/ou sans pollution	75
Tableau II.6 : Méthodes de références et unités utilisées pour l'analyse des biomarqueurs	80
Tableau II.7 : Mesures biométriques des poissons testés pour la détermination des biomarqueurs	81
Tableau II.8 : Mesures biométriques des poissons testés pour la détermination des métaux traces	82
Tableau II.9: concentrations en métaux traces des muscles de poissons provenant des différents circuits d'élevage	84

Tableau II.10: Concentration en métaux traces des foies de poissons provenant des différents circuits d'élevage	85
Tableau III.1: Fréquence de récolte des algues, densités algales et taux de renouvellement testés dans les paramètres les deux LHRA	108
Tableau III.2: Concentrations moyennes en azote inorganique dissous de l'effluent en entrée de LHRA	114
Tableau III.3: Concentrations en phosphates de l'effluent en entrée de LHRA	121
Tableau III.4 : Concentrations en nutriments des eaux issues du LHRA et de l'étang	133
Tableau III.5 : Paramètres photosynthétiques d'ulves dans l'eau du LHRA et de l'étang	134
Tableau III.6 : Concentrations en nutriments des eaux testées pour la série A	136
Tableau III.7 : Paramètres photosynthétiques d'ulves (série A) soumises à des variations de CID	136
Tableau III.8 : Concentrations en nutriments des eaux testées pour la série B	138
Tableau III.9 : Paramètres photosynthétiques d'ulves (série B) soumises à des variations de concentration en CID	138

## LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : photo d'un spécimen de bar ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	13
Figure I.1 : Représentation schématique des systèmes d'élevage ouvert, recyclé et recyclé-laguné	23
Figure I.3 : Système de distribution de l'aliment	24
Figure I.4 : Schéma d'un bassin de lagunage à haut rendement algal (LHRA)	26
Figure I.5 : Taux de renouvellement de l'eau neuve en fonction de la biomasse dans les bassins des circuits d'élevage	37
Figure I.6 : Ratio R de fermeture dans les élevages en circuits recyclés	38
Figure I.7 : Proportion des formes de l'azote inorganique dissous dans l'effluent des circuits ouvert, recyclé et recyclé-laguné	39
Figure I.8 : Concentrations des différentes formes de l'azote inorganique dissous et des phosphates dans les effluents d'élevage	42
Figure I.9 : Concentration en oxygène, salinité, température et pH dans les circuits d'élevage	43
Figure I.10 : Mortalité cumulée des poissons dans les circuits d'élevage	44
Figure I.11 : Poids moyens et charges de poisson dans les circuits d'élevage	45
Figure I.12 : Evolution du taux de croissance des poissons dans les élevages	46
Figure I.13 : Comparaison du taux de croissance des poissons dans les élevages avec ceux simulés par le modèle de Tanguy & Le Grel	47
Figure I.14 : Evolution du taux de nourrissage des poissons dans les circuits	48
Figure I.15 : Taux de croissance des poissons en fonction de leur taux de nourrissage	49
Figure I.16 : Evolution de l'indice de conversion des poissons dans les circuits	50
Figure II.1 : Représentation simplifiée du devenir des xénobiotiques dans la cellule hépatique	68
Figure II.2: Schéma général des dommages provoqués par les espèces réactives de l'oxygène sur les macromolécules (d'après Lackner, 1998)	71
Figure II.3: Schéma du fractionnement d'hépatocytes des bars	79

Figure II.4: Facteur de condition (K) et index hépatosomatique (LSI) des bars dans les circuits.	81
Figure II.5: Analyse des biomarqueurs biochimiques chez les bars des trois circuits d'élevage	90
Figure III.1 : Courbe P/I décrivant la production photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse	106
Figure III.2. Absorption des différentes formes de NID en fonction de leur influx en entrée de LHRA	115
Figure III.3. Absorption de NID en fonction de la lumière incidente, de la photopériode et de la température	118
Figure III.4: Absorption de NID en fonction de la densité algale initiale	119
Figure III.5: Absorption de NID en fonction du taux de renouvellement	119
Figure III.6: Absorption de NID en fonction du rendement algal	120
Figure III.7. Absorption des phosphates en fonction de l'influx de phosphates, du taux de renouvellement, de la densité algale initiale dans les bassins de LHRA	123
Figure III.8. Absorption des phosphates en fonction de la lumière incidente, de la photopériode et de la température et du rendement algal dans les bassins de LHRA	126
Figure III.9: Détail d'algue majoritaire dans le LHRA en toutes saisons : <i>Ulva</i> sp.	127
Figure III.10: Détail d'algue majoritaire dans le LHRA en toutes saisons : <i>Enteromorpha</i> sp.	127
Figure III.11: Détail d'algue majoritaire dans le LHRA en toutes saisons : <i>Cladophora</i> sp.	128
Figure III.12 : Détail d'algues libres et fixées dans le LHRA	128
Figure III.13 : Rendement algal en fonction de la lumière, de la photopériode et de la température	130
Figure III.14 : Rendement algal en fonction de la densité algale initiale dans les bassins de LHRA	131
Figure III.15 : Rendement algal en fonction du taux de renouvellement de l'eau	132
Figure III.16 : Capacités photosynthétiques moyennes d'ulves mises en présence d'eaux issues du LHRA et issues de l'étang du Prévost	135
Figure III.17 : Capacités photosynthétiques moyennes d'ulves soumises à différentes concentrations de CID	137

Figure III.18 : Capacités photosynthétiques moyennes d'ulves (série B) soumises à différentes concentrations en CID	139
Figure III.19 : Production maximale des échantillons d'algues de la série A&B en fonction de la concentration en CID	140
Figure III.20 : Intensité de saturation des échantillons d'algues de la série A&B en fonction de la concentration en CID	141
Figure III.21 : Projection des variables sur les axes 1 et 2	146
Figure III.22 : Projection des variables sur les axes 1 et 3	146
Figure III.23 : Projection des valeurs saisonnières sur les axes 1 et 2	147

