REPUBLIQUE DU BENIN

---

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (M.E.S.R.S)

---

UNIVERSITE D'ABOMEY – CALAVI (UAC)

---

ECOLE DOCTORALE PLURIDISCIPLINAIRE ESPACES, CULTURES ET DEVELOPPEMENT

**Thèse de doctorat unique présentée par :**

*Armelle Sabine Yélignan HOUNKPATIN*

**Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi**

**Option : Gestion de l'Environnement**

**Spécialité: Environnement, Santé et Développement**

**Numéro d'Enregistrement :……**




# Risque d'exposition de la population de Ganvié aux ETM (Pb, Cd, Hg) et évaluation *in vivo* de l'effet protecteur de la « vitamine C » chez les rats Wistar intoxiqués

Sous la direction de :

Patrick A. EDORH

*Docteur en Toxicologie de l'Environnement*

*Professeur Titulaire*

*FAST/UAC*

*Soutenue publiquement le…… devant le Jury composé de :*

**Président :**

**Rapporteurs :**

**Examinateurs :**

# Sommaire

Sommaire ..... i
Dédicace ..... iv
Remerciements ..... v
Liste des sigles et abréviations ..... viii
Liste des tableaux ..... xiv
Liste des figures ..... xv
Liste des photos ..... xvii
Liste des annexes ..... xx
Résumé ..... xxi
Abstract ..... xxii
*INTRODUCTION GENERALE* ..... 1
*CADRE THEORIQUE* ..... 6
Problématique ..... 7
Justification ..... 10
Objectifs ..... 13
Objectif général ..... 13
Objectifs spécifiques ..... 13
Hypothèses ..... 13
*PREMIERE PARTIE:* ..... 15
*REVUE DE LITTERATURE* ..... 15
Chapitre 1 : Eléménts Traces Métalliques (Plomb, Cadmium et Mercure) ..... 16
I. Généralité sur les ETM ..... 16
1.1 Eléments Traces Métalliques (ETM) et Environnement ..... 16
1.2 Répartition et devenir des ETM dans l'environnement aquatique ..... 18
1.3 Biodisponibilité des ETM dans l'environnement aquatique ..... 19
1.4 Bioaccumulation ETM ..... 20
II. Caracteristique, source, toxicité et normes des ETM ..... 21
2.1 Plomb ..... 21
2.2 Cadmium ..... 23
2.3 Mercure ..... 27
2.4 Normes des ETM ..... 32
Chapitre 2 : Particularités anatomiques et histophysiologiques des organes cibles (foie, reins, cerveau) ..... 34
I. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du foie chez l'homme et les animaux ..... 34
1.1 Anatomie descriptive ..... 34
1.2 Unité fonctionnelle du foie ..... 35
1.3 Physiologie du foie ..... 38
II. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du rein chez l'homme et les animaux ..... 40
2.1 Morphologie du rein ..... 40
2.2 Anatomie du rein ..... 40
2.3 Organisation anatomique du rein ..... 40
2.4 Physiologie rénale ..... 43
III. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du cerveau chez l'homme et les animaux ..... 44
3.1 Morphologie du cerveau ..... 44
3.2 Anatomie du cerveau ..... 44
3.3 Organisation anatomique et physiologie du cerveau ..... 45
Chapitre 3 : Notion de radicaux libres, de stress oxydant et mécanisme de défense ..... 47

I. Notion de radicaux libres et de stress oxydant .....47
II. Mécanismes de défense contre le stress oxydant : systèmes anti-oxydants.....51
*DEUXIEME PARTIE: MATERIELETMETHODES* .....63
Chapitre 1 : Approche méthodologique d'évaluation du risque d'exposition de la population de Ganvié aux ETM (Pb, Cd, Hg).....64
I. Evaluation du degré de pollution par les ETM (plomb, cadmium et mercure).....64
1.1 Cadre d'etude.....64
1.2 Approche méthodologique .....69
II. Evaluation du risque d'exposition de la population via la consommation des poissons .....88
III. Analyse statistique.....88
Chapitre 2 : Méthodologie d'évaluation in vivo de l'effet protecteur de la « vitamine C » contre l'effet de cadmium et du mercure .....89
I. Lieu d'étude, matériel et méthode .....89
1.1 Lieu d'étude.....89
1.2 Matériel .....89
1.3 Méthodes .....93
II. Examens .....99
2.1 Examens Hématologiques .....99
2.2 Examens histopathologiques .....100
III. Traitementetanalysesstatistiques .....102
*TROISIEME PARTIE: RESULTATSETDISCUSSION*.....103
Chapitre 1 : Pollution par les éléments traces métalliques (plomb, cadmium et mercure) à Ganvié et évaluation de risque d'exposition de la population.....104
I. Evaluation du degré de pollution de l'écosystème de Ganviè par le plomb et le cadmium (Publication 1).....104
1.1 L'eau .....104
1.2 Les sédiments .....105
1.3 Les poissons.....105
1.4 Analyse de variance .....106
II. Risque d'exposition de la population au Pb et au Cd via la consommation des poissons (Publication 2) .....110
2.1 Identification des risques.....110
2.2 Valeurs toxicologiques de référence .....111
2.3 Estimation de l'exposition et niveaux de contamination des poissons. .....111
2.4 Caractérisation du risque : calcul de la DJE.....113
2.5 Calcul des quotients de danger .....115
III.Evaluation du degré de contamination de la cité lacustre de Ganvié par le mercure .....118
3.1 L'eau .....118
3.2 Les sédiments .....118
3.3 Les poissons.....119
3.4 Analyse de variance .....119
Chapitre 2 : Résultats de la toxicité des métaux (cadmium et mercure) sur les rats et évaluation de l'effet protecteur de l'acide ascorbique « vitamine C » .....123
I. Signes clinques de toxicité .....123
II. Variation des paramètres hématologiques et effet protecteur de la vitamine C .....124
2.1 Toxicité (Publication 3).....124

2.2 Evaluation de l'effet protecteur de la vitamine C sur la variation des paramètres hématologiques des rats intoxiqués au cadmium, au mercure et à leur combinaison (Publication 4) .....129
III. Observation histopathologique et effet protecteur de la vitamine C .....134
3.1 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués au cadmium. .....134
3.2 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués au mercure. (Publication 5).....144
3.3 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués avec une combinaison du mercure et du cadmium ……..… 153
*CONCLUSION GENERALE ET SUGGESTION* .....162
*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*.....166
*ANNEXES* .....199
Annexes I: Publications scientifiques.....200
Publication 1: Pollution of aquatic ecosystems by heavy metals at Ganvié's lacustrine city (Benin).....201
Publication 2: Assessment of exposure risk to lead and cadmium via fish consumption in the lacusrian village of Ganvié in Benin Republic .....208
Publication 3 : Haematological evaluation of Wistar rats exposed to chronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury .....218
Publication 4: Protective effects of vitamin C on Haematological parameters in intoxicated wistar rats with Cadmium, Mercury and combined cadmium and mercury .....225
Publication 5 : Protective effects of vitamin c in kidney, liver and brain: about a study in wistar rats intoxicated with mercury.....231
Annexes II : Poster .....244
Annexes III : Tableaux .....246
Annexes IV : Protocole de dosage du mercure .....252
Table des matières .....268

# Dédicace

## *Je dédie cette œuvre*

*A*

- *Mes parents **Alfred HOUNKPATIN** et **Colette HOUNKANRIN** pour qui le bonheur de leur enfant n'a jamais eu de prix ; pour le sens aigu de responsabilité dont vous faites preuve et les peines que vous vous êtes données pour mon éducation et la réussite de ma vie. Trouvez à travers ces lignes le témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.*

  *Que Dieu vous accorde une longue vie pour bénéficier des fruits de vos sacrifices !*

- ***Mon très cher époux Joël KOUASSI**.*

  *Pour tout le soutien indéfectible que tu m'as toujours apporté, particulièrement au cours de cette rédaction de thèse, reçois mes sincères remerciements.*

  *Profond amour.*

- ***Mes enfants Karèn et Dylan KOUASSI***

  *Que je prive d'amour maternel à certains moments. Que ce travail vous serve d'exemple afin de pouvoir mieux faire.*

  *Toute ma tendresse.*

- ***A la mémoire de ma grand-mère Delphine ZOSSOUNGBO***

  *Toi qui m'as vue naître et grandir mais que le tout Puissant ne t'as pas permis de voir ce jour. Tu es restée vivace dans mon esprit car tu occupes une grande place dans mes souvenirs d'enfance. Tu m'as couverte d'une affection, d'une indescriptible générosité et d'une tendresse affichée. Que peut-on attendre de plus d'une grand-mère ?*

  *Ce travail t'est dédié.*

  *Que la terre te soit légère. Amen !*

# Remerciements

***« Rien de ce qui se fait n'est l'œuvre d'un seul.***

***Il n'est que justice de le souligner».***

Nous adressons mos sincères remerciements à toutes les personnes physiques ou morales, qui directement ou indirectement, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de cette œuvre :

❖ **Au Professeur Michel BOKO, Directeur de l'Ecole Doctorale Pluridisciplinaire de la FLASH**

Nos sincères remerciements pour avoir accepté mon inscription en Thèse dans votre établissement. C'est grâce à votre ouverture d'esprit et votre souci d'agrandir le cercle de la famille des chercheurs que vous nous avez donné cette opportunité.

*Profonde reconnaissance.*

❖ **Au Professeur Patrick A. EDORH (Directeur de thèse)**

Votre modestie, votre rigueur scientifique, votre grande pédagogie grâce à laquelle vous nous transmettez vos connaissances et vos qualités de chercheur font de vous un des Maîtres les plus appréciés de l'Ecole Doctorale de la FLASH.

*Profonde gratitude.*

❖ **Au Président du jury**

Cher président, c'est un plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

*Hommage respectueux.*

❖ **Aux membres du jury**

Pour votre apport d'expertise à ce travail.

*Sincères remerciements.*

❖ **Au Ministre François Adébayo ABIOLA et au personnel du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

Pour l'Initiative Appui aux Dotorants du MESRS dans les Universités Nationales du Bénin.

*Sincères remerciements.*

❖ **Au Professeur Sahidou SALIFOU**

Votre disponibilité, vos conseils nous ont permis de venir à bout de ces travaux.

*Sincères remerciements.*

❖ **Au Professeur Kissao GNANDI**

Vous avez mis à notre disposition votre laboratoire pour le dosage des métaux lourds (plomb et cadmium) recherchés dans cette étude.

*Sincère gratitude.*

❖ **A Monsieur Elias POGNON**

Vous avez mis à notre disposition votre laboratoire pour le dosage du mercure.

*Votre contribution a été déterminante. Merci.*

❖ **Au Dr Adebayo Liasu OGUNKANMI et au Dr Chibuisi Gédéon ALIMBA**

Vous nous avez permis de réaliser les expérimentations dans votre animalerie (animal house, department of Cell biology and Genetics, University of Lagos) et de faire nos manipulations dans votre laboratoire (Cell Biology and Genetic laboratory, University of Lagos, Nigeria).

*Sincères remerciements.*

❖ **Au Dr Maximien SENOU**

Vous nous avez apporté un coup de main pour la lecture des lames Histopathologiques.

*Sincères remerciements.*

❖ **Aux collaborateurs** de Cell Biology and Genetic laboratory, University of Lagos, Nigeria: **Limit, Jessica, keneth, casim, chanu, Adelabu** pour l'aide portée au laboratoire.

*Sincère gratitude.*

❖ **Aux enseignants du CIFRED et de l'Ecole Doctorale de la FLASH**

Grande reconnaissance pour le savoir que vous nous avez transmis.

*Merci infiniment.*

❖ **Aux enseignants de la maternelle à l'Université**

Vous avez été de véritables artisans de notre personne. Que ce travail soit votre récompense.

*Merci pour tout.*

❖ **Au Dr Patient GUEDENON**

Grande reconnaissance pour l'effort consenti dans la réalisation de cette œuvre et pour ton soutien de taille lors des travaux de laboratoire au Nigeria.

*Merci infiniment.*

❖ **Aux Doctorants du Laboratoire de Toxicologie et de Santé de l'Environnement du CIFRED/UAC, Luc KOUMOLOU, Victorien DOUGNON, Alain AISSI, Sabine MONTCHO, Alda YEMANDJE, Marlène MICHOZOUNNOU**

Pour leurs divers apports scientifiques.

*Merci infiniment.*

❖ **A mon frère Boris C. HOUNKPATIN**

Pour ton soutien fraternel.

*Que Dieu te garde afin que tu puisses jouir du fruit de ce travail.*

❖ **A Bonaventure ADJADOHOUN**

Pour votre soutien.

*Toute ma gratitude.*

❖ **Aux familles HOUNKPATIN, HOUNKANRIN, KOUASSI, ZANMA**

Ce travail est le vôtre avant tout.

*Profonde gratitude.*

❖ **A Gratien BONI**, **Dr Jacques DOUGNON, Dr Christian JONHSON, Pr Euloge OGOUWALE, Théodore ADJAKPA**, **Eugénie KEKE** et **Rufine SEDJAME**

Pour leurs conseils et leur soutien.

*Sincères remerciements.*

❖ **A mes amis Adélèyè BALOGOUN, Dr Jean Robert KLOTOE, Bertrand FOE**, **Prisca JIMAJA, Rosaire ATTOLOU, Judicaël MISSIHOUN SOSSA**

Pour leur soutien et leurs conseils.

*Sincères remerciements.*

❖ **A tous ceux qui n'ont pas été nommés**

*Vous n'êtes pas des moindres.*

# Liste des sigles et abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

**AGLPI** : Acides Gras Longs Poly-Insaturés

**AJM** : Alimentation Journalière Moyenne

**EPA** : Environmental Protection Agency

**APX** : Ascorbate peroxydase

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**As** : Arsenic

**ASECNA** : Agence pour la Sécurité de la Navigation aérienne en Afrique

**CAT** : Catalase

**CCMH** : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

**CEDA** : Centre pour l'Environnement et le Développement en Afrique

**CEF** : Cellule Etoilée du Foie

**Cd** : Cadmium

**$CdCl_2$** : Chlorure de Cadmium

**CIFRED** : Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable

**CIRC** : Centre International de Recherche sur le Cancer

**Cm** : Centimètre

**$Cm^3$** : Centimètre cube

**-COOH** : Groupement Carboyle

**Cr** : Chrome

**Cu** : Cuivre

**DEA** : Diplôme d'études approfondies

**DESS** : Diplôme d'études supérieures spécialisées

**DHA** : Déhydroascorbate

**DHAR** : Déhydroascorbate réductase

**DHT** : Dose Hebdomadaire Tolérable

**DHTP** : Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire

**DIT** : Diplôme d Ingénieur des Travaux

**DJA** : Dose Journalière Admissible

**DJE** : Dose Journalière d'Exposition

**E** : Est

**E** : Cellule endothéliale

**EDP** : Ecole Doctorale Pluridisciplinaire

**EDTA** : Ethylene Diamine Tetra-acétic Acid

**EPAC** : Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi

**ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène

**ETM** : Eléments Traces Métalliques

**FAO** : Food and Agriculture Organization

**FAO** : Forme Active de l'Oxygène

**FAST** : Faculté des Sciences et Techniques

**Fe** : Fer

**FLASH** : Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines

**FSS** : Faculté des Sciences de la Santé

**G** : Gramme

**GB** : Globule Blanc

**GESAMP** : Groupe mixte d'Experts chargé d'étudier les Aspects Scientifiques de la Protection de l'environnement marin

**GLM** : General Liner Model

**GPS** : Global Position System

**$GP_X$** : Glutathion Peroxydase

**GR** : Globule Rouge

**GSH** : Glutathion (forme réduite)

**GSSG** : Glutathion **(**forme oxydée)

**GTVD** : Gestion, Traitement et Valorisation des Déchets

**H** : Heure

**Hb** : Concentration d'Hémoglobine

**HE** : Hématolum- Eosine

**Hg** : Mercure

**$HgCl_2$** : Chlorure anhydre de mercure

**HgT** : Mercure Total

**HNE** : Hydroxynonenal

**HSP** : Heat Shock Proteins

**Ht** : Hématocrite

**$H_2O_2$** : Peroxyde d'hydrogène

**INERIS** : Institut national de l'environnement industriel et des risques

**INSAE** : Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique

**IPCS** : International Programme on Chemical Safety

**J** : Jour

**K** : Cellule de Kupffer

**Kg** : Kilogramme

**Km** : Kilomètre

**L** : Litre
**L** : Lymphocyte

**LDL** : Low-Density Lipoprotein

**LPO** : Lipide Peroxydation

**M** : Mètre

**MeHg** : Méthymercure

**MEHU** : Ministère de l'Environnement de l'Habitat et de l'Urbanisme

**MDHA** : Monodéhydroascorbate

**MDHAR** : Monodéhydroascorbate réductase

**mG** : Milligramme

**Min** : Minute

**mL** : Millilitre

**mM** : Millimètre

**Mn** : Manganèse

**Mo** : Molybdène

**NADH** : Nicotinamide Adénine dinucléotide

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

**$NH_2$** : Amine

**Ni** : Nickel

**NO** : Monooxyde d'Azote

**O** : Oxygène

**OH** : Radical hydroxyl

**$OH^-$** : Ion hydroxyde

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**OSPAR** : Oslo Paris convention (for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic)

**P** : Plaquette

**Pb** : Plomb

**PbCl / $PbCl_2$** : Chlorure de Plomb

**$PbCO_3$** : Carbonate de Plomb

**pH** : Potentiel Hydrogène

**PNUE** : Programme des Nations Unies pour l'Environnement

**Ppm** : Partie par million

**QD** : Quotient de Danger

**RAMSAR** : Convention sur les Zones Humides d'Importance Internationale

**ROS** : Reactive oxygen species

**SAA** : Spectrophotométrie d'Absorption Atomique

**SAM** : Spectrophotométrie d'Absorption Moléculaire

**SAS** : Statistical Analysis System

**Se** : Selenium

**-SH** : Groupes thiols

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SPSS** : Statistical Package for the Social Sciences

**TBARS** : Thiobarbituric acid reactive substances

**TCMH** : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

**UAC** : Université d'Abomey-Calavi

**UCP** : Uncoupling Protein

**UE** : Union Européenne

**USEPA** : United States Environment Protection Agency

**µg** : Microgramme

**Ml** : Microlitre
**VGM** : Volume Globulaire Moyen

**WHO** : World Health Organization

**Zn** : Zinc

**°C** : Degré Celsius

**%** : Pourcentage

# Liste des tableaux

Tableau I: Classification des métaux traces....16

Tableau II: Caractéristiques chimiques du Plomb, (d'après Miquel, 2001) ....22

Tableau III: Caractéristiques chimiques du cadmium, (d'après Miquel, 2001)....23

Tableau IV: Caractéristiques chimiques du Mercure ....27

Tableau V: Normes des métaux toxiques ....33

Tableau VI : Teneurs en vitamine C de certains fruits et légumes en mg/kg de matière ....57

Tableau VII : Coordonnées géographiques des sites de prélèvements et paramètres physico-chimiques de l'eau et des sédiments ....72

Tableau VIII : Noms, famille et régime alimentaire des différentes espèces de poissons et de crustacées étudiés....75

Tableau IX : Concentrations des étalons ....82

Tableau X: Répartition des lots....94

Tableau XI : Variance de la teneur en plomb dans les différentes composantes....106

Tableau XII: Variance de la teneur en cadmium dans les différentes composantes ....107

Tableau XIII : Résultats de l'enquête sur la quantité de consommation des poissons....111

Tableau XIV : Teneur du plomb dans les poissons....112

Tableau XV : Teneur du cadmium dans les poissons....112

Tableau XVI : Apports journaliers moyens et doses journalières d'exposition alimentaire au plomb et au cadmium....114

Tableau XVII : Récapitulatif des résultats de l'évaluation de l'exposition au Pb et au Cd ...115

Tableau XVIII : Variance de la teneur en mercure dans les différentes composantes....120

Tableau XIX : Valeurs moyennes et écart-type des paramètres hématologiques du ....125

Tableau XX : Moyennes et écart-type des paramètres hématologiques des rats exposés au Cd, Hg et traités avec la vitamine C....130

Tableau XXI: Comparaison des résultats d'histopathologie entre les lots de rats intoxiqués au cadmium et ceux intoxiqués au cadmium puis traités avec la vitamine C ....141

Tableau XXII : Comparaison des résultats d'histopathologie entre les lots de rats intoxiqués au mercure et ceux intoxiqués au mercure puis traités avec la vitamine C....150

Tableau XXIII: Comparaison des résultats d'histopathologie entre les lots de rats intoxiqués à la combinaison de cadmium et de mercure et ceux intoxiqués et traités avec la vitamine C ....159

# Liste des figures

Figure 1: Cycle simplifié des éléments traces métalliques depuis les émissions jusqu'à l'exposition humaine .....17

Figure 2: Les substances toxiques dans le milieu aquatique.....19

Figure 3: Sources d'exposition mercurielle pour l'homme .....29

Figure 4: Représentation schématique simplifiée du cycle biogéochimique du mercure .....30

Figure 5: Lobule hépatique classique centré par la veine centrolobulaire et borné par les espaces portes.....36

Figure 6: Différentes cellules hépatiques .....37

Figure 7 : Parenchyme hépatique et capillaires sinusoïdes.....37

Figure 8: Coupe longitudinale d'un rein.....41

Figure 9 : Structure d'un néphron .....42

Figure 10: Corpuscule de Malpighi.....43

Figure 11: Coupe longitidunale de l'encéphale (hémisphère droit).....45

Figure 12 : Principales structures cérébrales humaines.....46

Figure 13: Schéma des différentes formes de ROS.....47

Figure 14: Schéma du stress oxydant .....48

Figure 15: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants .....49

Figure 16: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule .....51

Figure 17: Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques .....52

Figure 18: Cycle γ-glutamyl .....53

Figure 19: Structure chimique de l'Acide Ascorbique, du L-Ascorbate, du monodéshydro-L-Ascorbate, du déhydro-L-Ascorbate et du déhydro-L-ascorbate hydraté .....58

Figure 20: Cellule végétale avec ces différents compartiments et organites.....59

Figure 21: Détoxication des formes actives de l'oxygène par le cycle ascorbate/glutathion ...60

Figure 22: Situation géographique de la cité lacustre de Ganvié dans la Commune de .....66

Figure 24: Schéma du mode opératoire de l'analyse des métaux lourds à l'AAS.....83

Figure 25: Teneur moyenne (mg/L) en Pb et en Cd dans les échantillons d'eau .....104

Figure 26: Teneur moyenne (mg/L) en Pb et en Cd dans les Sédiments.....105

Figure 27: Comparaison des teneurs(mg/kg) en métaux lourds dans les différentes.....105

Figure 28 : Variation de la teneur en Pb dans l'eau, les sédiments et les poissons.....107

Figure 29 : Variation de la teneur en Cd dans l'eau, les sédiments et les poissons .....108

Figure 30: Teneur moyenne (µg/L) en Hg dans les échantillons d'eau.....118

Figure 31: Teneur moyenne (mg/kg) en Hg dans les Sédiments .....118

Figure 32 : Comparaison des teneurs(mg/kg) en Hg dans les différentes espèces de.....119

Figure 33: Variation de la teneur en Hg dans l'eau, les sédiments et les poissons.....120

# Liste des photos

Photo 1: Marché flottant de Ganvié .....68
Photo 2: Global Position System (GPS) .....70
Photo 3: Multi paramètre .....71
Photo 4: Benne de Beckmann .....71
Photo 5: Prélèvement de l'eau .....73
Photo 6: Sarotherodon melanotheron, Cichlidae .....76
Photo 7: Chrysichthys auratus, Claroteidae .....76
Photo 8: Ethmalosa fimbriata ; Clupeidae .....77
Photo 9: Liza falcipinnis , Mulgilidae .....78
Photo 10: Penaeus Kerathurus, Peneidae .....79
Photo 11: Spectrophotomètre d'absorption atomique .....84
Photo 12: Réactifs de minéralisation .....85
Photo 13: Réactifs d'extraction .....86
Photo 14: Réactifs de révélation .....87
Photo 15: Spectrophotomètre d'Absorption Moléculaire DR/ 2800 .....87
Photo 16: Dispositif de mesure de mercure par la méthode à vapeur froide .....87
Photo 17: Animalerie "Botanical and Zoological Garden" .....89
Photo 18: Animalerie ayant servi de site expérimental "Botanical and Zoological .....90
Photo 19: Rat wistar .....90
Photo 20 : Vitamine C .....91
Photo 21 : Les différentes solutions préparées au cours de l'expérimentation .....93
Photo 22: Administration de la solution par gavage aux rats .....95
Photo 23: Pesée des rats .....96
Photo 24 : Tube capillaire "heparinized .....97
Photo 25: Prélèvement sanguin .....97
Photo 26 : Fixation du rat .....98
Photo 27 : Habillage du rat .....98
Photo 28: Dissection de rat .....98
Photo 29: Observation macroscopique .....98
Photo 30: Organes prélevés .....99
Photo 31: Conservation des organes .....99
Photo 32 : Analyseur automatique Sysmex KX-21N .....100

Photo 33: Abcès sur la joue .....123
Photo 34: Blessure sur la queue .....123
Photo 35 : Perte de poils sur le dos .....123
Photo 36: Perte de poils sur le bras .....123
Photo 37: Aspect morphologique du rein normal du rat témoin (G).....135
Photo 38: Congestion vasculaire (Flèche) .....135
Photo 39 : Quelques tubules dilatés (astérix) au sommet des papilles .....135
Photo 40: Matériel intralumial éosinophile .....136
Photo 41: Agrégat de cellules (flèche) inflammatoires (zone entourée) et infiltrat de lymphocytes dans l'interstitium rénal .....136
Photo 42 : Aspect morphologique du foie normal de rat Wistar (lot G) .....137
Photo 43: Congestion vasculaire (flèche) .....137
Photo 44: Nécrose hépatocellulaire fantômes (flèches) cellules.....137
Photo 45: Vacuoles (têtes de flèche) Cellules de Kupffer chargées de pigments noirs (flèches) .....138
Photo 46 :Légère modification vacuolaire des hépatocytes périportaux (flèches) .....138
Photo 47: Hépatocytes nécrotiques isolés ; les cellules de Kupffer chargées de pigments noirs (têtes de flèche) .....138
Photo 48 : Légère dissociation des travées hépatiques et individualisation des hépatocytes.138
Photo 49: Aspect morphologique du cerveau normal du rat wistar (lot G).....139
Photo 50: Nécrose neuronale aiguë (flèche), gliose focale (tête de flèche).....139
Photo 51: Neuropile spongieux, gliose multifocale (zone entourée) .....140
Photo 52 : Congestion vasculaire (flèche) .....140
Photo 53 : Aspect morphologique du cerveau normal de rat wistar (lot Ac) .....140
Photo 54: Absence de lésion visible.....141
Photo 55: Spongiose, vacuoles (flèche) dans le neuropile et dans le cytoplasme des neurones .....141
Photo 56: Morphologie du rein normal du rat wistar (lot G).....144
Photo 57: Tubules amincis (flèche).....145
Photo 58: Tube à épithélium pavimenteux (flèche) .....145
Photo 59: Infiltrations inflammatoires.....145
Photo 60 : Epithélium cylindrique dans la dans médullaire rénale (astérix) .....145
Photo 61: Morphologie du foie normal de rat Wistar (lot G) .....146
Photo 62: Hépatocytes nécrotiques: cellules (flèche) et noyaux pycnotiques .....147
Photo 63 : Hyperplasie des Cellules fantômes de Kupffer (flèches) (têtes de flèche) .....147

Photo 64 : Légère modification vacuolaire (flèches) des hépatocytes périportaux. Cellules de Kupffer avec des pigments noirs (têtes de flèche) .....147

Photo 65: Légère congestion des veines hépatiques (astérix).....147

Photo 66: Morphologie du cerveau normal du rat wistar (lot G).....148

Photo 67: Nécrose neuronale aiguë focale avec pycnose (flèche), cellules fantômes (tête de flèche) .....148

Photo 68 : Foyer de gliose (zone entourée) .....148

Photo 69: Centre de gliose astrocytaire (zone entourée) .....149

Photo 70: Absence de lésion visible.....149

Photo 71: Nécrose neuronale (flèche), gliose et congestion vasculaire .....149

Photo 72: Absence de lésion visible.....150

Photo 73: Nécrose de coagulation (flèches) et matière éosinophile intralumiale (tête de flèche) .....153

Photo 74 : Prolifération de l'épithélium au niveau de la papille .....153

Photo 75: Léger gonflement dans la médullaire rénale (flèches) et présence de quelques cellules nécrotiques (têtes de flèche).....154

Photo 76: Légère congestion vasculaire (flèche) ; large séparation entre les tubes rénau .....154

Photo 77: Foyers d'anciens tubes avec membrane basal intacte, sans cellules épithéliales..155

Photo 78: Cylindres tubulaires (flèches). Les vaisseaux sanguins rénaux sont légèrement congestionnés (tête de flèche).....155

Photo 79: Hyperplasie étendue des cellules de Kupffer (flèches).....155

Photo 80:Vaisseauxsanguins congestionnés avec plasma riche en protéines (flèche).....155

Photo 81 : Parenchyme hépatique désorganisé, travées hépatiques amincis (flèche).....156

Photo 82 : Changement vacuolaire vacuolaire des hépatocytes Congestion modérée des veines hépatiques (flèche).....156

Photo 83: Léger changement généralisé des hépatocytes, et une (flèche).....156

Photo 84 : Nécrose unicellulaire des hépatocytes (flèches) et une légère congestion des sinusoïdes hépatiques (tête de flèche) .....157

Photo 85 : Multiple foyers de malacie modérée et gliose.....157

Photo 86: Satellitose périneuronale (Flèche) .....158

Photo 87 : Gliose multifocalet .....158

Photo 88: Légère congestion des vaisseaux sanguins (flèche) .....158

Photo 89: Absence de lésion visible.....159

Photo 90: Gliose focale (partie encerclée) lesvaisseaux sanguins légèrement congestionnés (flèches) .....159

# Liste des annexes

Annexes I: Publications scientifiques.....200

Annexes II: Poster .....244

Annexes III: Tableaux .....246

Annexes IV: Protocole de dosage du mercure .....252

# Résumé

La pollution des écosystèmes aquatiques est marquée par la présence de contaminants dans le milieu et les poissons toujours consommés par les populations. Au cours de cette étude, il a été recherché dans un premier temps le degré de contamination de la cité lacustre de Ganvié, par ETM (Pb, Cd et Hg). Les échantillons d'eau, de sédiments, de produits halieutiques ont été prélevés à cet effet et analyser par SAA (Pb et Cd) et par SAM (Hg). Les résultats des analyses ont révélé des teneurs en Pb, en Cd dépassant pour la plupart les limites admises. Ces valeurs en mg/kg (poissons, sédiments) et en mg/L (eau) sont en moyenne : Pb (0,56±0,23) et Cd (0,03±0,02) (eau) ; Pb (54,04±35,37) et Cd (0,74±0,59) (sédiments) ; Pb (26,85±12,30) et Cd (2,01±1,18) (poissons). Quant au mercure, il a été noté une pollution des sédiments (0,143±0,002 mg/kg) et une contamination de l'eau (0,176±0,05 µg/L) et des poissons (0,026±0,002 mg/kg). Ces différents résultats montrent la pollution de l'écosystème aquatique de Ganvié et par ricochet la contamination des poissons.

Très indispensables à la croissance de l'homme pour leur apport protéique, les poissons ayant fait l'objet de l'étude, sont impropres à la consommation. En effet l'évaluation des risques d'exposition au Pb, au Cd à travers leur consommation a donné des QD > 1 aussi bien chez les adultes que chez les enfants. Les valeurs de la DJE obtenues par calcul pour les enfants, sans l'exposition générale sont de 111,22 et de 7,42 µg/kg/jour respectivement pour le Pb et le Cd contre 34,22 et 2,28 µg/kg/jour chez les adultes comparées aux limites autorisées par l'OMS qui sont respectivement de 3,6 µg/kg/J et de 1µg/kg/J. Le mercure quant à lui s'est révélé comme le métal présentant moins de risque sanitaire. Mais signalons que sa forme méthylée est très toxique à très faible dose. Cette situation confirme donc le risque d'accumulation des métaux dans l'organisme du consommateur. Ils sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme par l'alimentation et de générer ainsi un stress oxydant qui altère les fonctions vitales de celui-ci. L'apport d'antioxydants à l'organisme semble être donc un moyen de limiter les effets toxiques du stress oxydant. Ainsi dans un second temps, l'effet protecteur de la consommation de la vitamine C, puissant antioxydant, sur les effets toxiques du Cd et du Hg a été exploré. 65 rats wistar sont regroupés en 13 groupes de 5 animaux. Les 6 groupes du 1$^{er}$ lot ont reçu des doses journalières de métaux (Cd ; Hg ; Cd+Hg). Les 6 groupes du 2$^{ème}$ lot ont reçu en plus de leur dose journalière de métaux, une dose journalière de 150mg/kg de vitamine C. Le témoin a reçu de l'eau. Les effets observés lui sont comparés. Les biomarqueurs de toxicité prise en compte sont : observations cliniques, variation des paramètres hématologiques, observations histopathologiques (foie, rein, cerveau). Les résultats obtenus ont prouvé une perturbation des paramètres hématologiques et une altération des organes due au Cd et au Hg qui ont été corrigées par la vitamine C utilisée comme supplément alimentaire.

**Mots clés** : plomb, cadmium, mercure, risque d'exposition, vitamine C.

# Abstract

Pollution of aquatic ecosystems is marked by the presence of contaminants in the environment and the fish always consumed by populations despite the attention of researchers on the phenomenon. In this study, it was investigated as a first step the degree of contamination of the lakeside town of Ganvie by heavy metals (Pb, Cd and Hg). Samples of water, sediment, fish products were collected and analyzed for this purpose by AAS (Pb and Cd) and SAM (Hg). The results of the analyzes showed higher concentrations of Pb, Cd than most of the permitted limits. These values in mg / kg (fish, sediments) and mg / L (water) were: Pb (0.56±0.23) and Cd (0.03±0.02) (water) Pb (54.04±35.37) and Cd (0.74±0.59) (sediments) Pb (26.85±12.30) and Cd (2.01±1.18) (fish). As for the mercury, it was noted pollution of sediments (0.143±0.002 mg/kg) and water contamination (0.176±0.05 mg/L) and fish (0.026±0.002 mg/kg). These results showed the pollution level of the aquatic ecosystem and Ganvie.

Very essential for the growth of man for their protein intake, fish having made the object of study, are unfit for consumption. In fact, the risk assessment of exposure to Pb, Cd through their consumption gave one DQ > both adults than in children. ECD values obtained by calculation for children without general exposure are 111.22 and 7.42 mg/kg/day, respectively, for Pb and Cd against 34.22 and 2.28 mg /kg/day in adults compared to the limits allowed by the WHO are respectively 3.6 mcg/kg/day and 1µg/kg/J. Mercury meanwhile has emerged as the metal with less health risk. But note that its methylated form is highly toxic at very low doses. This confirms the risk of metal accumulation in the body of the consumer. They are likely to accumulate in the body through diet and thus generate oxidative stress that affects the vital functions of the latter. The addition of antioxidants to the body seems to be therefore a way to limit the toxic effects of oxidative stress. And in a second step, the protective effect of the consumption of vitamin C, a powerful antioxidant, on the toxic effects of Cd and Hg was explored. 65 Wistar rats were divided into 13 groups of 5 animals. The first batch of six groups received daily doses of metals (Cd, Hg, Cd + Hg). The second batch of six groups received in addition to their daily dose of metals, a daily dose of 150 mg/kg of vitamin C. The witness received water. The observed effects are compared him. Biomarkers of toxicity are taken into account: clinical, haematological parameters variation, histopathology (liver, kidney, brain). The results showed a disturbance of haematological parameters and impaired organ due to Cd and Hg have been corrected by vitamin C used as a dietary supplement.

**Keywords:** lead, cadmium, mercury, risk exposure, vitamin C.

# *INTRODUCTION GENERALE*

L'histoire des métaux lourds n'a pas été écrite. Et pourtant, ils paraissent étroitement liés à la civilisation. L'or, l'argent, le cuivre ont permis de fabriquer les premières pièces de monnaie. Sans métaux lourds, il n'y aurait pas eu de distribution d'eau potable par les canalisations en plomb, ni peintures, car les peintures anciennes ont résisté au temps grâce aux métaux incorporés aux pigments (le « jaune de Naples », à base de plomb, le « vermillon de mercure »...), ni vitraux, ni miroirs, étamés d'un amalgame d'étain et de mercure... L'homme a utilisé les métaux lourds et continue de s'en servir mais parfois en excès et souvent avec inconscience ou pire, en toute conscience. Si les métaux lourds ont marqué la civilisation, ils peuvent aussi la détruire car ils sont aussi des toxiques très puissants.

L'environnement est contaminé par de nombreux produits chimiques dont les métaux lourds, rejetés par les industries, l'agriculture et les communautés urbaines (Miquel, 2001; O.M.S. IPCS., 1998 ; PNUE., 2002). Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles. On dit que les métaux sont présents " en traces.

Ces éléments naturels se retrouvent dans l'air, l'eau, les sols, les sédiments. Les écosystèmes aquatiques et terrestres, sous forte influence humaine, sont très touchés par cette contamination. Présents sous une forme particulaire dans les sols, ils apparaissent sous l'effet de l'érosion. Le ruissellement sur les surfaces imperméables (sols, chaussée) ainsi que les sources anthropiques s'ajoutent à ces sources naturelles liées à l'érosion. L'eau est évidemment un élément particulièrement important pour les polluants en général et les métaux lourds en particulier. Elle entraîne des réactions chimiques liées à l'acidité, l'alcalinité, la température, l'oxygénation... Les milieux aquatiques sont très sensibles aux éléments en traces par la coexistence de deux phénomènes de bioaccumulation et de biomagnification dans la chaîne alimentaire.

Le lac Nokoué, le plus grand plan d'eau continental du Bénin (150 km² à l'étiage), géographiquement partagé entre les Communes de Cotonou, Abomey- Calavi, Sô-Ava et Sèmè-Kpodji où les activités anthropiques urbaines et industrielles sont très importantes n'est pas épargné de ce phénomène.

Ce lac, appartenant au système lagunaire Est du Bénin présente deux particularités à savoir :

- une production en poissons très élevée (rendement de plus d'une tonne de poissons à l'hectare) comparée aux valeurs connues dans la sous région (Yèhouénou, 2005);
- une forte population lacustre organisée en plusieurs villages avec des habitations construites sur pilotis directement implantés dans l'eau.

Ganvié, l'un des villages les plus importants de ce système d'habitation lacustre et l'objet de la présente étude, comporte en effet 20568 habitants (INSAE, 2004). Notons également que les activités anthropiques y sont très nombreuses. Cette population a toujours estimé que les eaux du lac, leur environnement immédiat constituent un réceptacle idéal pour les déchets produits au cours de leurs différentes activités naturelles, domestiques ou professionnelles (Folal et Gonou, 2001).

En effet, le rejet des ordures ménagères et résidus solides de tout genre, le trafic des produits pétroliers par pirogue, les déversements de produits pétroliers dans le lac, la pollution par utilisation excessive des barques motorisées, les rejets des collecteurs d'évacuation d'eau pluviale en provenance de la ville de Cotonou, les apports du fleuve Ouémé, sont source de potentielle contamination de cet écosystème par les métaux lourds (Dovonou, 2009). D'ailleurs, la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds est une réalité et une problématique majeure pour le développement durable.

N'ayant par ailleurs aucune utilité dans le métabolisme, le plomb, le cadmium et le mercure persistent dans l'environnement et sont les métaux les plus toxiques pour l'homme (Picot, 2003). Ils entraînent notamment des lésions neurologiques plus ou moins graves (Testud, 2005). Ils ont une forte capacité à s'accumuler dans la chaîne alimentaire notamment par les produits halieutiques. Tout ceci exposant l'homme, dernier maillon des chaînes alimentaires à une intoxication. Cette situation présente un réel danger pour l'homme du fait des phénomènes de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire (CEDA, 1997).

Toutefois, les produits halieutiques ont leur apport nutritionnel dans le bien-être des êtres vivants. L'importance des poissons pour assurer la sécurité alimentaire des populations dans le besoin a été annoncée dans la déclaration de Bangkok (Subasinghe *et al.,* 2000). Du point de vue de la nutrition humaine, les poissons constituent une source de protéines à valeur biologique élevée (Lalèyè, 1995), couvrant actuellement près de 20% de l'apport protéique.

Ils sont une source importante de protéines car ils contiennent la protéine d'une valeur biologique élevée, des minerais essentiels, des vitamines, des graisses, un iode, un fluor et des

quantités spéciales de cobalt, magnésium, phosphoreux, fer et cuivre (Gram et Huss, 2000 et Krizek *et al.,* 2004). Ils sont aussi riches en acides gras longs poly-insaturés (AGLPI). L'effet bénéfique d'un apport régulier en AGLPI de la série ω3 sur la santé humaine commence à être bien démontré (Bucher *et al.,* 2002). Les AGLPI sont impliqués dans diverses actions connues : amélioration de la fluidité membranaire, diminution de l'agrégation plaquettaire et, par conséquent, diminution des maladies cardiovasculaires, augmentation de la résistance immunitaire et à la cancérogenèse (Simopoulos, 2002). Ces acides gras sont importants aussi pour la vision et le développement cérébral, on considère même qu'ils ont joué un rôle dès l'origine de l'humanité (Broadhurst *et al.,* 1998; Crawford *et al.,* 1999).

Face à la problématique des métaux lourds et l'importance des produits halieutiques, Faut- il interdir la consommation de ces produits halieutiques à la population ?

Connaissant les effets du plomb, du cadmium et du mercure sur la santé, cette situation ne peut perdurer. Cependant, le contexte économique et les défis de la sécurité alimentaire au Bénin ne permettent pas d'interdire la consommation de produits halieutiques issus de cet écosystème aquatique. Puisqu'il serait utopique de proposer la décontamination des sources de contamination des poissons, c'est-à-dire, la colonne d'eau et des sédiments du lac dans la cité de Ganvié, il convient donc de proposer des solutions préventives aux risques d'intoxication au plomb, au cadmium et au mercure.

En effet, la plupart des métaux lourds, sont susceptibles de s'accumuler dans l'organisme par l'alimentation et de générer ainsi un stress oxydant qui altère ses fonctions vitales. L'apport d'antioxydants dans la nourriture semble être un moyen de limiter les effets toxiques du stress oxydant. L'acide ascorbique, en particulier, est connu comme un antioxydant qui empêche la formation par les métaux lourds, (plomb, cadmium et mercure), de radicaux libres susceptibles d'altérer les tissus. La vitamine C stimulerait aussi dans l'organisme l'augmentation du taux de glutathion, un autre puissant antioxydant. La vitamine C accessible à la population, se retrouve dans beaucoup de fruits et sous forme de complément alimentaire à moindre coût dans les pharmacies. L'étude s'est intéressée à caractériser la pollution de la cité lacustre de Ganvié par les ETM afin d'évaluer le risque d'exposition de la population, ensuite in vivo l'effet protecteur de la « vitamine C » contre les effets du cadmium et du mercure.

Cette thèse est composée de trois parties :

Après un cadre théorique qui met en exergue une problématique, une justification du sujet, une présentation des objectifs et des hypothèses, le document a été subdivisé en 3 parties.

La première partie nommée revue de littérature, a été consacrée à une étude bibliographique sur la généralité des ETM, les particularités anatomiques et histophysiologiques du foie, des reins et du cerveau chez l'homme et chez les animaux, le stress oxydant et l'acide ascorbique.

La deuxième s'est appesantie sur le matériel utilisé et les méthodologies.

La troisième partie présente les résultats obtenus et la discussion.

# *CADRE THEORIQUE*

Il met en exergue la problématique, la justifiction, les objectifs assortis des hypothèses.

# Problématique

Le développement de nos sociétés industrielles est très lié à la découverte et à l'utilisation de métaux. Ainsi, la consommation de métaux a augmenté de 300 % dans les cinquante dernières années et les relargages anthropogéniques d'éléments métalliques tels que Pb, Hg, Zn, Cd, Cu et Cr ont été multipliés par trois, depuis le début de l'ère industrielle (Rollin et Quiot, 2006). Cet apport vient s'ajouter à ceux d'origine naturelle provenant de cinq sources majeures : la poussière générée par les vents, les volcans, les incendies de forêts, les végétations, les aérosols marins (Pickett, 1987). Les éléments traces métalliques (ETM) l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le sélénium (Se) et le zinc (Zn). Cette liste de neuf éléments a été proposée dans le rapport 42 de l'Académie des Sciences (1998) comme liste des éléments traces à risques pour la santé humaine. Le Hg, le Cd et le Pb sont considérés comme uniquement toxiques, et ce pour tous les organismes (microorganismes, plantes, animaux, Homme). Ils n'ont aucune activité biologique bénéfique, au contraire d'autres métaux comme le chrome (Cr) ou le nickel (Ni), le zinc (Zn), Cuivre (Cu) ou l'arsenic (As) qui, à faible dose, sont indispensables à divers organismes vivants et qui, dans d'autres conditions, deviennent toxiques. (Picot, 2003). Le plomb, le cadmium et le mercure sont largement dispersés dans l'environnement et sont, en concentration excessive toxique pour l'être humain (Jarup, 2003). L'exposition chronique à ces substances présente des risques. Ces métaux se retrouvent naturellement dans l'environnement. Cependant l'exposition à ceux-ci est aggravée par l'activité humaine (combustion des ressources minérales à haute température comme le charbon, le pétrole et le gaz dans les centrales électriques, les fonderies, les cimenteries, les usines d'engrais et les moteurs à combustion inerte…) qui propage ces métaux dans l'air, le sol et l'eau (Suzy *et al.,* 2008).

L'eau est un élément très important pour la pollution par les métaux lourds, car elle sert de vecteur, mais peut également entraîner des modifications chimiques selon la salinité ou la température (Jumarie *et al.,* 2001). Durant plusieurs décennies, les océans, les fleuves et les lacs ont hérité des rejets industriels et des eaux résiduaires industrielles, des déchets liquides résultant de l'extraction ou de la transformation des matières premières et de toutes formes d'activités de production (Miquel, 2001).

Au Bénin, la rapide croissance démographique, l'urbanisation accrue, l'industrialisation et l'exploitation incontrôlée des ressources naturelles ont entraîné

l'accroissement des cultures vivrières au voisinage des cours d'eau et des cultures maraîchères le long des plages générant ainsi une source de pollution de la mer, des fleuves et des lacs par les métaux lourds contenus dans les engrais chimiques et les pesticides utilisés. Les résultats des travaux menés par Mate (2000); Miquel (2001); Azéhoun–Pazou *et al.,* (2006a, 2006b); Agonkpahoun (2006); Kpera (2006) et Guédénon (2012 a) ont montré que l'environnement marin et les nappes phréatiques au niveau de la rivière Okpara, du fleuve Ouémé et du lac Nokoué sont pollués par ces produits chimiques. Des recherches ont prouvé que le lac Nokoué est fortement pollué par le plomb, le cadmium et le mercure (Guédénon, 2009 ; Dégila, 2011).

Ces composantes toxiques, très persistantes dans le temps, pénètrent plus ou moins rapidement et directement les chaînes alimentaires, exposant l'homme à une intoxication lente mais certaine. En outre, tout au long de la chaîne alimentaire, certains métaux toxiques (Cd, Hg, Pb) se concentrent dans les organismes vivants. Ils peuvent ainsi atteindre des taux très élevés chez certaines espèces consommées par l'homme, notamment les poissons. Les études réalisés par Montcho (2005); Kakpo (2008); Djossou (2009); Edorh *et al.* (2011), Dégila (2011) et Guédénon *et al.* (2012a) ont prouvé la contamination des poissons en plomb, en cadmium et en mercure au Bénin. L'alimentation à base de produits halieutiques (poissons gras, crustacés, moules, huîtres…) constitue dans beaucoup de pays à façade maritime importante, une source non négligeable de contamination par les métaux lourds ; Ce qui a conduit plusieurs pays à conseiller de limiter la consommation de ces aliments marins. (Picot et Proust, 1998). Plusieurs travaux de recherches réalisés au Bénin ont révélé aussi la présence à fortes doses de contaminants, en particulier les métaux lourds (Pb, Cd et Hg) dans des denrées alimentaires de première nécessité tels que les eaux de boisson (Agonkpahoun, 2006 ; Adam *et al*., 2011), les légumes (Koumolou, 2009), les fruits de mer (Edorh *et al.,* 2009) , les escargots géants (Edorh *et al.,* 2009). Malgré cela, la demande en denrées alimentaires de base au sein des populations ne cesse d'augmenter. Sous le regard inquiet des chercheurs qui ne cessent d'attirer l'attention sur le phénomène. L'alimentation est la source majeure de contamination de l'homme (dernier maillon de la chaîne alimentaire) par les métaux. Cette situation présente un réel danger pour l'homme du fait des phénomènes de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire (CEDA, 1997). Les plus dangereux sont le plomb, le cadmium, le mercure, (Beauchamp, 2003).

Une fois dans l'organisme ; ces toxiques se concentrent dans des organes cibles (rein, foie, cerveau). Leur intoxication agit le plus souvent de façon lente et insidieuse, elle éclate rarement en crises aiguës. Elle se manifeste par des symptômes de tous genres. Cependant dans le domaine de la santé, leur pouvoir destructeur est généralement sous-estimé. Au fait, les métaux lourds sont dangereux pour des raisons dont en voici quelques-unes :

- les métaux lourds (Hg et Cd) catalysent les réactions oxydatives et encouragent ainsi la production de radicaux libres ;
- ils refoulent les minéraux (par exemple le zinc et le magnésium) et les éléments à l'état de traces des sites de fixation enzymatique, ce qui provoque un blocage du métabolisme ;
- une exposition chronique aux métaux lourds peut modifier les structures des protéines et, par voie de conséquence, aussi les anticorps du système immunitaire ;
- les structures des lipides présents au sein de chaque cellule peuvent subir une altération, ce qui a pour effets de perturber le flux d'entrée et de sortie des éléments nutritifs.

De plus, ces toxiques de si petite taille sont le plus souvent trop hydrophobes et de ce fait doivent d'abord être métabolisés avant d'être éliminés par les voies biliaire et urinaire. Alors, pour augmenter l'hydrophilie de ces métaux lourds, les organismes ont développé des systèmes de détoxication diversifiés et performants. Trois phases sont habituellement nécessaires : la phase I est constituée d'enzymes qui créent un groupement fonctionnel (-OH, -COOH, $-NH_2$, -SH) sur le xénobiotique ; la phase II est caractérisée par la conjugaison d'un ligand endogène sur le composé chimique, généralement après la phase I (Hayes *et al.,* 2005); la phase III correspond à l'étape d'excrétion des xénobiotiques ou de leurs métabolites (Klaassen et Slitt, 2005). Mais lors de ce métabolisme des xénobiotiques, peuvent se former de métabolites électrophiles ou de radicaux libres qui peuvent se fixer sur des protéines, des lipides et des acides nucléiques et ainsi les modifier. Il s'en suit une apparition de lésions cellulaires ou génétiques. Par ailleurs, ce métabolisme peut aussi entraîner la formation d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Ces phénomènes sont favorables à l'installation d'un stress oxydant susceptible d'induire des lésions tissulaires. Certaines espèces réactives de l'oxygène formées sont particulièrement réactives ; c'est le cas du radical hydroxyle (OH) qui est responsable de la plupart des lésions génotoxiques produites par un stress oxydant. Il

peut causer plus de cent types de dommages : des oxydations de bases et de sucres et des fixations de protéines sur l'ADN (Cadet *et al.,* 1997). Ces métaux lourds favorisent donc le stress oxydatif cellulaire en diminuant la protection antiradicalaire des cellules, ce qui occasionne de nombreuses pathologies liés aux radicaux libres. Par ailleurs, outre le métabolisme des métaux lourds, d'autres phénomènes s'accompagnent aussi d'une biosynthèse radicalaire physiologique. Il s'agit de la respiration cellulaire dans les mitochondries, des phénomènes de destruction des germes pathogènes par les globules blancs, d'autres réactions de détoxication, synthèse des prostaglandines.

Heureusement, cette biosynthèse radicalaire est limitée par l'action d'enzymes spécifiques et de piégeurs de radicaux libres, afin d'éviter toute altération définitivement dommageable des macromolécules biologiques comme l'oxydation des lipides membranaires et du patrimoine génétique contenu dans les acides nucléiques (Hoeijmakers, 2001 ; Friedberg, 2003). Ce phénomène biologique naturel d'antioxydation est à l'origine de nombreuses recherches en vue de proposer des piégeurs ou inhibiteurs de radicaux libres tels que celui évalué dans la présente étude : la vitamine C (acide ascorbique). En effet, étant un antioxydant, l'acide ascorbique protège contre le stress oxydatif élevé qui résulte de l'intoxication aux métaux lourds (Netke *et al.,* 1997, Awodele *et al.,* 2010; Khan et Sinha,1993; Aly et Donya, 2002, Ddique *et al.,* 2005 ; Liopiz *et al.*, 2004; Kaya, 2003 ; Omonkhua et Obi*.,* 2008). C'est l'ensemble de ces intérêts qui est perçu par cette étude qui se propose **:** d'étudier le risque d'exposition de la population de Ganvié aux ETM (Pb, Cd, Hg) et évaluaer *in vivo* l'effet protecteur de la « vitamine C » contre les effets du Cd et du Hg.

# Justification

- **Pourquoi le choix de ces métaux?**

Le choix de ces trois éléments (Pb, Cd, Hg) repose tout d'abord, sur leur ubiquité en tant que contaminants chimiques (Calabrese, 1981) et leur toxicité (Sadiq, 1992 ; Leocoanet, 2000) qui justifient leur présence sur les listes des contaminants prioritaires des conventions et règlementations internationales (OSPAR, UE, USEPA). Le cadmium et le mercure ont été particulièrement ciblés du fait que les premiers biochimistes ont toujours associé ces deux métaux (en plus du Pb) en raison de leur affinité avec le souffre qui permettait d'identifier les protéines qui précipitent lourdement ou donnent facilement des sels. De plus, ils se transportent et changent de forme chimique. Ils ont une conductivité électrique élevée, ce qui

explique leur utilisation dans de nombreuses industries (Casas, 2005). Ces métaux lourds présentent deux autres caractéristiques très importantes vis-à-vis des organismes vivants :

- Tout d'abord, ces éléments chimiques sont considérés comme uniquement toxiques, et ce pour tous les organismes (microorganismes, plantes, animaux, Homme). Ils n'ont aucune activité biologique bénéfique, au contraire d'autres métaux comme le chrome (Cr) ou le nickel (Ni) qui, à faible dose, sont indispensables à divers organismes vivants et qui, dans d'autres conditions, deviennent toxiques.
- La deuxième propriété très néfaste de ces métaux lourds est leur capacité à s'accumuler dans la chaîne alimentaire.

N'ayant par ailleurs aucune utilité dans le métabolisme, ils persistent dans l'environnement (Audry, 2003) et sont les métaux les plus toxiques pour l'homme (Beauchamp, 2003 ; Leocoanet, 2000), entraînant notamment des lésions neurologiques plus ou moins graves (Testud, 2005).

Le cadmium et le mercure, sont avérés toxiques pour empêcher l'action des enzymes principales comme la phosphatase alkaline non seulement dans le sang mais aussi dans plusieurs tissus comme le foie, rein, cerveau (Rana *et al.,* 1996).

- **Pourquoi le choix de l'acide ascorbique ?**

Actuellement, plusieurs piégeurs de radicaux libres sont utilisés. Il s'agit de la vitamine B6, la vitamine C, la vitamine E, le sélénium, le zinc, la cystéine et la méthionine (deux acides aminés soufrés), le *Méthyl-Sulfonyl-Méthane*, l'acide alpha-lipoïque - aussi appelé acide thioctique, la taurine, le glutathion, les inhibiteurs enzymatiques : les superoxydes dismutases, la catalase, la glutathion peroxydase, et les composés polyphénoliques.

S'il existe alors une multitude d'antioxydants, pourquoi faudrait – il donc privilégier la vitamine C?

La vitamine C fait l'objet de cette étude car sa présence stimule la fabrication du glutathion, un autre puissant antioxydant de l'organisme, plus efficace que l'acide ascorbique mais difficilement accessible. Il ne se rencontre pas dans les aliments, il se synthétise plutôt dans l'organisme à partir de précurseurs alimentaires : la L-glutamate, la L-cystéine et la L-glycine cystéine. Mais, la disponibilité de la L-cystéine est un facteur limitant pour la production interne de glutathion. En effet, l'acide aminé cystéine libre n'est pas le meilleur

moyen de l'apporter au système cellulaire. Potentiellement toxique, il est spontanément détruit dans le système gastro-intestinal et le plasma sanguin. Apporté aussi sous forme de suppléments nutritionnels, afin de contourner le problème de la fragilité de la cystéine, le glutathion non plus n'est pas efficacement absorbé par l'homme. En effet, lorsque l'on donne en une seule fois une dose de 3 000 mg de glutathion à sept sujets en bonne santé, les niveaux de glutathion sanguin n'augmentent pas. L'absorption du glutathion est peut-être nulle chez l'homme parce que le système intestinal (à la différence de celui des rongeurs) contient des quantités importantes d'une enzyme (γ-glutamyltranspeptidase) qui décompose le glutathion. Ces raisons justifient le choix de la vitamine C. Ainsi, en administrant la vitamine C, produit bon marché et présent dans plusieurs fruits accessibles à l'individu moyen, on s'attend à éviter les inconvénients liés à l'apport direct du glutathion tout en amplifiant l'antioxydation des métaux toxiques.

De plus, nombreuses études ont montré que l'apport supplémentaire de la vitamine C corrige les effets toxiques induits par des xénobiotiques (Netke *et al.,* 1997 ; Awodele *et al.,* 2010; Khan et Sinha ,1993; Aly et Donya, 2002 ; Ddique *et al.,* 2005 ; Liopiz *et al.*, 2004; Kaya, 2003). Hill (1980) a prouvé l'effet protecteur de la vitamnie C sur la toxicité due au mercure. De mème Grosicki (2004), Omonkhua et Obi (2008) ont rapporté une diminution du cadmium contenu dans le foie et les reins, après une exposition au cadmium et un apport supplémentaire de la vitamine C pendant 28 jours.

- **Pourquoi baser l'étude sur les reins, le foie et le cerveau?**

Les deux premiers organes (le rein et le foie) ont été choisis car ils interviennent d'une manière vitale dans les métabolismes, dans les processus de détoxification et de certaines fonctions endocrines (Dougnon *et al.,* 2006).

Le cadmium a une affinité pour le foie et les reins (Cai *et al.,* 2001). Environ la moitié du cadmium de l'organisme est localisé dans le foie et les reins (Andujar *et al.,* 2010). Toutes les expériences menées sur les rats et les souris confirment que l'exposition orale au cadmium provoque des dommages rénaux, et particulièrement des lésions tubulaires induisant de la protéinurie (INERIS, 2005). Les découvertes d'histologie montrent des lésions focales de nécrose de l'épithélium des tubules proximaux et une inflammation des tubules rénaux. L'excrétion du cadmium, essentiellement urinaire, est faible et très lente. L'apparition d'une atteinte néphrologique altère les capacités d'élimination rénale du cadmium (Andujar *et al.,* 2010).

L'intoxication au mercure induit la nephrotoxicité et endommage les reins (Nath *et al.,* 1996 ; Oda-Samah et El-EAshmawy, 2012). Une exposition chronique au mercure peut entraîner des dommages au cerveau, aux reins, au foie (Spin, 1997 ; Clarkson, 2002 ; Suzy *et al.,* 2008). L'exposition chronique au mercure à travers la consommation des produits halieutiques et fruits de mer (Suzy *et al*., 2008) peut causer des effets néfastes sur les systèmes immunologiques et nerveux (Clarkson, 1997; Cheng *et al.*, 2006 ; Crinnion, 2000; Boscolo *et al*., 2009; Diez, 2009; Mahour et Saxena, 2009).

- **Pourquoi baser l'expérimentation sur les rats wistar?**

En ce qui concerne les rats wistar, ils ont été choisis pour certaines de leurs qualités : ils résistent plus que les souris de laboratoires et sont proches de la santé humaine.

# Objectifs

## Objectif général

Etudier le risque d'exposition de la population de Ganvié aux ETM (Pb, Cd, Hg) et évaluer *in vivo* l'effet protecteur de la « vitamine C » contre les effets du Cd et du Hg.

## Objectifs spécifiques

- Quantifier la teneur des métaux lourds (Pb, Cd, Hg) dans l'eau, les sédiments et les poissons et les comparer aux normes admises ;
- Evaluer le risque d'exposition de la population via la consommation des poissons contaminés par ces métaux;
- Identifier les pertubations hématologiques, les lésions hépathiques, rénales et cérébrales suite à l'intoxication par le cadmium et le mercure chez les ratsWistar ;
- Répertorier les réparations hématologiques, histologiques au niveau du foie, des reins, du cerveau des rats albinos Wistar intoxiqués au cadmium et au mercure puis traités avec la vitamine C.

# Hypothèses

- L'eau, les sédiments et les poissons de Ganvié sont pollués par le plomb, le cadmium et le mercure ;
- La consommation des poissons contaminés par ces métaux engendre un risque d'exposition de la population ;

- Le cadmium, le mercure et leur combinaison administrés sous forme de sel induit une une perturbation des paramètres hématologiques; une altération du foie, du rein et du cerveau chez des rats ;
- La vitamine C (acide ascorbique), utilisée comme supplément alimentaire atténue ces effets toxiques induits par ces métaux et leur combinaison.

# *PREMIERE PARTIE: REVUE DE LITTERATURE*

Cette première partie de la thèse est abordée en trois chapitres à savoir : Les Eléments Traces Métalliques; les particularités anatomiques et histophysiologiques des organes cibles (foie, reins et cerveau) et la notion de radicaux libres et de stress oxydant.

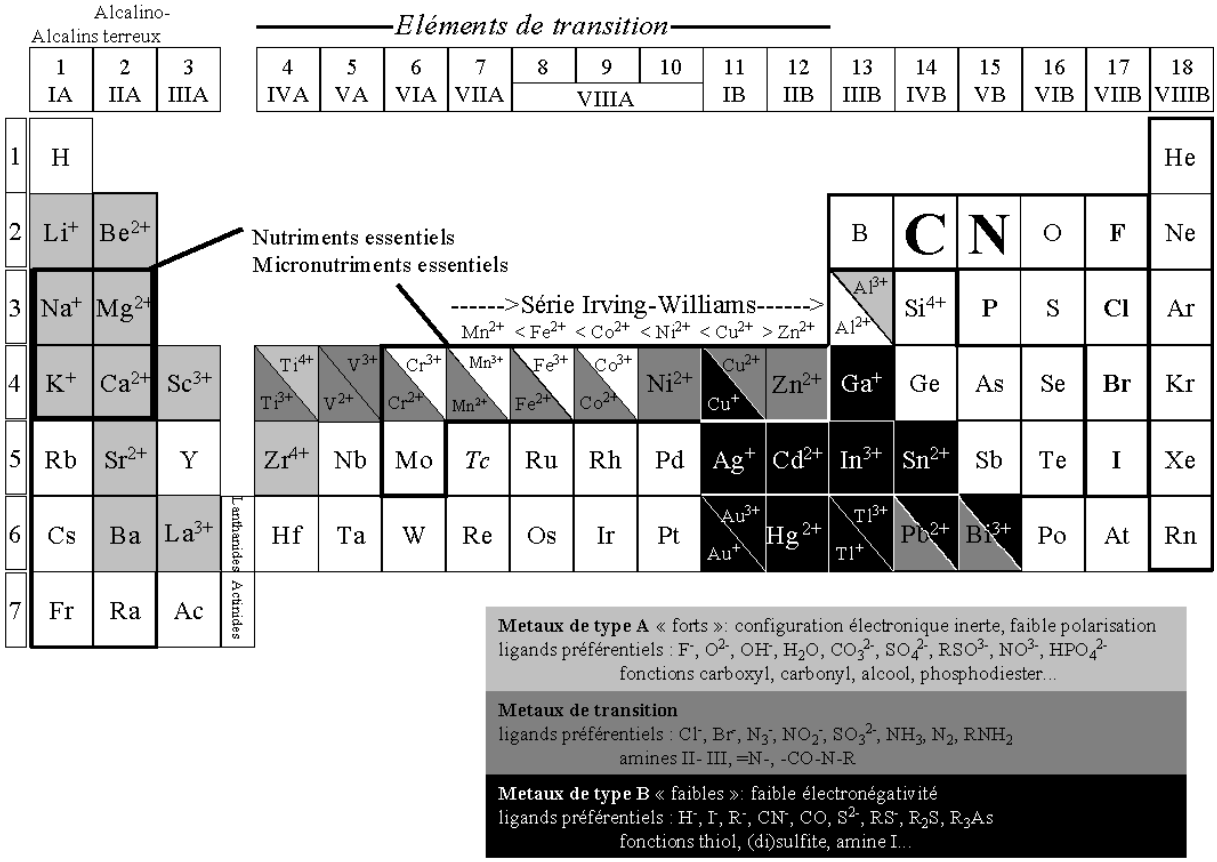
# Chapitre 1 : Eléménts Traces Métalliques (Plomb, Cadmium et Mercure)

## I. Généralité sur les ETM

### 1.1 Eléments Traces Métalliques (ETM) et Environnement

Les éléments traces métalliques, ou métaux traces, sont les éléments dont la concentration dans la croûte terrestre est inférieure à 1 g/kg. Cette définition est aujourd'hui utilisée à la place du terme « métaux lourds » (métaux qui possèdent des masses volumiques supérieures ou égales à 4.5 g.cm$^{-3}$ (Burrel, 1974)), celle-ci étant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique (Miquel, 2001). On leur associe souvent les métalloïdes comme l'arsenic ou le sélénium. La caractérisation des risques liés aux métaux traces nécessite la prise en compte de certains paramètres qui leur sont spécifiques.

**Tableau I: Classification des métaux traces**




***Source*** *: Tessier et Tuneur, 1995 ; Stumm et Morgan, 1996*

Tout d'abord, ce sont des constituants naturels de la croûte terrestre et les concentrations basales spécifiques à un site donné en constituent le fond biogéochimique. Certains éléments sont par ailleurs des micronutriments essentiels pour les organismes, mais toxiques à plus forte dose. Le cycle biogéochimique des ETM est altéré par les activités anthropiques ; l'augmentation des concentrations peut entraîner des effets possibles sur les écosystèmes et l'homme. Du fait de leur stabilité et de leur persistance dans l'environnement, ils sont propices au transport et à l'accumulation dans certains compartiments de l'environnement. Concernant les organismes, la bioaccumulation désigne la capacité des organismes aquatiques à concentrer et à accumuler les substances chimiques à partir du milieu (bioconcentration) et de la nourriture (biomagnification), à des concentrations bien supérieures à celles où elles sont présentes dans le milieu (Butcher *et al.*, 1992 ; Flores-Rodriguez, 1992 ; Ramade, 1992).

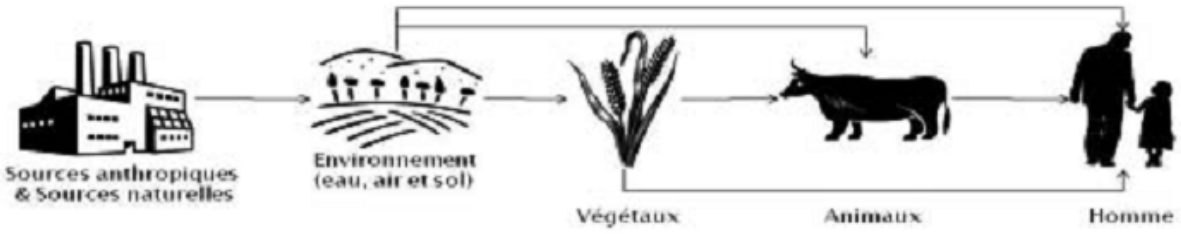



**Figure 1: Cycle simplifié des éléments traces métalliques depuis les émissions jusqu'à l'exposition humaine**

***Source*** *: Gouzy et Ducos, 2008*

Les ETM dans l'environnement ont pour origine de nombreuses activités humaines :

- sources ponctuelles (rejet massif dans un espace géographique restreint) : mines, fonderies, industries diverses…
- sources diffuses (rejet disséminé dans le milieu) : eaux de pluie, rejets des réseaux d'assainissement urbain, ruissellements des forêts et des zones agricoles, écoulements d'irrigation, dégradation de la végétation, déchets des animaux sauvages.

Leur mobilité et leur transfert dans les différents compartiments de l'environnement est fonction des propriétés chimiques intrinsèques de chaque métal. En particulier, il est important de considérer leur volatilité (ex. : formes organiques du mercure), leur solubilité dans l'eau (elle varie d'un métal à l'autre mais aussi selon les différentes formes d'un métal donné) et surtout le coefficient de partage du métal entre l'eau et les particules, ce qui est

déterminant à la fois dans le devenir, le transport et les interactions avec les autres compartiments des écosystèmes. Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligoéléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer toxiques, lorsque leur concentration dépasse un seuil, c'est le cas du Fe, Cu, Zn, Ni, Se, Mo et Mn (Miquel, 2001). D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et sont très toxiques (Pb, Cd et Hg) (Chiffoleau, 2001).

### 1.2 Répartition et devenir des ETM dans l'environnement aquatique

Une fois arrivés dans l'environnement aquatique, les métaux toxiques se répartissent entre les différents compartiments : l'eau, les sédiments et les organismes vivants. Les métaux dans l'eau sont soumis aux phénomènes d'absorption/désorption, de sédimentation, de dispersion, de dilution et d'advection. Leur destin final dépendra de l'équilibre entre ces différents phénomènes. De plus, tous ces processus sont influencés par des propriétés physiques et chimiques de l'eau que sont : le pH de l'eau, le statut redox, les ions dissous, la température ainsi que par la présence de microorganismes et des algues.

Par exemple, en zone calme dans un fleuve, les sédiments se déposent. La majeure partie des métaux s'y trouve enfermée en fonction du pH souvent voisin de la neutralité et du caractère oxydant de l'eau (Tonneau, 2003).

L'activité microbienne et les processus de réduction par oxydation peuvent modifier les propriétés des sédiments et influer sur la composition de l'eau interstitielle. Ainsi les oxydes de fer et de manganèse sont transformés en carbonates ou en sulfures, ce qui favorise une diminution de la capacité d'absorption des sédiments.

L'action des microorganismes et des algues ramène les sédiments en surface, où une fraction appréciable du métal est libérée. Dans les eaux douces, les métaux lourds subissent plusieurs transformations : réduction, oxydation, méthylation et déméthylation, complaxion.

Les diverses façons dont les substances toxiques pénètrent, se déplacent et se trouvent dans le milieu aquatique, sont récapitulées dans la figure 2:

dépôt sec ou retombées de poussière, partage dans l'atmosphère, dépôt humide, transfert par embruns, volatilisation, absorption, transfert par bulles, diffusions verticale et horizontale, répartition biote-sédiments en suspension, diffusion eau sédiments, remise en suspension, sédimentation, sédiments de fond.

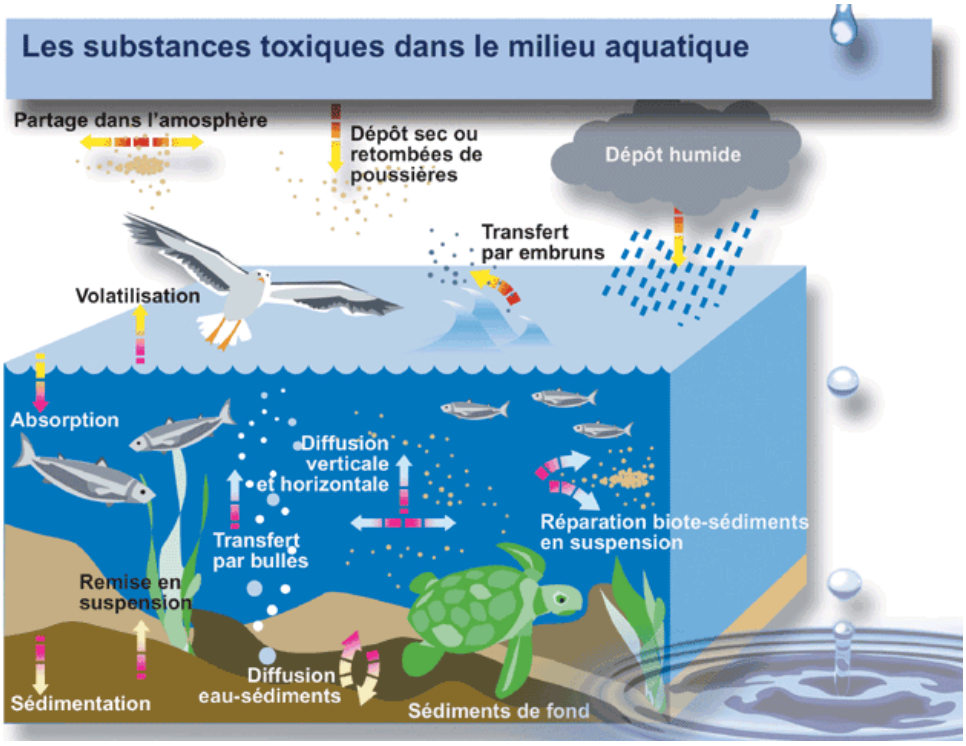



**Figure 2: Les substances toxiques dans le milieu aquatique**

***Source***: www.ec.gc.ca/water/images/manage/poll/a3p5f.htm (mars, 2010)

### 1.3 Biodisponibilité des ETM dans l'environnement aquatique

On définit la biodisponibilité comme le degré avec lequel un contaminant, dans une source potentielle, est assimilé par un organisme (O'Donnel *et al.*, 1985 ; Newman et Jagoe, 1994). Elle met en jeu trois étapes principales (Campbell, 1995) : l'advection ou la diffusion depuis la solution vers la surface de la membrane ; l'adsorption ou la complexation sur les sites de transport ; le transport à travers la membrane pour une assimilation dans l'organisme. La connaissance de la biodisponibilité d'un élément toxique dans un milieu donné est donc primordiale pour estimer l'exposition des organismes à ce toxique et son effet (toxicité, bioaccumulation, bioconcentration). Dans le cas des métaux, il est connu depuis longtemps que les concentrations totales du milieu ne permettent pas d'évaluer l'exposition réelle ni les effets possibles sur les organismes.

La biodisponibilité étant avant tout définie pour un organisme donné, il est à noter que cette étude se place par rapport à des organismes simples qui sont à la base des chaînes trophiques aquatiques (bactéries, algues unicellulaires et microcrustacés d'eau douce). Notre choix de travailler à ce niveau de l'écosystème est principalement motivé par la forte sensibilité de ces organismes aux ETM. Par ailleurs, les interactions de ces organismes avec

ces ETM sont mieux maîtrisées que pour des maillons plus élevés de la chaîne trophique (ex. : poisson), dont l'interface avec leur milieu est plus complexe.

### 1.4 Bioaccumulation ETM

La bioaccumulation est le processus d'assimilation et de concentration des métaux toxiques dans les organismes avec le temps. Elle est caractérisée par l'accroissement d'un polluant lorsqu'il passe de l'eau dans un organisme par voie directe ou alimentaire (Miquel, 2001; Le Goff, 2000). Ce processus se déroule en trois temps :

- l'assimilation ;
- la bioaccumulation par l'individu ou bioconcentration ;
- la bioaccumulation entre individus ou bioamplification.

**L'assimilation**

L'exposition aux polluants se fait essentiellement par deux voies : la voie externe par contact (air, eau) qui provoque un phénomène d'absorption et la voie interne par assimilation ou absorption.

La toxicité d'un métal dépend de sa concentration et surtout de sa fraction soluble biodisponible. L'autre fraction insoluble peu biodisponible est éliminée (Miquel, 2001).

La biodisponibilité est la facilité avec laquelle une substance nutritive ou contaminante peut être absorbée par un système biologique, et dont l'effet sur l'organisme est quantifiable (De Haan *et al.,* 1993).

La partie biodisponible, assimilable, s'accumule dans certains organes. C'est l'organotropisme qui est dû à la fonction particulière de tel ou tel organe. C'est le cas du foie, principal siège de la métabolisation, ou du rein, siège de l'excrétion. Ce phénomène peut aussi être imputé à la composition physico-chimique de l'organe favorisant ainsi le stockage du contaminant (calcium/plomb dans les os) ou permettant les accumulations. Par exemple, les organes riches en lipides accumuleront fortement les polluants organiques, et /ou solubles dans les lipides. La cinétique d'accumulation diffère selon les métaux.

**La bioaccumulation par l'individu : bioconcentration**

La bioaccumulation est l'accroissement direct de concentration d'un polluant lorsqu'il passe de l'eau dans un organisme aquatique (Le Goff, 2000). Elle se réalise par voie directe

ou alimentaire et concerne tous les métaux lourds en général. La bioaccumulation diffère selon les métaux et les espèces. Les organismes vivants sont beaucoup plus réceptifs que l'air et l'eau. Mais il existe une hiérarchie entre les espèces, classées selon leurs aptitudes à concentrer les métaux lourds. La durée d'exposition est un facteur important. Les fruits de mer, mollusques et crustacés, et dans une moindre mesure certains poissons sont d'excellents capteurs de polluants (Miquel, 2001; Montcho, 2005).

**La bioaccumulation entre individus : la bioamplification**

Les transferts des métaux entre individus se font suivant les différents étages de la chaîne alimentaire. On parle de "transferts trophiques". Le polluant, présent dans les algues, les plantes et les microorganismes est ingéré par un herbivore, lui-même proie d'un carnivore qui est à son tour proie d'un supercarnivore, animal ou homme.

Le plomb méthyle par exemple, issu de la transformation du plomb métal par les bactéries des eaux continentales, sera ensuite concentré dans certaines algues jusqu'à un certain nombre de fois sa concentration originelle dans l'eau. Par la suite, le cycle continue : les petits poissons mangent ces algues, et sont eux-mêmes dévorés par de plus gros. Les populations humaines qui consomment ces poissons peuvent donc être exposées à des concentrations de plomb très élevées (Gérald, 1996)**.**

Les concentrations en métaux augmentent donc au fur et à mesure que l'on évolue dans la chaîne trophique. C'est ainsi que les métaux surtout sous leur forme méthylée se concentrent dans les gros poissons.

# II. Caracteristique, source, toxicité et normes des ETM

## 2.1 Plomb

### 2.1.1 Caractéristique

Le plomb est un élément chimique de la famille des cristallogènes, de symbole Pb et de numéro atomique 82. Le mot et le symbole viennent du latin *plumbum*. Le plomb est dans son état naturel un métal gris bleuâtre malléable. On le trouve dans tous les compartiments environnementaux à savoir l'hydrosphère, la stratosphère, la biosphère et l'atmosphère. Il constitue 0,014% de la masse de la croûte terrestre ; ce qui le place parmi les métaux industriels, entre le cuivre (0,035%) et l'étain (0,002%) (Galaf *et al.,* 2003). Il se trouve dans l'eau de mer principalement sous forme de carbonates $PbCO_3$ (40 à 80%) ou de chlorures $PbCl_2$ (1 à 40%) et PbCl (2 à 19%) (Hirshorn, 1989).

Il est utilisé dans l'industrie de production des monnaies, la fabrication de la vaisselle, du cristal et des peintures.

**Tableau II: Caractéristiques chimiques du Plomb,** (d'après Miquel, 2001)

| | |
|---|---|
| Nom, Symbole, Numéro | Plomb, Pb, 82 |
| Minerai d'origine | Galène |
| Groupe, Période | IVA, |
| Masse atomique | 207.19 |
| Masse volumique | 11,35g/cm$^3$ |
| Température de fusion | 327.5° |
| Température d'ébullition | 1740° |

***Source :*** *Spin, 1997*

### 2.1.2 Source de pollution

Murozuni *et al*. (1969) ont mis en évidence une augmentation d'un facteur 20, au cours des deux derniers siècles, des concentrations en plomb dans les glaces polaires ayant intégré la retombée atmosphérique. Cette augmentation est en relation avec l'accroissement des émissions anthropiques. Afin d'évaluer la contamination actuelle de l'atmosphère, Bourton et Patterson (1986) ont reconstruit la chronologie des flux de plomb dans les glaces de l'antartique depuis environ 30000 ans. Ils ont conclu que 99% du plomb présent aujourd'hui dans la troposphère de l'hémisphère nord est d'origine humaine. La principale source de plomb atmosphérique est, de toute évidence, la combustion de l'essence pour les véhicules à moteur (Nriagu, 1989). La production d'une tonne de ciment dégage 16 g de plomb dans l'atmosphère (EPA, 1973). L'émission de plomb atmosphérique par les usines d'engrais chimiques est estimée à 0,42 g / T de fertilisant (Pacyna *et al.,* 1984). Outre ces sources, nous distinguons les peintures au plomb, les installations de plomberie, la culture des aliments dans les sols contaminés au plomb, les jouets, les carburants ou d'autres produits contenant du plomb ou de la peinture au plomb (Suzy *et al.,* 2008).

### 2.1.3 Toxicité

Le plomb aurait des effets neurologiques (plomb méthylé) sur le comportement de la mésofaune et de la macrofaune. La consommation par l'homme de poissons contaminés par le plomb peut provoquer des atteintes du tube digestif (saturnisme), du sang (anémies), des reins

(Beauchamp, 2003). Le plomb agit au niveau du système nerveux périphérique en réduisant la vitesse de conduction des nerfs centraux et peut créer des encéphalopathies graves (Leyral et Vierling, 1997). La toxicité du plomb constitue un plus grand risque pour les bébés (car il traverse la barrière transplacentaire), les jeunes enfants à cause de leur grande capacité d'absorption du plomb qui peut aller jusqu'à 50% chez l'enfant alors qu'elle est de 10 à 15% chez l'adulte (Beauchamp, 2003). L'intoxication au plomb est beaucoup plus dangereuse chez les enfants, même à des concentrations minimes et peut se traduire par un retard du développement moteur, une altération de la mémoire, des problèmes d'audition et des troubles de l'équilibre (Galaf et Ghannam, 2003). Plusieurs études ont démontré également que le plomb a un effet toxique sur la formation des spermatozoïdes (asthénozoospermie, asthénooligozoospermie) ce qui peut conduire à une diminution de leur nombre et, éventuellement, à une hypofertilité (Hirshorn, 1989). L'exposition au plomb a aussi été reconnue responsable de mortalité chez les fœtus et d'avortements spontanés (Hirsbon, 1989). Le plomb diffuse également dans la peau, les muscles, la colonne vertébrale, le système sanguin et le système nerveux central (Miquel, 2001).

## 2.2 Cadmium

### 2.2.1 Caractéristique

Le cadmium est un métal lourd de densité : 8,64g/cm$^3$, blanc bleuâtre, mou et malléable. Il existe aussi sous forme de composés minéraux. Ses propriétés chimiques ainsi que celles de ses composés se retrouvent dans le Tableau III. Il fait partie du groupe II-B du tableau périodique de Mendeleïev. Il offre une bonne conductivité électrique, mais chimiquement il est instable. En effet, il est facilement attaqué par les acides, même les plus faibles. Sa teneur dans l'eau va de quelques microgrammes à 130 mg/L (Galaf *et* Ghannam, 2003).

**Tableau III: Caractéristiques chimiques du cadmium,** (d'après Miquel, 2001)

| | |
|---|---|
| Nom, Symbole, Numéro | Cadmium, Cd, 48 |
| Minerai d'origine | Scories de zinc |
| Groupe, Période | (IIB), |
| Masse atomique | 112.4 |
| Masse volumique/ | 8,64g/cm3 |
| Température de fusion | 320.9° |
| Température d'ébullition | 765° |

***Source :*** *Spin, 1997*

Le cadmium est un métal très ductile. Malgré une tension de vapeur faible, il émet des vapeurs bien en dessous de son point d'ébullition (Inrs, 1997). Il est insoluble dans l'eau et dans les solvants usuels. Lorsqu'il est chauffé à des températures élevées, il émet des vapeurs jaunes rougeâtres d'oxyde de cadmium. Les caractéristiques de ses composés diffèrent : l'oxyde de cadmium est lui aussi presque insoluble dans l'eau mais soluble dans les acides. Au contraire, les composés chlorure, nitrate et sulfate qui se présentent sous la forme de cristaux incolores sont très solubles dans l'eau, les acides dilués et les solvants organiques. A température ordinaire et à sec, le cadmium n'est pas attaqué par l'oxygène, mais s'oxyde lentement avec l'humidité. Il est facilement attaqué par les acides, même les plus faibles tels que les acides organiques présents dans les denrées alimentaires. L'ion $Cd^{2+}$ est susceptible de former des sels dont les plus courants sont le chlorure de cadmium, le sulfate de cadmium, le sulfure de cadmium.

### 2.2.2 Source de pollution

Le cadmium est un métal présent à l'état d'impuretés dans divers minerais. Environ 80% du cadmium est utilisé sous forme de cadmium métallique, comme Electrode négative, notamment des batteries d'accumulateurs rechargeables Ni–Cd ou de piles électriques alcalines. Il est également utilisé dans la production de matières plastiques comme stabilisateur et retardateur de dégradation. Il est présent à l'état d'impuretés dans certains engrais phosphatés, dans certains métaux ferreux ou non ferreux, lors de la combustion de matières organiques d'origine fossile (pétrole, gaz, charbon...) et dans les boues des usines de traitement des eaux usées et d'incinération (Andujar *et al.,* 2010). Les deux principales sources d'exposition au cadmium de la population sont l'alimentation et le tabagisme. Le cadmium est présent de façon importante dans certains aliments, comme les fruits de mer, les abats, certaines céréales (riz, blé...), les champignons et les légumes et, dans une moindre mesure, dans le poisson, les fruits et la viande (WHO, 2004). Les apports moyens journaliers sont d'environ 10 à 35 µg chez l'adulte non fumeur (Satarug *et al.,* 2000). Le tabagisme constitue un apport important de cadmium (environ 1µg par cigarette) (Nandi *et al.,* 1969, Nordberg, 1974). L'apport de cadmium dans l'eau de boisson est en général inférieur à 0,1 µg/l (WHO, 2004).

### 2.2.3 Toxicité

Les effets de ce métal lourd sont divers et dépendent de l'état chimique sous lequel on les rencontre (méthane, oxyde, sel). L'intoxication par le cadmium peut être aiguë ou chronique. La toxicité aiguë se manifeste par des gastro-entérites avec nausées et vomissements. Deux cas de décès ont été rapportés dans la littérature à partir de1500 mg (Wisniewska *et al.,* 1971; Buckler *et al.,*1986). La toxicité aiguë de ce métal se caractérise également par une cytotoxicité, une carcinogénèse, une activation des ribonucléases, une prolifération des radicaux libres comme reactive oxygen species (ROS) (Nath *et al.,* 1996, Hultberg *et al.,*1998) et des signes traduisant apoptose (Habeebu *et al*., 1998). Le cadmium provoque l'anémie (Horiguchi, 2007; Kostić *et al*., 1993 ; Prigge *et al.,* 1977 ; Kazou *et al.,* 1975; Manabu et Takashi,1986 ) et induit des effets immunologiques (Blakley,1985; Müller *et al.,* 1979 ).

Quant à la toxicité à long terme, elle se manifeste par une néphrotoxicité, une hépatotoxicité et des perturbations métaboliques du calcium et de la vitamine D dans les tissus osseux (Jarup *et al.,* 2000). En effet, celle-ci se manifeste par une sévère décalcification, fonction des doses, à partir de quelques mg/kg (Bhattacharyya, 1991), des lésions membranaires des microsomes hépatiques (Theocharis *et al.,* 1991), et une inhibition de synthèse protéique observable dans les branchies des mollusques (Theocharis *et al.,* 1991). Des études ont également montré l'implication du cadmium dans certaines maladies cardiovasculaires dont l'hypertension artérielle et dans le cancer de certains organes (foie, rein) (Smith, 2003). Il provoque aussi des troubles respiratoires et une perturbation de la synthèse des protéines (Le Goff, 2000).

En 1946, au Japon, il y avait une maladie dite *d'Itai-Itai* observée chez les sujets vivant en aval d'une usine qui contaminait les eaux de boisson, les aliments, les légumes, les céréales et les poissons. Elle aurait provoqué 56 morts sur 233 cas. Encore appelée maladie des douleurs, elle se manifeste par des algies osseuses et articulaires diffuses, prédominant dans le bassin des déformations osseuses, notamment une cyphose de la colonne vertébrale et des fractures osseuses spontanées (Beauchamp, 2003). Il semble aussi contribuer aux maladies auto-immunes de la thyroïde (Le Goff, 2000).

Le cadmium aurait un impact sur le biotope aquatique avec une toxicité qui diffère selon les espèces et la concentration. A des concentrations faibles naturelles, il ne se présente pas de toxicité aiguë pour les organismes humains. A des concentrations sublétales de 0,05 à

1,2µg/L d'eau de mer, il entraînerait des perturbations respiratoires, une situation enzymatique chez les larves de crustacés et une inhibition de la croissance du phytoplancton. A des concentrations élevées de l'ordre de 2,5 à 3.3µg/L, les mollusques s'isolent du milieu ambiant et meurent. A des concentrations de l'ordre de 6,4µg/L, il indurait une diminution de la reproduction chez les crustacés et les poissons avec de l'équilibre ionique (Perrondon, 2000).

Chez les poissons, le cadmium entraînerait une diminution du taux d'hémoglobine (Guédénon *et al.,* 2012b) et des pertes de calcium. Une étude chez le calmar a montré que le cadmium se fixe sur certains canaux calciques dont il accroît la perméabilité, tout en obstruant temporairement le passage des ions calcium (Chow, 1991). Le cadmium se concentre presque exclusivement dans le tube digestif, le foie et les reins (Miquel, 2001).

Toutes les expériences menées sur les rats et les souris confirment que l'exposition orale au cadmium provoque des dommages rénaux et particulièrement des lésions tubulaires induisant de la protéinurie. Les découvertes d'histologie montrent des lésions focales de nécrose de l'épithélium des tubules proximaux et une inflammation des tubules rénaux. Les modèles animaux montrent qu'une concentration approximative de 200 µg/g dans le cortex rénal doit être atteinte pour provoquer une protéinurie (INERIS, 2005).

Les résultats des études menées sur les effets hépatiques provoqués par une exposition orale prolongée au cadmium sont contradictoires. Si les modifications métaboliques (augmentation des concentrations sériques des enzymes hépatiques) induites semblent indiscutables, les altérations histologiques du foie ne sont constatées que dans une seule étude (Friberg *et al.,* 1979).

On a pendant longtemps considéré que le cadmium n'avait pas de retentissement sur la reproduction et le développement. Les connaissances sur ce sujet sont en train de s'affiner. Certaines études montrent qu'une exposition prolongée au cadmium provoque une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et une augmentation du taux de spermatozoïdes à morphologie anormale (Magos, 1991; Gbetoh *et al.,* 2012).

Certains auteurs rapportent un effet hypertenseur du cadmium (Schroeder et Vinton, 1962 ; Satarug *et al.,* 2006). Il est classé comme agent cancérogène certain pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (Andujar *et al*., 2010).

## 2.3 Mercure

### 2.3.1 Caractéristique

Le mercure est le seul métal liquide à la température ordinaire d'où son nom latin *hydrargyrum* (eau argentée) et de qui il tient son signe (Hg). Ce liquide blanc argenté, brillant, très dense et très mobile, est pratiquement insoluble dans l'eau comme dans les solvants organiques usuels. Malgré une tension de vapeur faible, il émet, dès la température ordinaire, des vapeurs en quantité appréciable (à 24 °C concentration de vapeur saturante = 18 mg/m$^3$). Il se divise par l'agitation en fines gouttelettes et est seul métal dont la température d'ébullition soit inférieure à 650° (357°). Ce métal qui se caractérise par une extrême volatilité, se combine très facilement avec d'autres molécules, que ce soient des métaux (amalgames), des molécules inorganiques (sels) ou organiques (carbone). Il est un métal dit «lourd» dans la classification du chimiste Mendeleïev, dans la mesure où il possède une «masse atomique» de 200 (hydrogène =1).

**Tableau IV: Caractéristiques chimiques du Mercure**

| | |
|---|---|
| Nom, Symbole, Numéro | Mercure, Hg, 80 |
| Minerai d'origine | Cinabre |
| Groupe, Période | IIB |
| Masse atomique | 200.61 |
| Masse volumique/ | 13,6 g/cm$^3$ |
| Température de fusion | -38.9°C |
| Température d'ébullition | 356.6°C |

***Source :*** *Fiche toxicologique N°55,1997 et Abi-Ghanem, 2008*

### 2.3.2 Formes du mercure

Sur le plan physico-chimique, le mercure est un métal qui change facilement de forme et de propriétés. Très volatil, il passe aisément de l'état liquide à l'état gazeux à température ambiante. En présence d'oxygène, le mercure s'oxyde très facilement passant de l'état métallique ($Hg^0$), liquide ou gazeux, à l'état ionisé ($Hg^{2+}$). C'est aussi un métal qui s'associe facilement aux molécules organiques formant de nombreux dérivés mercuriels. Le mercure se présente en deux familles distinctes :

- Le **mercure métallique** ou **inorganique** qui prend lui-même trois formes différentes :
  - le mercure métallique élémentaire, sous forme liquide (noté Hg°) : c'est le mercure classique, sous sa forme la plus connue, qui était utilisé dans les thermomètres ;
  - le mercure sous forme gazeuse (noté Hg°) : c'est le mercure, en chauffant, se transforme en vapeur ;
  - le mercure inorganique, sous forme ionique : C'est ce qu'on appelle les atomes de mercure (notés Hg2+).
- Le **mercure organique** : il se combine avec une molécule contenant du carbone, à la base de tout élément vivant (ou qui a été vivant). Il existe des échanges permanents entre ces différentes formes, car le mercure a une grande capacité à se transformer, notamment sous l'effet de l'acidité du milieu, et de la présence de molécules assurant ces combinaisons (chlore, soufre). La transformation peut être décrite comme suit :
  - du mercure métallique aux ions mercuriques : l'oxydation. Le mercure sous forme de vapeurs est inhalé. Par l'action de la catalase présente dans les globules rouges, le mercure métallique est transformé en ions mercuriques, qui passent dans le sang ;
  - des ions mercuriques au mercure organique : la méthylation. La méthylation se déroule principalement en milieu aqueux ou dans les intestins, en fonction de l'acidité et de la présence de soufre. Les composés de mercure organique les plus connus sont le méthylmercure et le diméthylmercure.

### 2.3.3 Source de pollution

Les rejets anthropiques de mercure, dûs à l'activité humaine, peuvent se classer en trois catégories : les rejets dûs à la mobilisation du mercure contenu dans les matières premières, ceux provenant de l'extraction de l'or et des utilisations intentionnelles du mercure, et enfin les rejets issus du traitement de déchets ménagers et hospitaliers (incinération). La production d'énergie et de chaleur, au moyen de charbon et d'autres combustibles fossiles, la production de ciment (mercure dans la chaux), l'exploitation minière et autres activités métallurgiques qui impliquent l'extraction et le traitement de matériaux minéraux vierges et recyclés, constituent les principales sources d'émissions associées aux matières premières (PNUE, 2002). Les principales sources de mercure, qui proviennent de l'extraction et des utilisations intentionnelles de mercure, sont l'exploitation minière du mercure, l'exploitation minière à petite échelle de l'or et de l'argent (utilisant le procédé d'amalgamation), la production chlore-soude à cathode de mercure, l'utilisation de lampes

fluorescentes, de divers instruments et des amalgames dentaires, la fabrication de produits contenant du mercure (thermomètres, manomètres, baromètres, commutateurs électriques et électroniques) (PNUE, 2002). Enfin, l'incinération de déchets (déchets urbains, médicaux et toxiques), les décharges, et la combustion par crémation et les cimetières (rejets vers le sol), représentent les principales sources anthropiques de mercure (PNUE, 2002). Il est aussi présent dans les amalgames dentaires, vaccins, produits cosmétiques, antiseptiques et antifongiques (Rustagi et Singh, 2010).

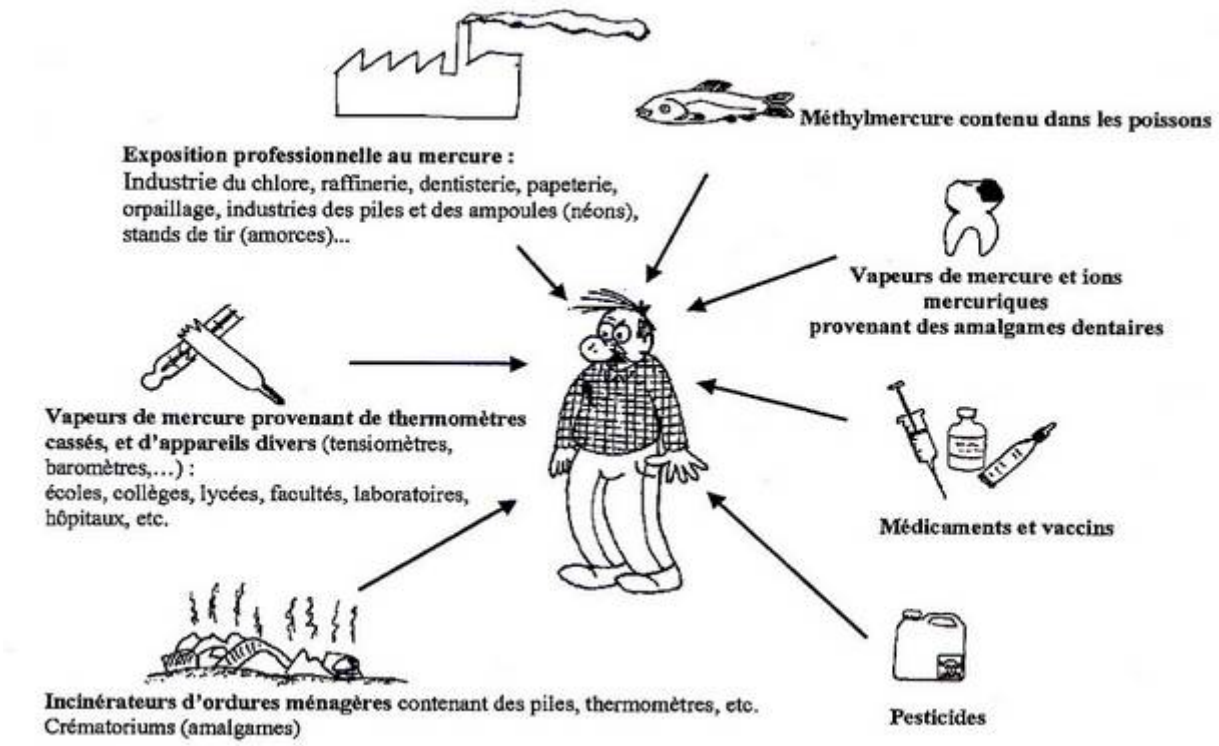



***Figure 3: Sources d'exposition mercurielle pour l'homme***

***Source :*** Grosman et Melet, 2000

Les poissons et produits de la mer constituent les principales sources d'exposition au mercure. Présent dans tout l'environnement, il est un élément extrêmement toxique pour l'environnement et l'homme. La contamination des écosystèmes par le mercure et l'empoisonnement des populations consommatrices de produits de la pêche font partie depuis la catastrophe de Minamata (Osame et Takizawa, 2001), des préoccupations majeures des organismes de santé. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini depuis de nombreuses années déjà, des critères précis pour la consommation de poisson, qui est la source principale de mercure et de méthylmercure pour les populations humaines. Une Dose

Hebdomadaire Tolérable Provisoire (DHTP) de 1,6 µg de MeHg/kg p.c./semaine (soit 0,23 µg/kg p.c./j) et de 5 µg de Hg-T/kg p.c./semaine a été fixée et s'applique dans de nombreux pays comme le Canada. La Commission européenne (Règlement français N°466/2006) a fixé des teneurs maximales en mercure total de 0,5 mg/kg de poids frais pour les produits de la pêche, sauf pour certaines espèces (anguille, mulet, brochet, requin, espadon, marlin, thon, et l'hoplostète orange par exemple) pour lesquelles, la valeur a été fixée à 1 mg/kg de poids frais. En France, les avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments(AFSSA) relatifs aux apports en mercure via la consommation de poisson se multiplient depuis quelques années. La contamination au mercure touche toutes les populations, et principalement les populations fortement consommatrices de poissons. D'après Lindqvist *et al.,* (1991), dans environ 50% des quelques 100 000 lacs du pays, le brochet (de 1 kg) contient du mercure à un niveau supérieur à la limite internationale fixée par l'OMS de 0,5 mg/kg de poids frais et, dans 10 % des lacs, il en contient plus de 1 mg/kg de poids frais.

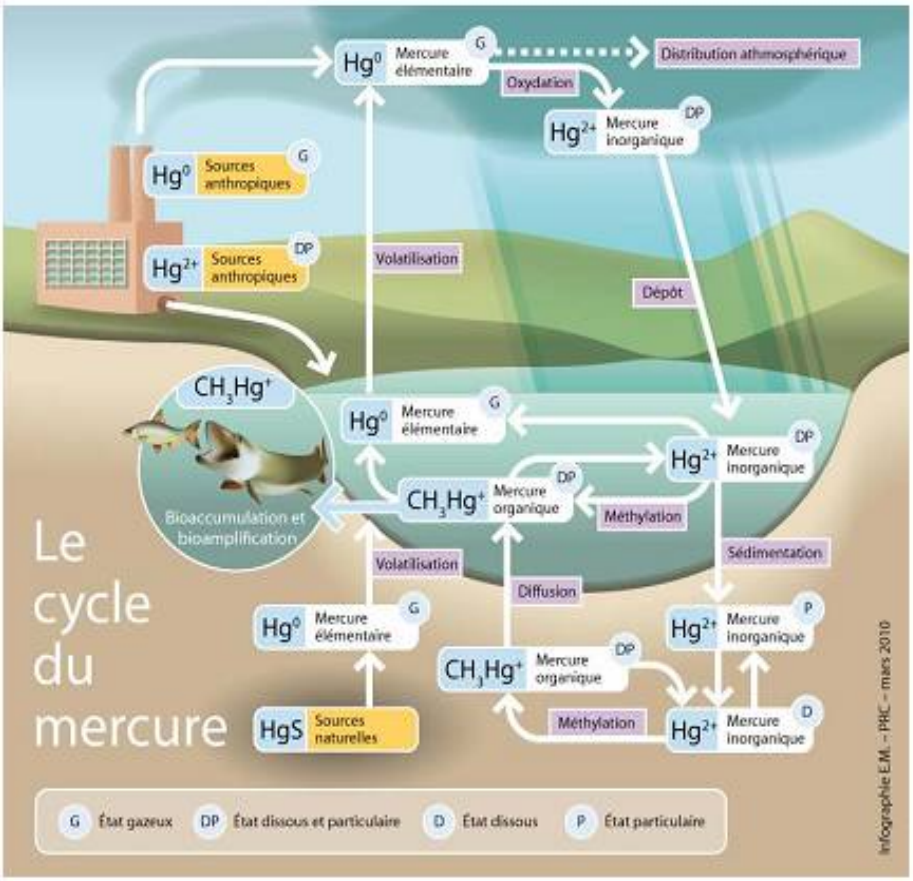



**Figure 4: Représentation schématique simplifiée du cycle biogéochimique du mercure**

***Source :*** *Marusczak, 2010*

### 2.3.4 Toxicité

Cette toxicité est cependant variable selon les formes chimiques du mercure.La toxicité du Méthylmercure (MeHg) est due au fait qu'il est directement assimilable par les organismes vivants et bioaccumulables dans la chaîne trophique (Bloom, 1992 ; Southworth *et al.,* 1995 ; Roulet *et al.,* 2000 ; Mergler *et al.,* 2007 ). Les processus de bioaccumulation et bioamplification de Hg dans l'écosystème aquatique expliquent que les concentrations dans les organismes vivants, tels que les poissons piscivores, soient 107 fois supérieures à celles de l'eau dans laquelle ils évoluent (Munthe *et al*., 2007). Après ingestion de nourriture contaminée, plus de 90 % de Hg est absorbé par la paroi gastro-intestinale, puis transféré dans l'organisme par la circulation sanguine et après 4 jours, diffuse tout l'organisme humain. Le cerveau présente la particularité de concentrer cet élément, notamment dans les molécules lipidiques et de présenter des concentrations en Hg jusqu'à 6 fois supérieures à celles mesurées dans le sang (Kjellstrom *et al.,* 1989). Par ailleurs, la toxicité des espèces mercurielles est déterminée principalement par leur stabilité chimique, leur capacité à traverser les barrières biologiques et par le métabolisme des organismes récepteurs (équilibre absorption/excrétion). Par exemple, le cas extrême de contamination des populations de Minamata, au Japon, dans les années 1960, a été associé à la consommation des poissons locaux contaminés par du mercure rejeté directement dans la baie par une industrie chimique (D'Itri, 1972). Par ailleurs, le MeHg a une grande solubilité dans les lipides et les solvants mais possède également une grande affinité pour les groupes thiols (-SH), particulièrement abondants dans les protéines (comme la cystéine). Le MeHg est un neurotoxique très actif qui peut passer dans le sang et à travers la membrane des cellules. Ces propriétés lui confèrent une grande stabilité avec une période de demi-vie relativement longue: 70 jours dans le sang, et 270 jours dans le cerveau (Picot et Proust, 1998). La particularité de MeHg est qu'il est très toxique même à très faibles concentrations avec des doses létales comprises entre 10 et 100 µg L-1 pour les organismes aquatiques (WHO, 1989). Le MeHg a provoqué aussi la paralysie, l'handicap et/ou la mort chez plusieurs milliers de personnes (Takizawa, 1979).

Le mercure induit une alteration sévère dans les tissus du corps des animaux et de l'homme (Lund *et al*., 1993; Mahboob *et al.,* 2001; Sener *et al*., 2003). Il cause des altérations du foie, des reins et du cerveau (Clarkson, 2002)**.** L'exposition chronique au mercure à travers la consommation des produits halieutiques et fruits de mer (Suzy *et al*., 2008) peut causer des

effets néfastes sur les systèmes cardiovasculaires, gastrointestinal, reproductif, imunologique et nerveux (Clarkson,1997; Cheng *et al.*, 2006 ; Crinnion, 2000; Boscolo *et al*., 2009; Diez, 2009; Mahour et Saxena, 2009). Les symptomes d'une toxicité chronique au mercure sont les suivants: paresthésie, neuropathie périphérique, ataxie cérébelleuse, akathisie, la spasticité, la perte de mémoire, la démence, la vision rétrécie, dysarthrie, troubles de l'audition, de l'odorat et du goût, tremblements et dépression (Clarkson, 2002). Le mercure peut induire l'apoptose et la mort de cellules dans les organes affectés (Olivieri *et al.,* 2000; Reus *et al.,* 2003; Monroe et Halvorsen, 2006; Singh *et al.,* 2007). L'intoxication au mercure induit la nephrotoxicité et endommage les reins (Nath *et al.,* 1996 ; Oda-Samah et El-Ashmawy, 2012). Les perturbations neurologiques provoquées par le mercure ont attiré plus d'attention ces dernières decennies. Quelques composés mercuriques peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique ainsi que la barrière placentaire et affecter le développement du système nerveux central des embryons (Satoh and Suzuki, 1983; Suzuki *et al*., 1984; Kishi *et al*., 1994; Sakamoto *et al*., 2004). Une exposition prénatale au chlorure de mercure montre les effets tératogéniques (Satoh et Suzuki, 1983; Yoshida, 2002). Elle peut causer des anomalies structurales dans le tube neuronal et le cordon médullaire des embryons chez les rats (Rastegar *et al.,* 2010).

### 2.4 Normes des ETM

Du fait de la gravité des effets des métaux sur l'environnement et par ricochet sur la santé publique, des règlements ont été adoptés, à tous les niveaux, visant à limiter leurs émissions ou réduire leurs usages. Les notions de normes et de doses en dessous desquelles la substance est considérée comme inoffensive et son extrapolation à l'homme, imposées comme données scientifiques sont, certes, souvent inadéquates. Ceci parce qu'elles ne tiennent pas compte des synergies entre métaux et les possibilités de détoxification de l'organisme sans oublier les phénomènes de sensibilité génétique individuelle (Miquel, 2001). Cependant ces arrêtés tels que le montre le tableau V, sont des références que nous allons considérer dans cette étude.

Des normes, on a tiré les doses autorisées. Les valeurs les plus courantes sont la dose journalière admissible (DJA) ou dose hebdomadaire tolérable (DHT). On parlera de « dose admissible » lorsque l'élément dosé est ajouté par l'homme à un produit additif, alimentaire par exemple. On parlera plutôt de « dose tolérable » lorsque l'élément dosé est dans le produit à la suite d'un contaminant, sans que l'homme soit intervenu (Miquel, 2001).

## Tableau V: Normes des métaux toxiques

| métaux lourds | Hg | Cd | Pb | Zn | Al | Cu | Mn | Fe | As | Cr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aliments végétaux (produits maraîchers) (OMS, 2001) en ppm | | 0,05 | 0,1 | 5 | 0,2 | 3 | 0,05 | 0,2 | 0,1 | 0,05 |
| Eau potable (OMS, USA, EPA) en ug/l | 1 | 3 | 10 | 3 000 | | 1 000 | | 300 | 10 | |
| Champignons cultives (Règlement français 466/2001 révisé) en ppm | 0,05 | 0,2 | 0,3 | | | | | | 0,1 | |
| Mollusques CE 266/2001en mg.kg-1 | 2,5 | 5 | 7,5 | | | | | | | |
| Poissons (Règlement CE 466/2001en mg.kg-1 pour Hg, Cd, Pb FAO, 2001 en ppm pour le reste des métaux | 0,5 à 1 | 0,01 à 0,05 | 0,2 à 0,4 | 1000 | | 30 | | | | 0,3 |
| Huiles raffinées (végétal) en ppm (Règlement CE n° 466/2001 8/3/01UE) | | 0,2 | 0,1 | | | 0,1 | | 1,5 | 0,1 | |
| Huiles et corps gras ( CE n° 466/2001 8/3/01UE) en ppm | | | 0,1 | | | 0,4 | | 1,5 | 0,1 | |
| Eau douce PNEC Inéris Fiche dernière mise à jour Décembre 2003 | 0,01-0,24 | 0,17 | 5 | 8,6 | | 1,6 | | | | |
| Eau lac, rivière et fleuve (ug/l) (GESAMP, 1982) | 0,01 – 0,24 | 0,21 | 0,4 | 8,6 | 1000 | 0,1 | | 1,5 | 0,1 | |
| Sédiments (GESAMP, 1982 ; Salomons et Förstner, 1984 ; Directive 76/464/CEE, 2000) en (µg/g poids sec) | 0,05–0,3 | 0,11 | 19 | 95 | 8000 | 33 | 770 | 41000 | 17 | 100 |
| Eau marine Galaf F., Ghannam S., Pollution du milieu marin. Institut Agronomique Vétérinaire. Hassan II, Rabat (Maroc) | | 130 mg/L | | | | | | | | |
| Sol PNEC Inéris Fiche dernière mise à jour Décembre 2003 | 23-27 µg /kg | 12m g/kg | | 21 mg/kg | | 2,7 mg/kg | | | 15 mg/kg | |
| sédiments GESAMP, 1982 en (µg/g poids sec) | 0,01–0,08 | 0,2–5,0 | 8–60 | | | | | | 14 | |

***Source*** **:** *Koumolou, 2009*

# Chapitre 2 : Particularités anatomiques et histophysiologiques des organes cibles (foie, reins, cerveau)

## I. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du foie chez l'homme et les animaux

Le foie est la glande annexe la plus volumineuse du tube digestif. Il est doué de fonctions métaboliques complexes et indispensables à la vie et est situé à la partie supérieure droite de la cavité abdominale dans l'étage sus-mésocolique, sous la coupole diaphragmatique droite (Bouchet et Cuilleret, 1983).

### 1.1 Anatomie descriptive

Le foie des rongeurs en général et des rats Wistar en particulier présente presque les mêmes caractéristiques anatomo-physiologiques que celui de l'homme et des mammifères domestiques. C'est un organe de couleur brun bleuâtre ou violacé, divisé en lobes, surtout chez le cheval, les carnivores et les porcins. Chez certaines espèces, sur le canal excréteur, se trouve une ampoule : la vésicule biliaire (vésicule du fiel). Le cheval, le chameau et le rat Wistar ne possèdent pas de vésicule biliaire ; le sphincter d'Oddi se trouve alors renforcé au niveau de leur foie. Par contre, le foie des bovins, des ovins, des caprins, des porcins et des canins est pourvu de vésicule biliaire (Larrat *et al.,*1971).

Le foie est un organe lisse, de consistance ferme, de coloration rouge brun, constitué d'un parenchyme friable entouré d'une mince capsule fibreuse, la capsule de Glisson, « *tunica fibrosa*», émanation des gaines fibreuses entourant les vaisseaux portaux ou gaines périportales (Bouchet et Cuilleret, 1983). Il présente une extrême variabilité de volume, de dimension et de poids. Son poids est de 1 400 à 1 500 g chez le cadavre (environ 2 % du poids corporel chez l'homme) et en fait plus élevé, de l'ordre de 2 300 à 2 500 g, chez le vivant chez qui il est gorgé de sang. Chez le rat Wistar mort, le poids du foie représente environ 4% du poids corporel (Baker *et al.,* 1980). Le régime alimentaire influe sur le poids de l'animal. Ainsi, le foie est en proportion plus volumineux et plus lourd chez les carnivores et les omnivores que chez les herbivores. Il représente après la mort, environ 3,3% du poids du corps en moyenne chez le chien, 4,5% chez le chat, mais 1,7% chez le porc, 1,4% chez le bœuf et 1,25% chez le cheval. Le poids relatif diminue nettement dans les périodes de jeûne et dans les maladies cachectisantes sans atteinte hépatique (Barone, 1976).

### 1.2 Unité fonctionnelle du foie

Le foie, logé sous la coupole diaphragmatique, est organisé en lobules, eux-mêmes formés d'acini dont l'apport sanguin, assuré par une veinule porte et une artériole hépatique terminale, diffuse au sein des travées hépatocytaires par des sinusoïdes qui rejoignent la veine centrolobulaire. La grande perméabilité des cellules endothéliales, liée à leur absence de joints serrés, facilite les échanges métaboliques. La bile produite s'écoule dans les canalicules biliaires, localisés au niveau du pôle apical des hépatocytes, qui se résolvent en un réseau interlobulaire cheminant dans l'espace porte qui contient également les ramifications de la veine porte et de l'artère hépatique. L'innervation sympathique et parasympathique du foie se fait à partir d'un plexus pénétrant l'organe avec l'artère hépatique et la veine porte et se terminant au contact de la région centrolobulaire. Le foie est constitué de cellules hépatiques épithéliales nommées hépatocytes (60% des cellules) et de cellules du système réticulo-hystiocytaire : les cellules de Kupffer (40% des cellules). Le lobule hépatique est l'unité fonctionnelle du foie (figures 5, 6 et 7). Il se présente comme un livre dont les « pages» seraient formées par des lames d'hépatocytes orientées de façon radiaire et dont le « dos » correspondrait à la veine hépatique centrolobulaire qui forme l'axe central du lobule. A la périphérie des lobules se trouvent des formations étoilées nommées espaces portes. Ils sont occupés par des vaisseaux issus de la veine porte et de l'artère hépatique ainsi que par les canaux biliaires. Le sang circule entre les lames épithéliales dans des capillaires sinusoïdes. La circulation est centripète depuis l'espace porte jusqu'à la veine centrolobulaire. La bile progresse en sens inverse de façon centrifuge pour rejoindre les canaux biliaires situés dans les espaces portes. Les capillaires sinusoïdes sont formés par des cellules fenestrées. Cela permet aux grosses molécules (250 000 daltons) d'entrer au contact direct des hépatocytes dans l'espace de Disse qui est situé entre les capillaires et les lames d'hépatocytes. La composition des liquides remplissant l'espace de Disse est identique à celle du plasma sanguin. Les hépatocytes forment une monocouche autour de chaque capillaire et ils occupent 85% du volume hépatique. Ils sont responsables de la formation de la bile et des différentes transformations métaboliques. Les cellules de Kupffer (5 à 10% du poids hépatique) sont des macrophages situés dans la lumière des capillaires sinusoïdes et fixés aux intersections de leurs ramifications. Elles ont pour rôle de phagocyter les particules étrangères qui arriveraient de l'intestin avant qu'elles ne gagnent la circulation générale.

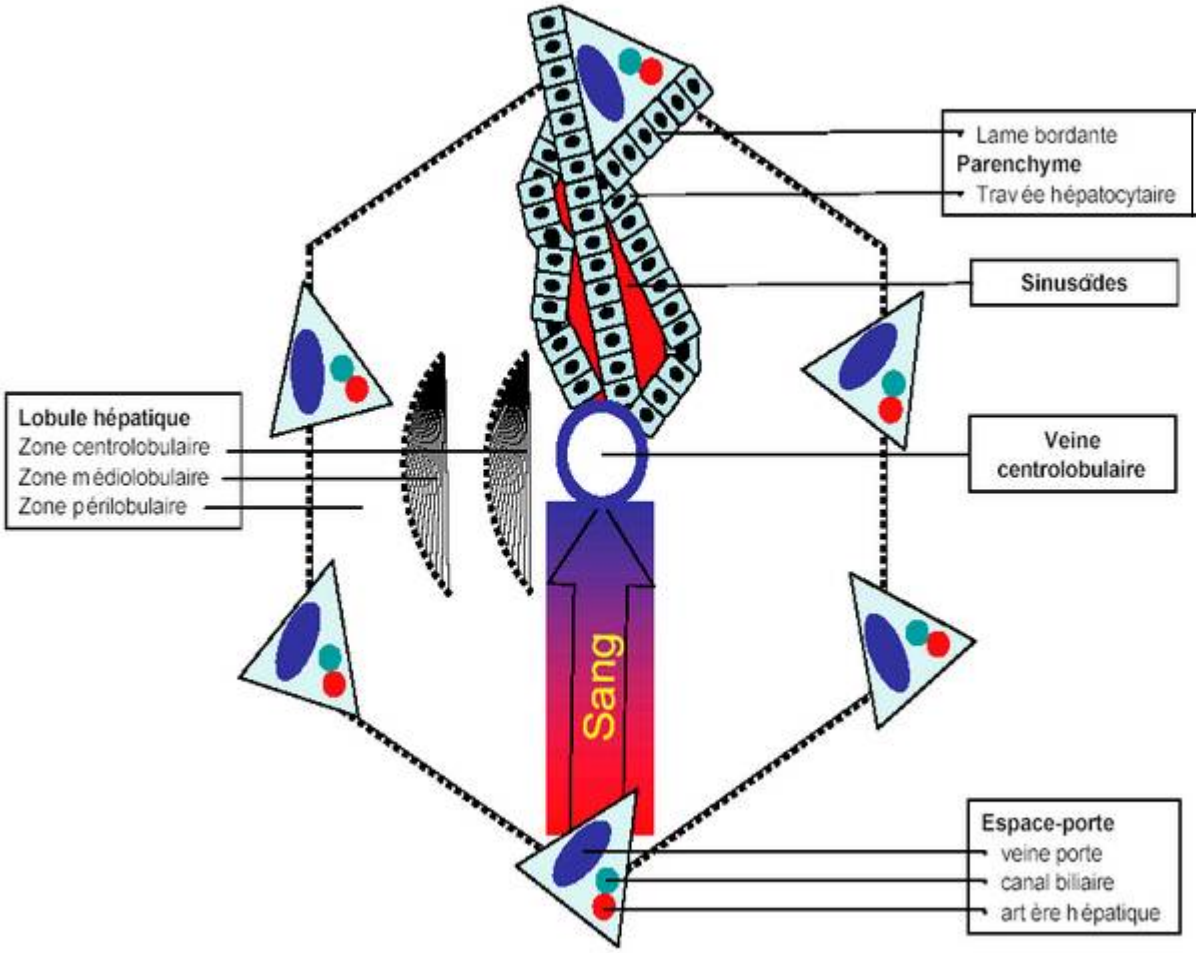



**Figure 5: Lobule hépatique classique centré par la veine centrolobulaire et borné par les espaces portes**

***Source :*** *Rappaport, 1963.*

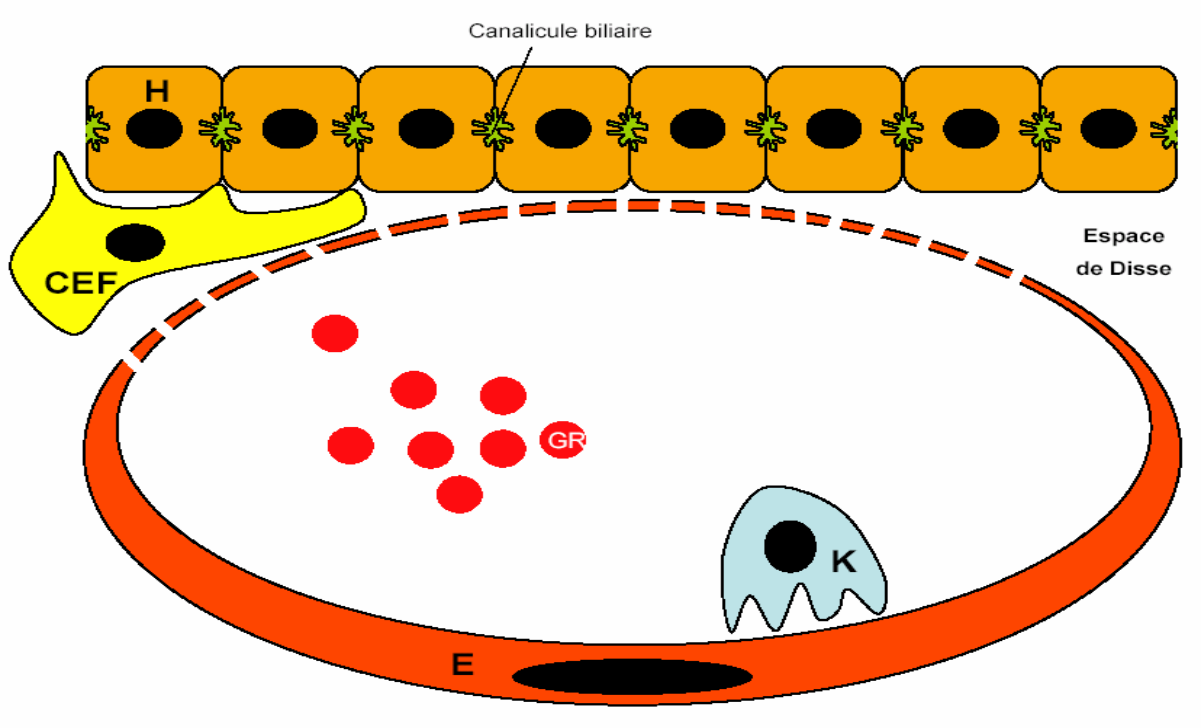



**Figure 6: Différentes cellules hépatiques**

(**H** = hépatocyte, **CEF** = cellule étoilée du foie, **E** = cellule endothéliale, **K** = cellule de Kupffer, **GR** = globule rouge). Aspect tel qu'en microscopie électronique

***Source :*** *Rappaport, 1963*

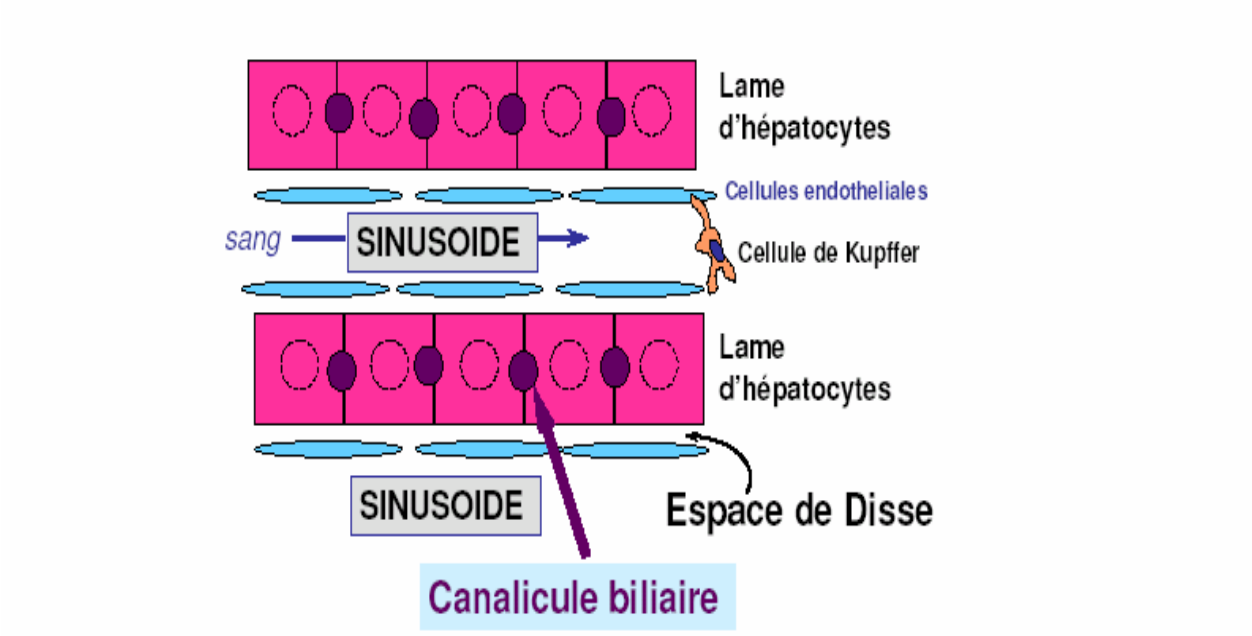



**Figure 7 : Parenchyme hépatique et capillaires sinusoïdes**

Les capillaires hépatiques sont fenestrés ce qui permet aux grosses molécules de passer du sang vers l'espace de Disse

***Source :*** *Rappaport, 1963*

## 1.3 Physiologie du foie

Le foie intervient dans diverses fonctions : métabolique, biliaire, de stockage, d'élimination ou xénobiotique.

### 1.3.1 Fonction métabolique du foie

Le foie assure de multiples fonctions métaboliques comme le métabolisme des glucides, des lipides, des protéines ainsi que des hormones (Dougnon, 2009).

### 1.3.2 Fonction biliaire : Sécrétion et excrétion biliaires

Le foie excrète par la bile un certain nombre d'éléments (acides, pigments biliaires, cholestérol) dont il faut étudier la sécrétion par le foie et le devenir dans les voies biliaires et l'intestin.

### 1.3.3 Fonction de stockage

Le foie est le lieu de stockage du fer, du cuivre ainsi que de toutes les vitamines liposolubles (A, K, D), $B_{12}$, C, et des oligo-éléments.

### 1.3.4 Fonction xénobiotique ou d'élimination

Quotidiennement, l'organisme absorbe, en même temps que les nutriments utiles pour son métabolisme, une grande quantité de xénobiotiques qui n'ont pas d'utilité pour son entretien et sa survie dans les conditions normales. Il s'agit par exemple des métaux lourds, des médicaments, des drogues multiples, des cigarettes, le café, l'alcool, etc. Compte tenu de la grande diversité et de la structure imprévisible de la structure chimique de ces xénobiotiques, les êtres vivants doivent disposer d'un arsenal diversifié d'enzymes et d'isoenzymes pouvant effectuer un large spectre de réactions chimiques sur des substrats ayant des structures très diverses (Trottier *et al.,* 2005). Le foie participe largement, avec les intestins et les poumons, à l'élimination des xénobiotiques, particulièrement de ceux qui sont ingérés avec l'alimentation. Généralement, les xénobiotiques sont hydroxylés, ce qui peut faire apparaître des substances toxiques ; ensuite ces métabolites sont conjugués avec une molécule hydrophile qui accroît leur solubilité dans l'eau et leur fait perdre leurs propriétés biologiques (Trottier *et al.,* 2005).

Les réactions d'oxydation et d'hydroxylation, qui constituent la phase I des processus d'élimination des xénobiotiques sont catalysées par des mono-oxygénases localisées dans les microsomes qui nécessitent le cytochrome P-450 comme transporteur d'électrons.

Ces réactions ont lieu dans le reticulum endoplasmique de l'hépathocyte. Le cytochrome est au préalable activé par deux électrons apportés par le nicotiamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné (NADPH) (NADH Cytochrome P-450 réductase). La forme oxygénée du cytochrome est très réactive et peut former des époxydes à partir de certains constituants de la fumée du tabac par exemple. Ces époxydes peuvent ensuite causer des mutations ponctuelles sur l'acide désoxyribonucléique (Trottier *et al.,* 2005).

Les enzymes cytochromes P-450 sont des protéines contenant de l'hème qui cohabite dans la membrane interne des mitochondries avec NADDPH-cytochrome P-450 réductase.

Il y a actuellement 14 familles de cytochromes P-450 et chaque locus correspondant comporte de multiples allèles. De nombreux membres de ces familles participent au métabolisme lipidique normal, y compris la synthèse des hormones stéroïdes et l'oxydation des acides gras. Pour la détoxification des molécules étrangères, il y a pratiquement un cytochrome P-450 pour métaboliser chaque molécule étrangère à l'organisme. Ces enzymes sont inductibles à la fois par leur propre substrat ou par d'autres xénobiotiques. Des variations alléliques qui affectent l'activité catalytique d'un cytochrome P-450 pourront affecter le métabolisme d'un médicament particulier. D'une façon plus générale, les maladies hépatiques vont retentir sur l'élimination de nombreux médicaments et les prescriptions médicamenteuses seront prudentes chez ces malades. La tolérance pour des doses croissantes de médicaments (par exemple le phénobarbital) est une fonction directe de l'indicibilité qu'ils exercent sur les cytochromes P-450 chargés de les détoxifier.

Dans une deuxième phase des réactions de détoxification des xénobiotiques, les substances étrangères ou leurs métabolites sont conjugués à une molécule hydrophile s'ils ne sont pas spontanément éliminés dans l'eau. Ces conjugaisons, selon Trottier *et al.* (2005), peuvent avoir lieu avec l'acide glucuronique, avec un sulfate, la glycine, la glutamine ou le glutathion augmentent la solubilité dans l'eau mais entraînent aussi la perte de toutes fonctions biologiques ou toxiques pour les molécules étrangères. Ces produits neutralisent soit un groupement réactif thilol, amine, aldéhyde ou rendent le xénobiotique hydrophile afin de faciliter son élimination par l'organisme. Enfin, si le métabolite obtenu est très hydrophile, il devra être transporté à travers la membrane cellulaire par des protéines de phase III. Le métabolite ainsi produit pourra être éliminé dans la bile ou les urines, soit après le transport dans le sang ou la bile, être métabolisé de nouveau dans d'autres tissus possédant un autre spectre d'enzyme de métabolisme des Xénobiotiques (phase IV). Toutes les étapes ne sont pas

obligatoires, vu la spécificité du métabolisme de chaque xénobiotique. Les conséquences de ce métabolisme en termes de toxicologie dépendent de facteurs génétiques, environnementaux et physiologiques qui vont intervenir dans la susceptibilité individuelle aux xénobiotiques (Beaune, 1999).

# II. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du rein chez l'homme et les animaux

## 2.1 Morphologie du rein

Au nombre de deux, les reins sont placés systématiquement de chaque côté de la colonne vertébrale au niveau de la dernière vertèbre dorsale et des deux ou trois dernières vertèbres lombaires. Ils sont généralement entourés d'une épaisse couche de graisse. Ils sont simples et ressemblent à un haricot chez l'homme, le rat, le cheval, le mouton, la chèvre, le porc, le chien, le chat, le lapin. Ils sont lobulés chez le bœuf. Chez l'homme, il mesure 12 cm de haut et 6 cm de large et 3 à 4 cm d'épaisseur. Lorsqu'il est vide de sang, il pèse 140 à 150 gramme (sur le vivant et contient 50g de sang) (Sherwood, 2008). Il est coiffé par la capsule surrénale. Ce sont des organes rouges brun, allongés dans le sens vertical qui appartiennent à l'appareil excréteur.

## 2.2 Anatomie du rein

Le parenchyme rénal, disposé autour des premiers segments des voies excrétrices de l'urine c'est- à- dire les calices et les bassinets, est hétérogène. L'examen de la coupe frontale de rein parallèle aux faces de l'organe permet en effet de lui reconnaître une zone corticale de coloration foncée et une zone médullaire plus claire (Larrat *et al.,* 1971).

## 2.3 Organisation anatomique du rein

On distingue deux zones :

- **La zone corticale du rein**

Elle occupe tout l'espace délimité par les bases des pyramides de Malpighi et les extrémités des colonnes de Bertin d'une part et par la capsule du rein d'autre part. Elle est parcourue par les formations pyramidales, étroites et hautes qui se détachent de la base des pyramides de Malpighi et dont le sommet est dirigé vers la capsule du rein ; il s'agit des pyramides de Ferrein ou rayons médullaires de Ludwig. On reconnaît à l'œil nu, la présence de corpuscules de Malpighi qui sont disséminés dans la zone corticale et qui lui donnent un

aspect granuleux. Le corpuscule de Malpighi du rein est désigné aussi glomérule de Malpighi ou glomérule vasculaire.

- **La zone médullaire du rein**

Selon Kardong (2002), la zone médullaire du rein apparaît occupée par des formations grossièrement triangulaires, correspondant à la coupe d'unités anatomiques au nombre de six à neuf ; il s'agit des pyramides de Malpighi. Chaque pyramide de Malpighi possède une base tournée vers la surface du rein et un sommet ou papille qui fait saillie dans la lumière d'un petit calice. Cette papille est perforée par plusieurs orifices où s'abouchent les canaux collecteurs des néphrons ; on l'a désignée sous le nom d'*area cribosa*. Les pyramides de Malpighi sont séparées les unes des autres par du parenchyme rénal (figures 8, 9, 10).

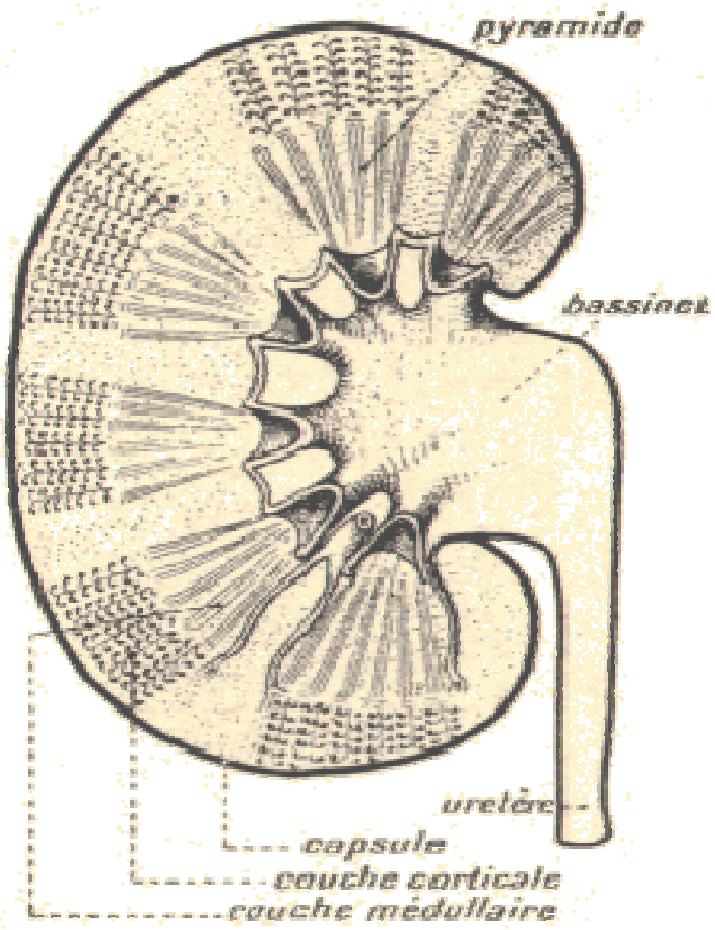



**Figure 8: Coupe longitudinale d'un rein**

***Source* :** *Kardong, 2002*

**L'unité anatomique du rein : le néphron**

Le parenchyme rénal est constitué par des unités anatomiques et fonctionnelles élémentaires appelées néphrons. Les néphrons sont drainés vers l'*area cribosa* par des tubes collecteurs. L'ensemble du néphron et du système des tubes collecteurs dans lequel il s'abouche est désigné sous le nom de tube urinaire ou encore tube urinifère.

Le néphron est l'unité structurale et fonctionnelle du rein ; il n'est visible qu'au microscope. La majeure partie du néphron se trouve dans le cortex rénal. Chaque néphron est composé :

- d'une partie vasculaire (artériole afférente et efférente, capillaires glomérulaires et capillaires péritubulaires),
- d'une partie rénale (capsule glomérulaire et tubules rénaux).

Au plan topographique, chaque néphron comprend :

- le corpuscule de Malpighi ou glomérule,
- le tube proximal,
- le tube intermédiaire,
- le tube distal.

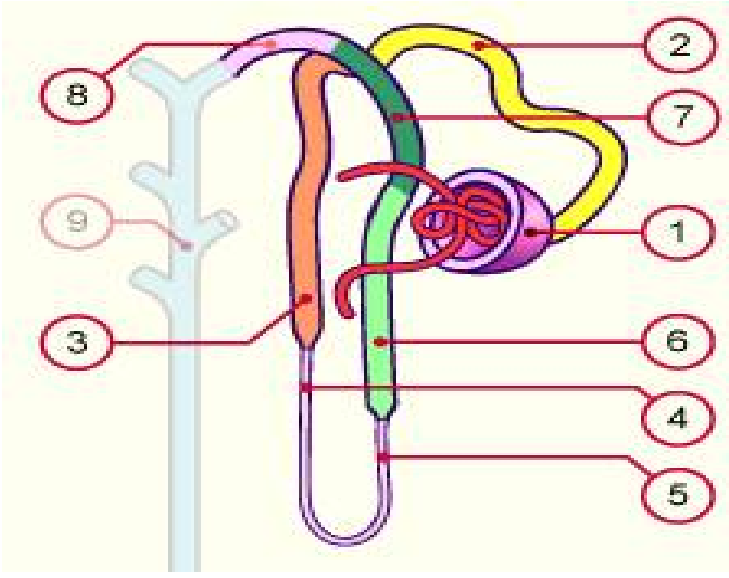



**Figure 9 : Structure d'un néphron**

***Source :*** *Kardong, 2002*
1 : corpuscule rénal, 2 : tube contourné proximal, 3 : tube droit proximal, 4 : partie descendante du tube intermédiaire, 5 : partie ascendante du tube intermédiaire, 6 : tube droit distal, 7 : tube contourné distal, 8 : segment d'union, 9 : tube collecteur.

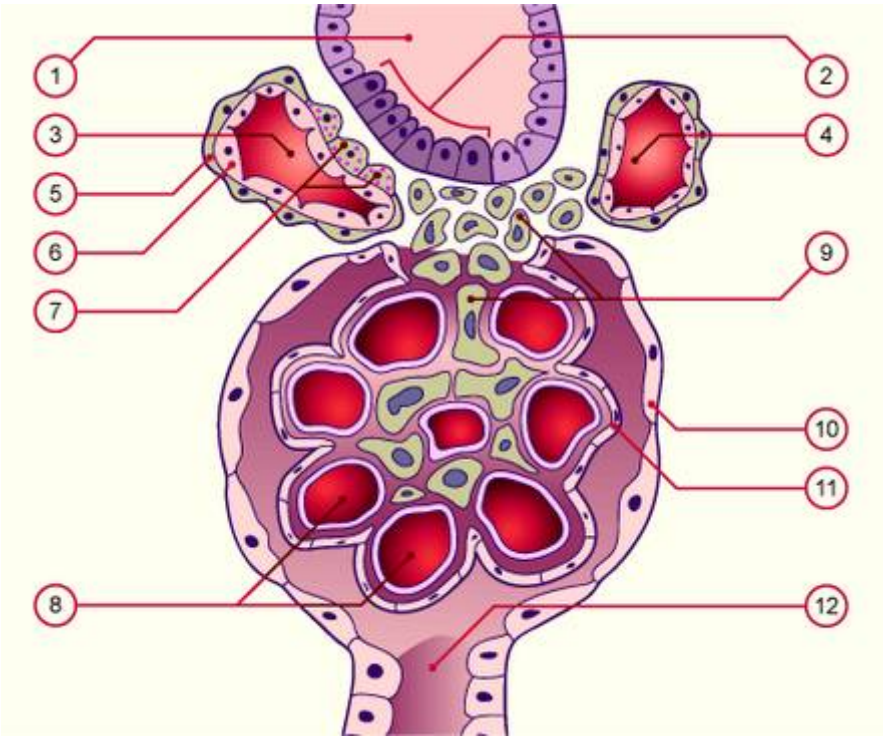



**Figure 10: Corpuscule de Malpighi**

***Source :*** Kardong, 2002

1 : tube droit distal, 2 : macula densa, 3 : artériole afférente, 4 : artériole efférente, 5 : cellules musculaires, 6 : endothélium, 7 : cellules juxtaglomérulaires, 8 : capillaires glomérulaires, 9 : cellules mésangiales, 10 : capsule de Bowman feuillet pariétal, 11: capsule de Bowman feuillet viscéral, 12 : tube contourné proximal.

## 2.4 Physiologie rénale

Les reins assurent des fonctions émonctoires et des fonctions endocriniennes.

### 2.4.1 Fonctions émonctoires

Elles permettent d'assurer le maintien de la constance des caractères physico-chimiques du milieu intérieur des organismes vivants. Chez les vertébrés, c'est le rein qui joue ce rôle. L'unité physiologique du rein est le néphron. Au niveau du glomérule vasculaire, le sang est filtré et l'ultra-filtrat glomérulaire ou urine primitive ainsi obtenue est acheminée vers l'extérieur. Tout au long de son passage dans la partie tubulaire du néphron, cet ultra-filtrat est modifié ; la plus grande partie de l'eau, une partie des ions, de certaines molécules qui le constituent sont résorbés et repassent dans le sang ; certaines substances sont, au contraire, sécrétées dans l'ultra-filtrat (McGeown, 2003).

A ces trois processus physiologiques fondamentaux c'est-à-dire la filtration, la réabsorption et la sécrétion correspondent à des structures histologiques hautement différenciées. Lorsque ces remaniements sont terminés, l'urine primitive devenue urine définitive, est rejetée à l'extérieur grâce à un système de canaux collecteurs, les uns intra-rénaux, les autres extra-rénaux. Le rein n'est pas seulement un organe excréteur, il est la source de plusieurs substances hormonales.

### 2.4.2 Fonction endocriniennes

Le rein est le siège de l'élaboration de substances hormonales telles que la rénine, l'érythropoïétine, les prostaglandines et éventuellement la somatomédine B (McGeown, 2003).

## III. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du cerveau chez l'homme et les animaux

### 3.1 Morphologie du cerveau

Le cerveau est l'étage le plus élevé dans la hiérarchie fonctionnelle du système nerveux central. Il est spécialement développé chez l'homme. Son poids moyen est de 1400 à 1800 grammes environ. Il est placé dans la boîte crânienne où il repose sur la base du crâne et il est recouvert par la voûte. Il a la forme générale d'un ovoïde à grand axe antéro-postérieur. Le cerveau est composé de deux hémisphères séparés par un profond sillon médian (fissure longitudinale du cerveau, anciennement : scissure inter - hémisphérique) et reliés entre eux par des ponts de tissu nerveux (les commissures inter-hémisphériques). La surface des hémisphères est constituée d'un "manteau" (pallium) de substance grise très plissée. Cette substance grise périphérique et superficielle constitue l'écorce cérébrale ou cortex. Elle présente de nombreux plis dont les plus profonds et les plus constants s'appellent sillons.

### 3.2 Anatomie du cerveau

Le cerveau est de loin la partie la plus volumineuse de l'encéphale ; il est fait de deux moitiés, les hémisphères cérébraux droit et gauche qui sont réunis par le corps calleux, une formation épaisse par où passent environ 300 milions d'axones allant d'un hémisphère à l'autre. Le corps calleux est une « autoroute de l'information ». Les deux hémisphères échangent et coopèrent en permanence grâce à cette voie de communication. Chaque hémisphère est constitué par une coquille périphérique de substance grise, le cortex cérébral, enveloppant la masse épaisse de la substance blanche. Dans la profondeur de la substance blanche est située une autre région de substance grise qui forme les noyaux gris centraux.

Dans tout le système nerveux central, la substance grise est essentiellement constituée par de denses amas de corps cellulaires avec leurs dendrites et aussi par de nombreuses cellules gliales. La substance blanche est faite de faisceaux d'axones myélinisés et sa couleur est due aux graisses (lipides) de la myéline (Sherwood, 2008).

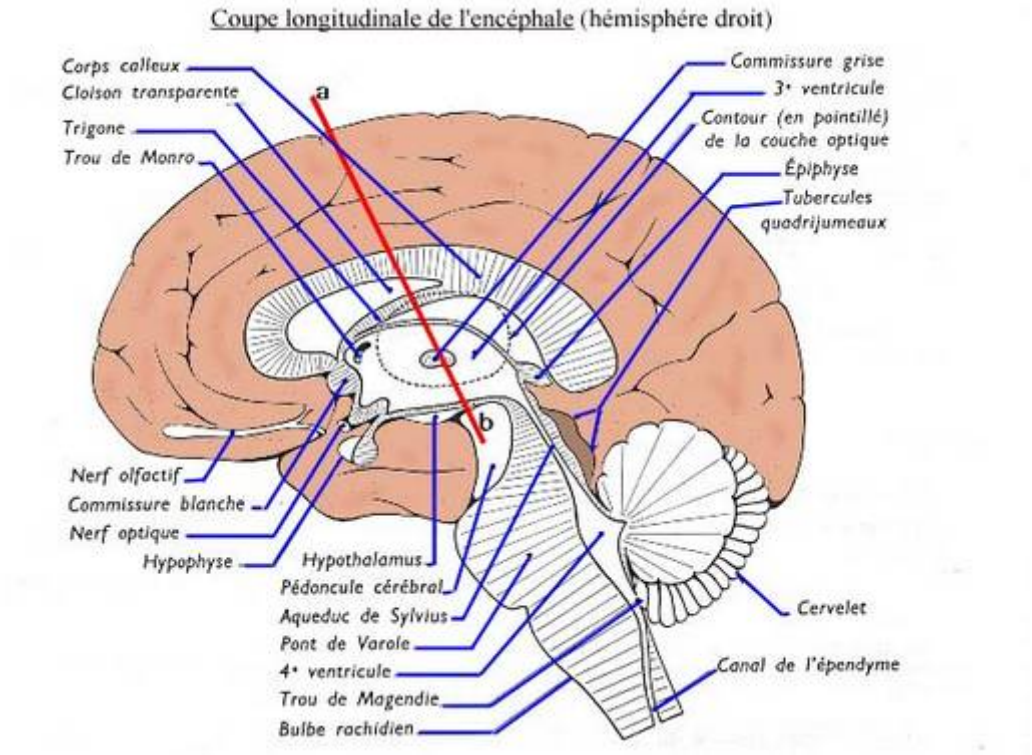



**Figure 11: Coupe longitidunale de l'encéphale (hémisphère droit)**

***Source*** : http://www.medecine-et-sante.com/anatomie.html consulté le 5 novembre 2012 à 13 heures

Le cortex cérébral est la couche périphérique de substance grise qui entoure la substance blanche sous jacente ; la substance blanche est constituée par des fibres nerveuses qui relient le cortex à d'autres régions. Le cortex lui-même est fait essentiellement de corps cellulaires, de dendrites, de neurones et de cellules gliales.

### 3.3 Organisation anatomique et physiologie du cerveau

Aucune région du cerveau n'agit indépendamment des autres et le cerveau est organisé en réseaux de neurones situés dans des régions précises et responsables de taches particulières. Chaque région reçoit et émet des messages qui dépendent d'interactions avec de nombreuses autres régions. Les repères anatomiques de la cartographie du cortex sont des replis profonds qui divisent chaque hémisphère en quatre lobes principaux : occipital, temporal, pariétal et frontal (figure 12).

- Les lobes occipitaux, situés en arrière (au dos de la tête), sont responsables du traitement initial des messages visuels.
- Les lobes temporaux, situés latéralement (sur le coté de la tête) sont responsables du traitement initial des messages sonores.

Les lobes pariétaux et les lobes frontaux forment la partie supérieure du cerveau et sont séparés par un repli profond, le sillon central qui descend presque verticalement à la partie moyenne de la face latérale de chaque hémisphère. De chaque côté de lobe pariétal est en arrière du sillon central et le lobe frontal en avant de lui.

- Les lobes pariétaux ont essentiellement pour rôle de recevoir et de traiter les messages sensoriels.
- Les lobes frontaux ont trois fonctions principales : activité motrice volontaire ; capacité langagière ; élaboration de la pensée.

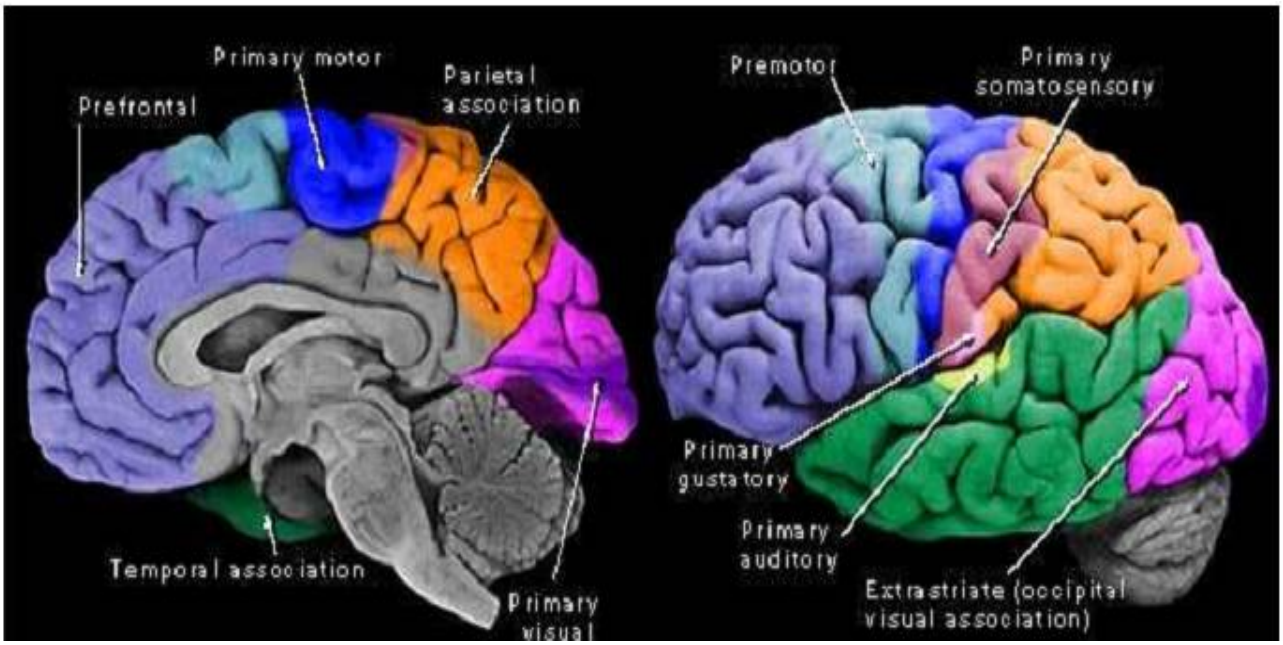



**Figure 12** : Principales structures cérébrales humaines
***Source :*** *Rosenzweig, Leimam et Breedlove (1999).*

Le lobe frontal inclut le préfrontal (violet) et l'aire prémotrice (Bleu ciel). Le lobe pariétal inclut inclut l'aire motrice (bleu), l'aire somatosensorielle (beige) et l'aire associative (orange). Le lobe temporal est indiqué en vert et le lobe occipital en mauve.

# Chapitre 3 : Notion de radicaux libres, de stress oxydant et mécanisme de défense

## I. Notion de radicaux libres et de stress oxydant

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour apparier son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule. L'$O_2$ est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leur orbitale externe deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en $O_2$•- puis en $H_2O_2$. Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species : ROS) encore appelé formes actives de l'oxygène (FAO).

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : anion superoxyde (O2•-), radical hydroxyle (OH•) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$).

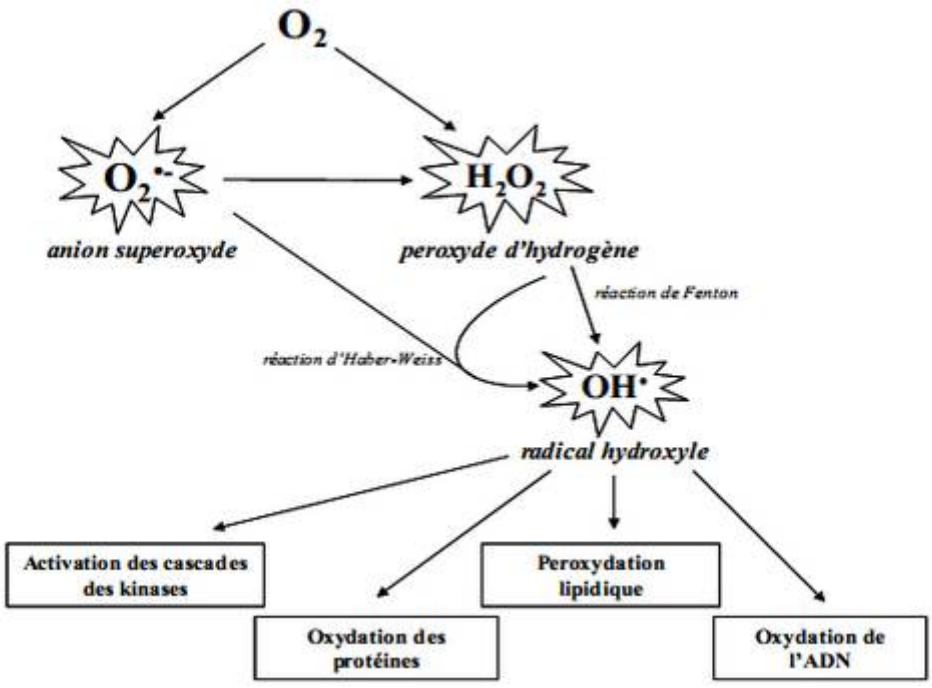



**Figure 13: Schéma des différentes formes de ROS**
***Source*** : *Garait, 2006*

L'OH•, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN…) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L'OH• apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (Gutteridge, 1993).

Les ROS sont générées sous l'effet d'oxydants environnementaux. En effet, la vie moderne nous confronte à la pollution de l'air, de l'eau, des substances étrangères au corps se trouvant dans l'alimentation (colorants synthétiques, métaux lourds...), l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition prolongée à la radiation (lumière solaire, radioactivité …) et au tabagisme qui sont d'autant de situations qui provoquent une surproduction de ROS dans notre organisme. Ceci conduit à un affaiblissement de nos défenses antioxydantes (vitamines, oligo-éléments) mais également à l'apparition de dégâts cellulaires. La situation se complique car l'alimentation actuelle n'est plus suffisamment saine et équilibrée et de ce fait nous apporte de moins en moins d'antioxydants naturels nécessaires pour contrôler les effets nocifs de l'oxygène.

La production de ROS, lorsqu'elle n'est plus contrôlée par les défenses antioxydantes, entraîne de nombreuses perturbations : c'est le stress oxydant.

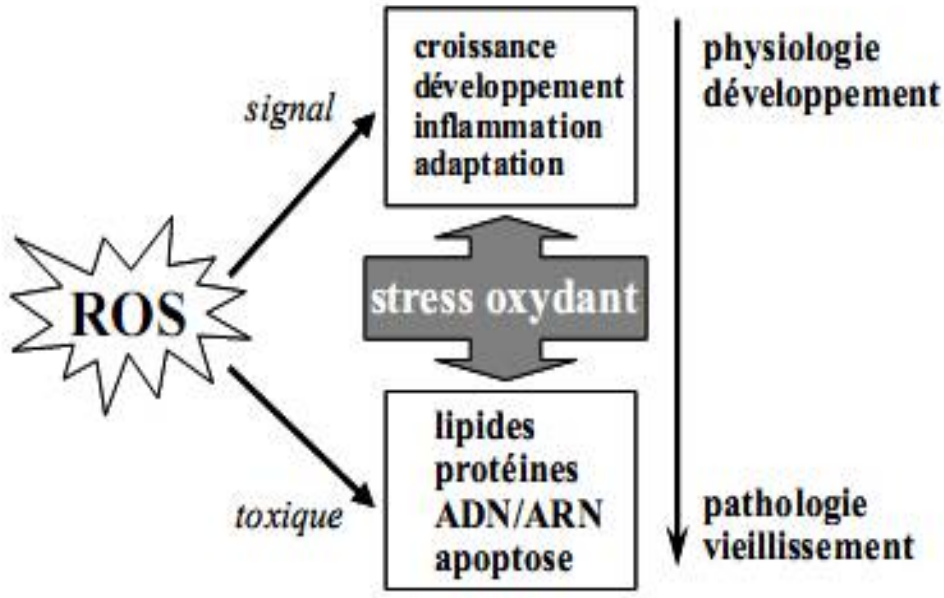



**Figure 14: Schéma du stress oxydant**

***Source*** : *Garait, 2006*

De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (figure 15).

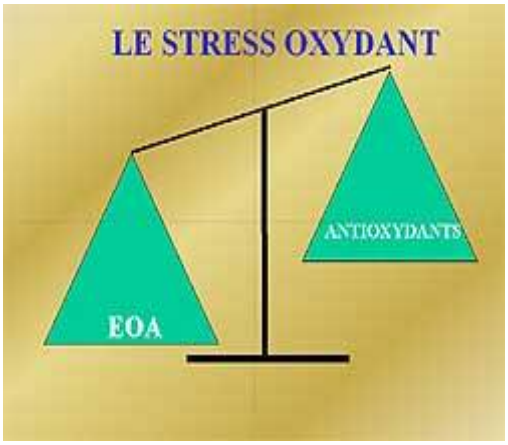



**Figure 15: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants**

***Source** : Garait, 2006*

**Dégâts cellulaires**

Les dommages induits par les ROS sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transistion de perméabilité.

**Peroxydation lipidique**

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbert, 2005; Pamplona *et al.*, 2000). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong *et al.,* 2004). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde, les acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonenal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer

directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS (Echtay *et al.,* 2003). Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production de ROS.

**Oxydation des proteines**

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyl dans la protéine (Levine, 2002 ; Peng *et al.,* 2000). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le $Cu^{2+}$ et le $Fe^{2+}$, peuvent être classées en deux catégories : 1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique, 2°) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases…) (Levine, 2002). L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cytoprotecteur (Welch, 1992). Ainsi, les membres de la famille de $HSP_{70}$ ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig et Nosek, 1997).

**Dommage de l'ADN**

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, ces organites sont les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter *et al.,* 1988). Les mécanismes explicatifs proposés sont : 1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, 2°) sa localisation proche de la membrane interne, 3°) des mécanismes de réparations frustres, et 4°) une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (Ames *et al.,* 1993 ; Cann et Wilson, 1983 ; Cortopassi *et al.,* 1992 ; Richter *et al.,* 1988). L'idée d'un "cercle vicieux" ou d'une théorie avec un feed-back positif est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dues au vieillissement :

des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de ROS et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (Beckman et Ames, 1998 ; Wong et Cortopassi, 1997).

## II. Mécanismes de défense contre le stress oxydant : systèmes anti-oxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Dröge, 2002 ; Mate *et al.,* 1999 ; Packer *et al.,* 1997 ; Powers et Lennon, 1999).

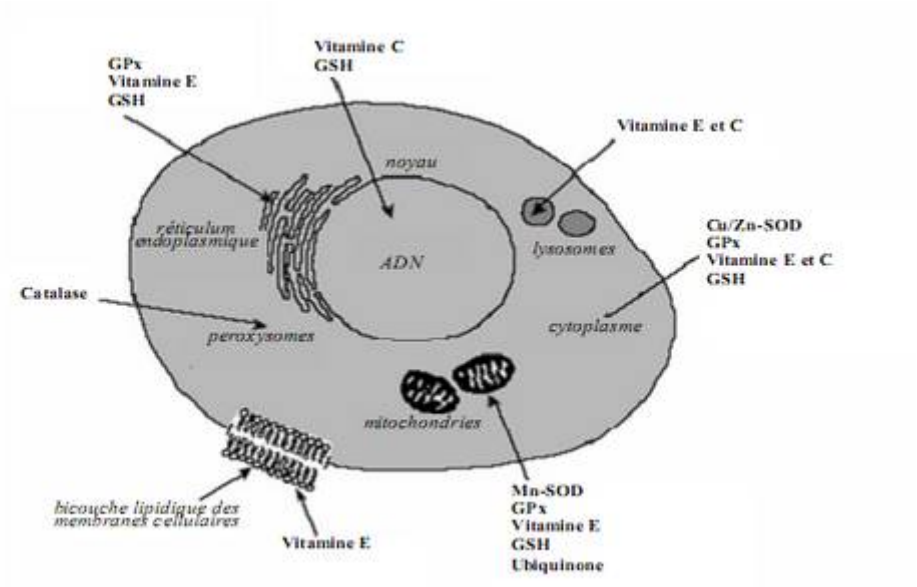



**Figure 16: Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule**
(Mn-SOD) : superoxyde dismutase mitochondriale, (Cu/Zn-SOD) : superoxyde dismutase cytosolique, (GPx) : glutathion peroxydase, (GSH) : glutathion réduit.

***Source :*** *Packer et al., 1997*

**Systèmes antioxydants enzymatiques**

Les antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS.

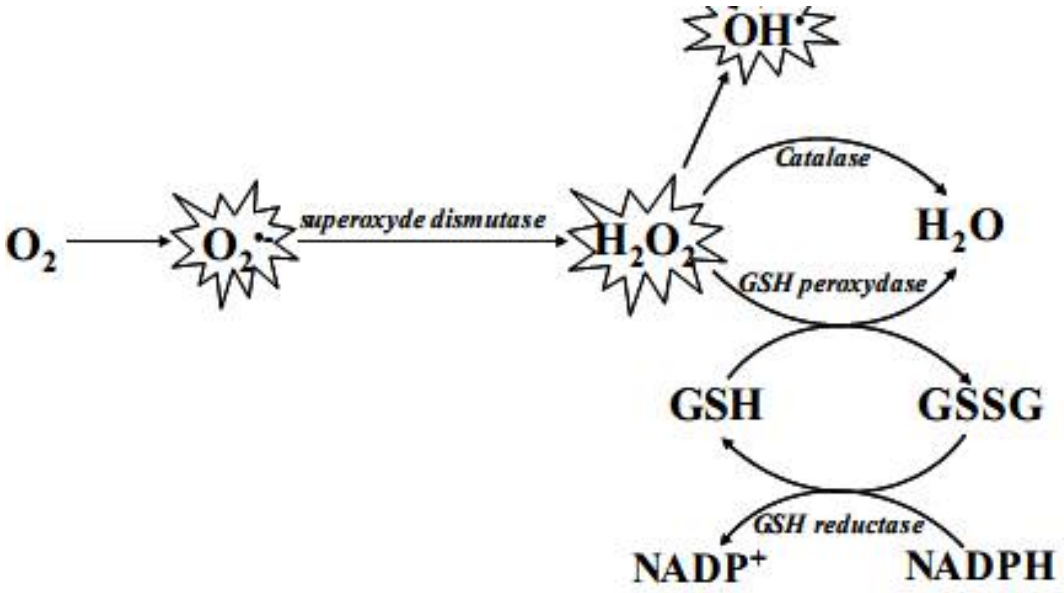



**Figure 17: Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques**
***Source :*** *Packer et al., 1997*

- **Le gluthation**

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. De formule γ-L-Glutamyl-L-cystéiny-L-glycine, de masse moléculaire de 307 Da, il est le principal composé thiol de faible masse moléculaire présent au niveau cellulaire. Sa concentration molaire est voisine de $10^{-3}$ M dans la plupart des types cellulaires (Siess *et al.,* 2000). Il est à noter que le groupement amine de la cystéine se condense avec la fonction acide carboxylique en γ de l'acide glutamique. Pratiquement toutes les cellules en contiennent une concentration élevée. On le représente de manière simplifiée par GSH (forme réduite) ou GSSG (forme oxydée), la fonction thiol lui conférant ses principales propriétés biochimiques.

Richman et Meister en 1975 ont montré que le glutathion participait au cycle γ-glutamyl, qui permet l'entrée ATP-dépendante des acides aminés dans les cellules grâce à la synthèse et à la dégradation de GSH.

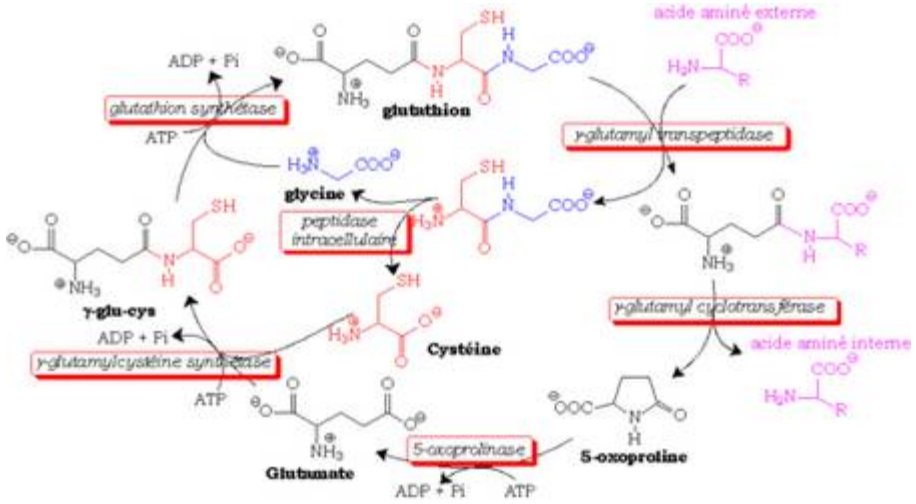



**Figure 18: Cycle γ-glutamyl**

***Source* :** Richman et Meister, 1975

Le glutathion joue un rôle majeur dans les défenses antioxydantes de l'organisme et la détoxification (Baker *et al.,* 1990). Il réagit spontanément avec les radicaux hydroxyles produits par la réaction de Fenton, ainsi qu'avec le peroxynitrite produit lors de la réaction entre le monoxyde d'azote (NO) et l'oxygène ou l'anion superoxyde (Griffith, 1999). Sa réactivité vis-à-vis des molécules est due principalement à son résidu thiol cystéinique (Dickinson *et al.,* 2004). Il contribue également aux réactions enzymatiques antioxydantes, catalysées par les différentes isoformes de la glutathion peroxydase. La glutathion peroxydase agit de concert avec la catalase et la superoxyde dismutase pour protéger l'organisme des effets délétères des espèces réactives de l'oxygène qu'elle neutralise, et élimine les peroxydes. L'élimination des peroxydes par la glutathion peroxydase produit du glutathion oxydé, qui peut être recyclé sous l'action de la glutathion réductase ou exporté et éliminé par le rein. Lors des réactions catalysées par la glutathion-S-tranférase, le glutathion réagit avec divers composés électrophiles et xénobiotiques pour produire des sulfures de glutathion chimiquement stables qui sont ensuite catabolisés, ce qui permet la récupération des résidus glycine et glutamate. Le produit final, appelé acide mercapturique, est éliminé dans l'urine, entraînant une perte nette de cystéine (Pastore *et al.,* 2003). Enfin, le recyclage du glutathion est impliqué dans la régénération de la forme réduite

d'autres antioxydants impliqués dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène, tels que les tocophérols ou l'acide ascorbique (Sen et Packer, 2000).

**Un antioxydant majeur**

Le glutathion est le principal antioxydant hydrosoluble du cytosol (l'intérieur aqueux des cellules) et participe directement à la destruction des composés oxygénés réactifs. Les deux principaux mécanismes antioxydants du glutathion reposent sur sa capacité à détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres organoperoxydases ainsi qu'à défendre l'intérieur même des cellules contre l'oxydation par un phénomène redox. Il n'est pas seulement un puissant antioxydant mais joue aussi un rôle clé dans le réseau antioxydant en recyclant les formes oxydées de vitamine C, restaurant ainsi son pouvoir antioxydant.

Le glutathion joue un rôle majeur dans la défense de l'organisme contre les polluants. Le foie est l'organe le plus fortement impliqué dans la détoxification des xénobiotiques. C'est aussi le plus important centre de stockage de glutathion qui atteint ses concentrations intracellulaires les plus élevées dans les cellules parenchymales (hépatocytes) du foie en bonne santé. Les hépatocytes sont hautement spécialisées dans la synthèse du glutathion à partir de ses précurseurs et du recyclage de sa forme oxydée tout comme dans son utilisation contre des substances potentiellement toxiques.

Des études ont montré que de faibles niveaux de glutathion sont synonymes d'un fonctionnement du foie affaibli avec, pour résultat, une augmentation des quantités de toxines qui circulent dans l'organisme, endommageant cellules et organes.

Le glutathion est impliqué dans la détoxification parce qu'il se lie à des toxines comme les métaux lourds, les solvants et les pesticides et les transforme en composés hydrosolubles susceptibles d'être facilement éliminés dans la bile ou les urines. Le glutathion est important pour avoir un système immunitaire puissant. En augmentant ses niveaux, il est possible d'inverser l'effondrement lié à l'âge qui se produit dans la fonction immunitaire. Des niveaux élevés de glutathion permettent à notre organisme de produire davantage de globules blancs qui constituent la première ligne de défense du système immunitaire. Notre apport en glutathion diminue avec les années.

**Glutathion et déficiences hépatiques**

On a suggéré qu'une diminution des niveaux de glutathion représentait un facteur contributif important aux lésions du foie et qu'elle renforçait la morbidité liée à un mauvais

fonctionnement hépatique. Dans une étude, des concentrations plasmatiques anormales de glutathion ont été observées chez des patients souffrant de cirrhose, indépendamment de leur alimentation.

Le cerveau est vulnérable aux attaques radicalaires. Il est fortement oxygéné, ce qui le rend sensible à la production endogène de radicaux oxygénés. Il contient également une forte proportion d'acides gras insaturés sensibles à la peroxydation. Dans le cerveau, le plus important neutraliseur de radicaux libres est le glutathion. Ses niveaux sont faibles chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Des études ont montré que la perte de glutathion qui se manifeste avec le vieillissement dans les neurones dopaminergiques peut apporter différentes modifications dans les cellules. Ces modifications, combinées à l'oxydation de la dopamine, semblent hâter la mort cellulaire et faire avancer la progression de la maladie de Parkinson. Les chercheurs ont démontré l'existence d'un manque de glutathion dans des cristallins cataractés, indiquant que c'est un facteur hâtant la formation de la cataracte sénile. Le glutathion et son enzyme, la glutathion peroxydase, agissent comme de puissants antioxydants pour protéger la transparence du cristallin en stoppant ou/et réparant les dommages cellulaires causés par les radicaux libres. Des données expérimentales montrent que la prise d'un concentré de protéines de petit lait contenant de fortes concentrations de cystéine/cystine peut apporter au cristallin un complément de glutathion et retarder le développement de la cataracte voire, prévenir son développement. Sous forme de suppléments nutritionnels, le glutathion semble être efficacement absorbé par les rats. Cependant, la même chose n'est pas forcément vraie chez l'homme. Ainsi, lorsque l'on donne en une seule fois une dose de 3 000 mg de glutathion à sept sujets en bonne santé, les niveaux de glutathion sanguins n'augmentent pas. L'absorption du glutathion est peut-être meilleure chez les rats parce que le système intestinal de l'homme, à la différence de celui de ces rongeurs, contient des quantités importantes d'une enzyme (gamma-glutamyltranspeptidase) qui décompose le glutathion. Des données préliminaires ont suggéré que l'absorption pouvait se faire dans la bouche lorsque des tablettes de glutathion étaient placées entre les dents et l'intérieur de la joue. Certains chercheurs pensent que d'autres suppléments peuvent augmenter plus efficacement les niveaux sanguins de glutathion. Par exemple, dans un essai, les niveaux de glutathion ont été augmentés de près de 50% chez des sujets en bonne santé prenant 500 mg de vitamine C quotidiennement pendant seulement deux semaines. La vitamine C augmente le glutathion en aidant le corps à le fabriquer. D'autres nutriments et, notamment, l'acide alpha-lipoïque, la glutamine, la méthionine, les protéines de petit lait, la cystéine ou la mélatonine

concourent également à augmenter les niveaux de glutathion. La vitamine B6, la riboflavine et le sélénium sont indispensables pour que l'organisme puisse fabriquer du glutathion. Les mécanismes par lesquels ces nutriments augmentent efficacement les niveaux de glutathion chez l'homme restent cependant peu expliqués. Le glutathion est synthétisé à partir de L-glutamate, de L-cystéine et de L-glycine. La disponibilité de la L-cystéine peut être considérée comme un facteur limitant la production interne de glutathion. L'acide aminé cystéine libre n'est cependant pas le meilleur moyen de l'apporter au système cellulaire. Potentiellement toxique, il est spontanément détruit dans le système gastro-intestinal et le plasma sanguin. Par contre, absorbé sous forme de cystine (deux molécules de cystéines unies par un lien disulfide), il voyage en toute sécurité à travers le système gastro-intestinal et le plasma sanguin est rapidement réduit en deux molécules de cystéine à l'entrée des cellules.

Des études récentes ont montré que, lorsque l'on ajoute de l'acide alpha-lipoïque à différents types de cellules humaines ou animales en culture, les niveaux de glutathion cellulaires augmentent de 30 à 70%. Lorsque l'on injecte quotidiennement pendant 11 jours des doses variables d'acide alpha-lipoïque dans des cellules de poumons, de foies ou de reins de souris, les niveaux de glutathion augmentent très nettement.

**Les antioxydants non-enzymatiques : les vitamines (E, C)**

Une vitamine est une substance organique nécessaire au métabolisme de l'homme. Les vitamines sont des compléments indispensables aux échanges vitaux. Le terme «vitamine » vient du latin « vita » qui signifie vie et du suffixe amine qui est le nom d'un radical en chimie. C'est une molécule organique, un coenzyme, qui renferme un ou plusieurs radicaux indispensables à la synthèse d'une enzyme ou d'une hormone. L'organisme n'étant pas capable de les synthétiser, ou en quantité insuffisante, elles doivent être apportées régulièrement et en quantité suffisante par l'alimentation et/ou la supplémentation.

Les vitamines E (α-tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importantes dans la lutte contre le stress oxydant.

La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Evans, 2000 ; Packer *et al.,* 1997).

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l'$O_2$•- et l'OH•. Elle peut aussi réduire le radical

α-tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Evans, 2000; Packer *et al.,* 1997).

- **L'antioxydant considéré dans l'étude : Vitamine C**

Le biochimiste hongrois Szent-Györgyi découvre la vitamine C (C1), vers 1933, à la suite de nombreux travaux sur le suc de végétaux et la glande surrénale. Contrairement à toutes les espèces animales, l'homme n'est pas en mesure de la produire donc il est obligé de se refournir à l'extérieur. La vitamine C se trouve à l'état naturel dans beaucoup de fruits et légumes (Basdevant *et al.,* 2001 ; Delattre *et al.,* 2005 ).

**Tableau VI : Teneurs en vitamine C de certains fruits et légumes en mg/kg de matière fraîche (MF)**

| Fruit/légume | Teneur en vitamine C (mg/kg MF) |
|---|---|
| Acerola | 13000 |
| Avocat | 150-200 |
| Brocoli | 1130 |
| Camu-camu | 20000-30000 |
| Carotte | 60 |
| Cassis | 2000-2100 |
| Chou-fleur | 640-780 |
| Citron | 500 |
| Cynorhodon | 10000 |
| Epinard | 510 |
| Goyave | 2300-3000 |
| Kiwi | 600 |
| Laitue | 150 |
| Melon | 100-350 |
| Orange | 500 |
| Pêche | 70-310 |
| Pomme | 20-100 |
| Pomme de terre | 100-300 |
| Tomate moyenne | 200-250 |

***Source :*** *Davey et al., 2000 ; Alves et al., 2002*

**Structure de la vitamine C**

La vitamine C est un acide organique dont la structure est apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone (formule chimique $C_6H_8O_6$). Dans la plante, l'acide ascorbique est principalement présent sous sa base conjuguée : L-Ascorbate (figure 19). L'ascorbate ou l'acide ascorbique constitue la forme réduite de la vitamine C. Par ailleurs, l'ascorbate peut être oxydé en monodéhydroascorbate (MDHA) qui se dissocie rapidement de nouveau en ascorbate et en déhydroascorbate (DHA) ; le DHA est ensuite dégradé ou de nouveau réduit

(Davey *et al.,* 2000, Horemans *et al.,* 2000).

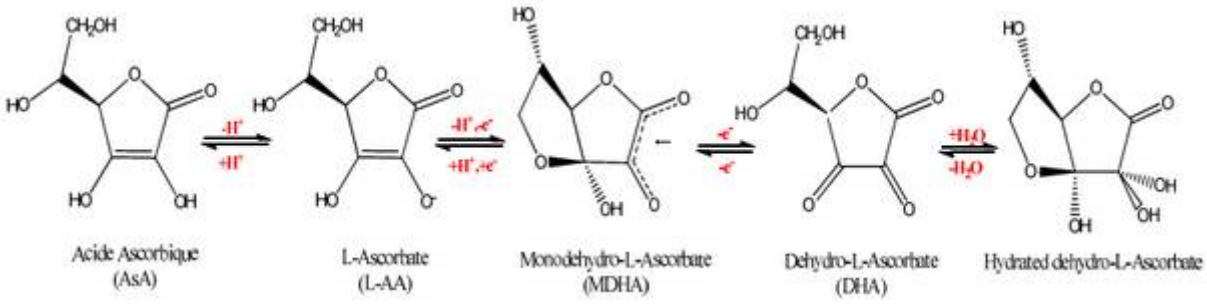



**Figure 19: Structure chimique de l'Acide Ascorbique, du L-Ascorbate, du monodéshydro-L-Ascorbate, du déhydro-L-Ascorbate et du déhydro-L-ascorbate hydraté**

Représentation de Cram : liaison dans le plan ——, liaison vers l'arrière ····· et liaison vers l'avant ◄

***Source :*** *Potters et al., 2002*

**Variabilité de la vitamine C dans la cellule**

Dans la cellule végétale, la vitamine C est présente dans tous les compartiments cellulaires (cytosol, chloroplastes, mitochondries, vacuole et apoplasme) (Horemans *et al.,* 2000) mais à différentes concentrations (Figure 20). La vitamine C s'accumule de manière importante dans les chloroplastes où elle peut atteindre 30-40% de la quantité totale de vitamine C de la feuille (Foyer, 1993). Des quantités considérables ont aussi été mesurées dans l'apoplasme (Vanacker *et al.,* 1998), le cytosol et la vacuole (Rautenkranz et *al.,* 1994). Ces fortes accumulations sont en relation avec le rôle de l'ascorbate dans la détoxication des espèces réactives de l'oxygène produites par le métabolisme cellulaire (Potters *et al.,* 2002). Dans le cytoplasme, la vitamine C est largement sous forme réduite sauf si les conditions entraînent un stress oxydatif.

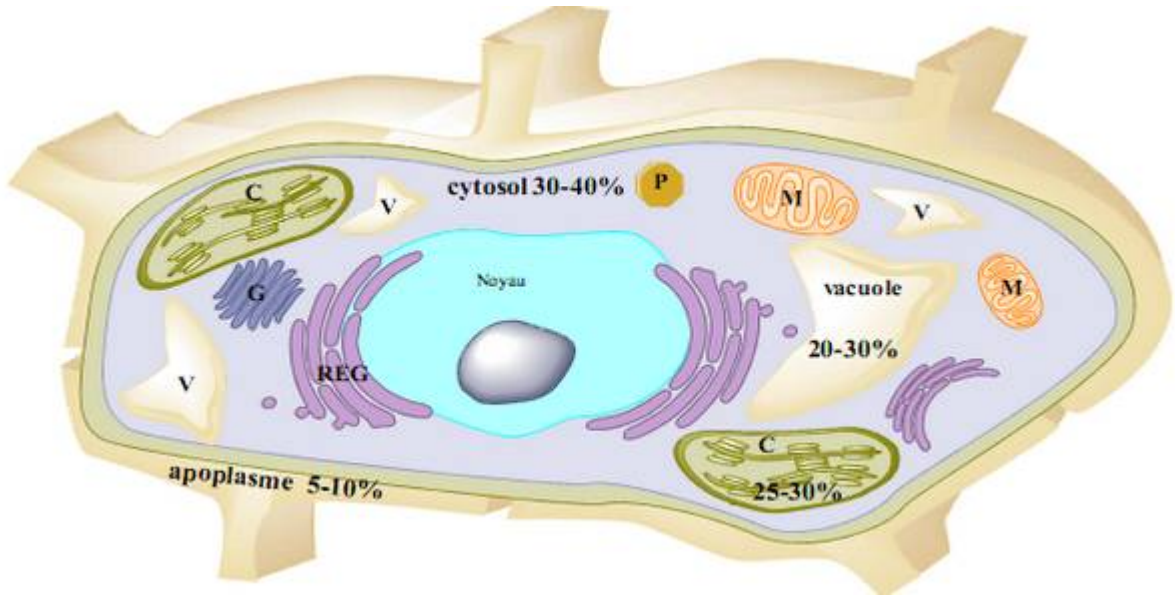



**Figure 20: Cellule végétale avec ces différents compartiments et organites**

(V, vacuole; M, mitochondrie; C, chloroplaste; P, peroxysome; REG, réticulum endoplasmique granuleux; G, appareil de Golgi). Les teneurs en ascorbate dans les différents compartiments sont exprimées en pourcentage. Comme il n'existe pas d'études sur la teneur en ascorbate dans les peroxysomes et la mitochondrie, leurs concentrations sont incluses dans celle du cytosol.

***Source :*** *Horemans et al., 2000*

**Role de la vitamine C**

L'ascorbate est un antioxydant majeur, capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène (FAO) ou (Reactive Oxygen Species : ROS). En effet, bien que l'oxygène soit indispensable à la vie, son utilisation s'accompagne de la formation d'intermédiaires radicalaires très réactifs. Au cours de l'évolution, l'adaptation des espèces vivantes à l'oxygène s'est traduite par l'apparition d'enzymes facilitant non seulement sa consommation, mais également la détoxication de ses intermédiaires très réactifs. Ces FAO comme le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$), l'anion superoxyde ($O_2^-$) et le radical hydroxyle ($HO^-$) sont nocifs. Ils sont générés dans l'organisme de façon plus importante sous l'effet d'oxydants environnementaux. Des quantités excessives de FAO conduisent à un état toxique appelé stress oxydatif. En effet, les FAO peuvent infliger de sérieux dommages à la cellule. Ils sont capables de détruire les protéines, dénaturer l'ADN, peroxyder les lipides et entraîner la mort cellulaire (Noctor et Foyer, 1998, Davey *et al.,* 2000, Potters *et al.,* 2002). L'anion superoxyde est faiblement réactif (Foyer et Noctor, 2009). Sa dismutation à l'aide de l'enzyme SOD (superoxyde dismutase) aboutit à la formation d'oxygène et de peroxyde

d'hydrogène (Foyer *et al.,* 1994) (Figure 21). Le peroxyde d'hydrogène est plus réactif et a une durée de vie plus longue. Il peut à son tour être soit sectionné au niveau de la liaison O-O et donner OH- soit détoxiqué par la catalase (CAT) dans les peroxysomes (Arrigoni et De Tullio, 2002). En plus des deux enzymes SOD et CAT, les FAO peuvent être neutralisées de façon non enzymatique par des molécules antioxydantes. Parmi les molécules antioxydantes permettant de réguler directement la concentration intracellulaire de FAO, l'ascorbate joue un rôle prédominant (Smirnoff, 2000, Conklin, 2001). Il réagit directement avec plusieurs FAO tels que OH-, $H_2O_2$ et $O_2$. (Padh, 1990, Shao *et al.,* 2008). Enfin, l'ascorbate participe également de façon indirecte aux mécanismes de détoxication enzymatique grâce à des enzymes antioxydantes comme l'ascorbate peroxydase (APX). Le peroxyde d'hydrogène peut être détoxiqué grâce à cette enzyme via le cycle Ascorbate/Glutathion (figure 22) (Davey *et al.*, 2000, Conklin, 2001). Ce cycle décrit pour la première fois en 1976 (Foyer et Halliwell, 1976) détaille la relation entre le glutathion, l'ascorbate et l'$H_2O_2$. L'APX utilise l'ascorbate comme donneur d'électrons pour réduire l'$H_2O_2$ en eau et produit du MDHA. Le MDHA est soit dissocié en ascorbate et DHA, soit réduit en ascorbate par la MDHAR. Le DHA peut être lui aussi réduit en ascorbate par la DHAR, une enzyme dépendante de l'oxydation du glutathion. Enfin, le glutathion oxydé (glutathion disulfide, GSSG) est de nouveau réduit en glutathion (GSH) par la glutathion réductase (GR). Ces réactions enzymatiques et non-enzymatiques forment le système de défense antioxydant (Foyer *et al.,* 1994).

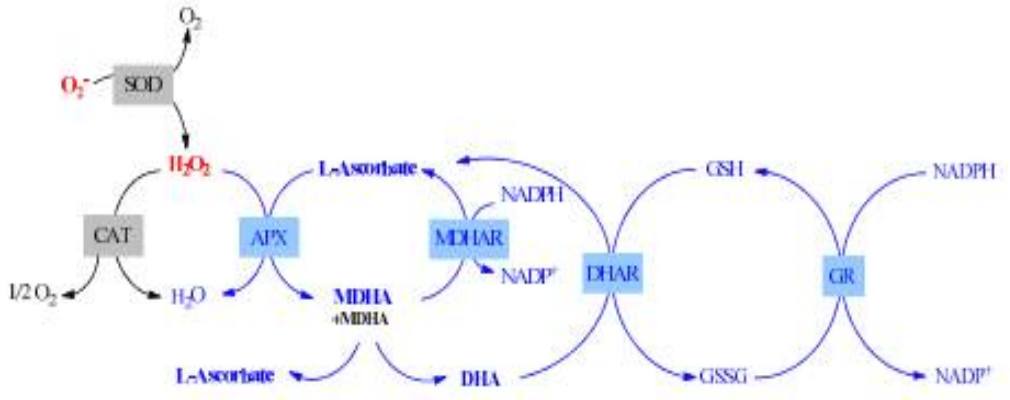



**Figure 21: Détoxication des formes actives de l'oxygène par le cycle ascorbate/glutathion** (en bleu) et l'action des enzymes SOD et CAT (en noir). Les enzymes impliquées sont : SOD, superoxyde dismutase ; CAT, catalase ; APX, ascorbate peroxydase ; MDHAR, monodéhydroascorbate réductase ; DHAR, déhydroascorbate réductase ; GR glutathion réductase.

***Source :*** *Foyer et Noctor, 2009*

La vitamine C étant un antioxydant, elle aide aussi à éliminer le cholestérol, elle désintoxique le foie, elle aide à réabsorber le fer, elle collabore pour la production hormonale et dans la synthèse de neurotransmission, dans la production de collagène (tissus connectifs), elle contrôle le niveau histaminique et la synthèse de la carnitine (élimination de graisse). Beaucoup d'études réalisées prouvent que la vitamine C prévient beaucoup de maladies ; elle a également des effets de guérison surprenants. Ognjanović *et al.* (2003) ont prouvé que le prétraitement avec les vitamines C et E montre le rôle protecteur sur les variations hématologiques induites par le cadmium. Des résultas similaires ont été obtenues par Fox *et al.,* 1971 et Suzuki et Yoshida, 1979 qui ont prouvé l'effet protecteur de la vitamine C sur l'anémie induit par les métaux lourds sur des rats. De même Moein *et al.,* 2011 a démontré l'effet protecteur de la vitamine C sur la qualité du sperme chez les truites.

La vitamine C est l'antioxydant le plus important dans notre corps. Elle capture les radicaux libres dans les zones aqueuses, dans les cellules et autour de celles-ci. La vitamine C assiste les autres antioxydants, capturant les radicaux libres aussi pour eux ; de cette façon, elle est en mesure d'aider le corps à diminuer l'emploi de la vitamine E et d'autres antioxydants. La vitamine C peut faciliter l'expulsion de métaux lourds toxiques par exemple le mercure, le cadmium et le plomb.

La vitamine C est connue pour ses propriétés antioxydantes. Cependant, dans certains cas elle exprime une activité pro-oxydante. S'agit-il d'un paradoxe ? En fait le mécanisme de cette action paradoxale est fonction à la fois de sa concentration et du pouvoir que possède l'acide ascorbique à réduire les métaux de transition. En présence de fer ferrique, la vitamine C développe une activité pro-oxydante conduisant à une augmentation des acides gras libres et des triglycérides. On mesure également une forte augmentation de l'activité de la -N-acétyl-D-glucosaminidase reflétant une lyse de la membrane lysosomiale avec libération des enzymes protéolytiques dans le cytoplasme et un retard de croissance (Chen *et al.,* 2000). Notons aussi que la vitamine C augmente la production de peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$) intra érythrocytaire et ceci de façon dose dépendante (Shalu, 1998). Dans ce cas précis, cette production toxique intra-globulaire résultant d'un excès de vitamine C est liée à l'inhibition de l'activité de la catalase érythrocytaire par les ions $Fe^{3+}$ situés dans les compartiments extracellulaires. Le $Fe^{3+}$ et les peroxydes oxydent l'acide ascorbique qui devient alors un facteur pro-oxydant. Cette action conjuguée du fer et de la vitamine C est normalement freinée par la vitamine E et le glutathion à condition que celui-ci reste sous la forme réduite

GSH. On sait que les métaux lourds bloquent l'activité du glutathion. Il reste vrai qu'un apport d'acide ascorbique décroît les risques d'oxydation, cependant dans certaines circonstances la vitamine C peut promouvoir des radicaux libres et la peroxydation lipidique. On a par exemple montré que des antioxydants, dont la vitamine C, sont actifs en phase préventive mais qu'ils accéléraient la phase de propagation du processus d'oxydation des LDL une fois celui-ci installé (Otero, 1997).

L'acide ascorbique, très sensible à la lumière et à la chaleur, s'oxyde facilement. Cependant un milieu acide a un effet protecteur, c'est pourquoi il est mieux conservé dans les citrus : citron, orange, pamplemousse et dans les fruits acides. Mais préparer les jus de légumes ou de fruits, découper, éplucher les légumes à l'avance, favorisent cette oxydation. Il est indispensable de consommer sous forme de crudités les légumes et plantes potagères ainsi que les fruits riches en acide ascorbique. Ainsi le jus d'un citron, ou une orange et une salade et quelques crudités peuvent couvrir les besoins quotidiens d'un sujet à l'hygiène de vie parfaite.

# *DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES*

Cette partie de la thèse a suivi deux étapes :

La première s'est appesantie sur l'approche méthodologique utilisée pour évaluer la pollution par les éléments traces métalliques (plomb, cadmium et mercure) à Ganvié et le risque d'exposition de la population.

La deuxième a développé la méthodologie du protocole animale utilisée pour étudier la toxicité des métaux (Cadmium et Mercure) sur les rats et pour évaluer l'effet protecteur de l'acide ascorbique « vitamine C ».

# Chapitre 1 : Approche méthodologique d'évaluation du risque d'exposition de la population de Ganvié aux ETM (Pb, Cd, Hg)

## I. Evaluation du degré de pollution par les ETM (plomb, cadmium et mercure)

### 1.1 Cadre d'étude

Le cadre d'étude est la cité lacustre de Ganvié située sur le lac Nokoué dans le Sud du Bénin. Il a été choisi compte tenu des principales sources de pollution (rejets d'ordures ménagères et résidus solides de tout genre, utilisation poussée des barques motorisées à essence, le trafic intense de l'essence par barque, le déversement de produits pétroliers dans le lac).

#### 1.1.1 Présentation du lac Nokoué

Situé dans la partie méridionale du Bénin, séparé de l'Océan Atlantique par le long et large cordon littoral sur lequel s'est bâtie la ville de Cotonou, le lac Nokoué couvre durant la saison sèche une superficie de quelques cent soixante kilomètres carrés. Celle-ci triple en période de crue, si l'on tient compte des vastes espaces de marais bordant le lac. Il est alimenté en eaux douces par la rivière Sô (qui se trouve dans la partie nord du lac) et est relié par le chenal de Cotonou à la mer située au sud du lac. L'influence de ces milieux confère aux eaux du lac un caractère saumâtre à la salinité variable selon les saisons. D'une superficie de 15 000 ha, il est compris entre les parallèles 6°70 et 6°60 Nord et les méridiens 2°40 et 2°30 Est. Ses rives sont marécageuses (AURORE, 2003). Il fait partie du site de RAMSAR 1018. Il abrite de nombreux villages lacustres dont les plus importants sont Sô-Tchanhoué, Sô-Ava et Ganvié.

#### 1.1.2 Présentation de la cité lacustre de Ganvié

##### 1.1.2.1 Situation géographique

La cité lacustre de Ganvié est située sur la rive Nord-Ouest du lac Nokoué, à l'exutoire Ouest de la rivière Sô dans le lac et à 11 Km de l'embarcadère d'Abomey – Calavi. Elle est limitée :

- au Nord par la localité de Sô-Ava, chef lieu de la Commune dont elle dépend administrativement ;
- au Nord-Est par le village lacustre de Vekky ;

- au Nord-Ouest par les eaux du lac (village proximal, Akassato) ;
- à l'Est par le village lacustre d'Aguégué ;
- au Sud par les eaux du lac (ville proximale, Cotonou).

Ganvié compte onze quartiers et villages dont les Arrondissements de Ganvié I et Ganvié II. Ganvié I regroupe cinq à savoir : Sokomey, Kpassikomey, Agonmekomey Agoundankomey et Towokomey, tous inondés pendant la période de crue mais en période de décrue, seuls les quartiers de Sokomey et de Kpassikomey ne le sont plus et se présentent sous forme de terres fermes. Ganvié II comporte six : Agbongamey, Ahouanmongamou, Dakomey, Dossou-Gao, Gounsoegbamey, Guédévié, tous en permanence inondés à l'exception de Dakomey où seules les localités de Kindji et de Havè ne sont inondées qu'en période de crue.

Notons que dans Ganvié, il existe par endroits des terres artificielles construites avec de l'argile, des coquilles d'huîtres, du sable, afin d'apprendre aux enfants à marcher, à jouer et servant aussi à élever les animaux.

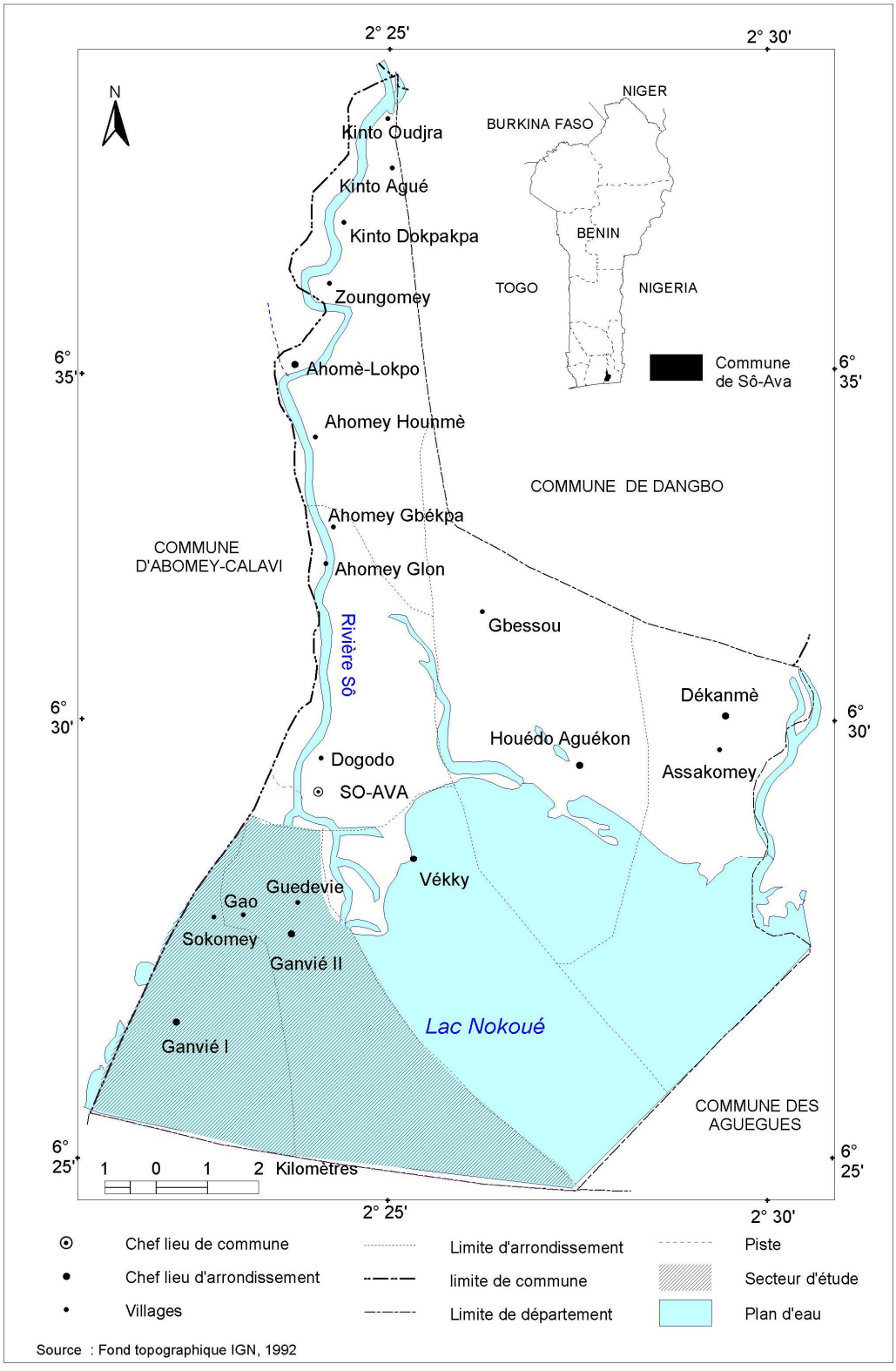



**Figure 1: Situation géographique de la cité lacustre de Ganvié dans la Commune de Sô-Ava**

#### 1.1.2.2 Relief et climat

*Le* relief est une dépression naturelle (surface de l'eau). La profondeur du lac à Ganvié est d'environ 2 m en moyenne. Le climat est celui de la zone littorale du Bénin et connaît deux saisons pluvieuses et deux saisons sèches alternées, à savoir :

- une grande saison pluvieuse : 15 mars au 15 juillet ;
- une petite saison sèche : 15 juillet au 15 septembre ;
- une petite saison pluvieuse : 15 septembre au 15 novembre ;
- une grande saison sèche : 15 novembre au 15 mars.

La pluviométrie dans la zone est en moyenne de 1400mm/an (ASECNA, station de Cotonou aéroport). Les maxima sont généralement enregistrés aux mois de juin et d'octobre avec 10 à17 jours de pluie par mois pour ces périodes de pluies (AKIN, 1997). La température du lac oscille entre 24°C et 29°C avec une humidité relative toujours supérieure à 70% (ASECNA, Cotonou).

#### 1.1.2.3 Tourisme et artisanat

La cité lacustre de Ganvié est la plus vaste d'Afrique, et elle est souvent présentée comme une Venise tropicale. Egrenant ses cases sur pilotis sur les eaux du lac Nokoué, Ganvié est la perle du Bénin. C'est un village traditionnel de pêcheurs dont la construction aurait permis de créer un refuge aux populations Tofinu face aux rafles esclavagistes des royaumes voisins du Bénin. De nombreuses cases ont conservé la structure traditionnelle : elles sont faites de bambou et recouvertes de toits de paille. Le village lacustre de Ganvié est désormais relativement touristique. On y voit les hommes revenir de la pêche, avec leur filets chargés de poissons, ou les femmes, installées dans leur pirogue et vendant des fruits ou des légumes, sous un large chapeau de paille. Le marché flottant de Ganvié est particulièrement intéressant à observer. Ce sont autant d'éléments qui attirent les touristes et il s'est développé par conséquent un artisanat lacustre avec des objets d'art, notamment les pirogues, les grands chapeaux et autres.

Les cités de Ganvié et de Sô-Tchanhoué reçoivent en moyenne 20 touristes par jour. En 1996, elles en ont reçu 1185 avec une recette de 3 000 000 de franc CFA. L'embarcadère était géré par l'Office National d'Hôtellerie et de Tourisme qui a été liquidé pour mauvaise gestion. Actuellement, elle est en gérance libre sous la supervision de la Direction de l'hôtellerie.




**Photo 1: Marché flottant de Ganvié**

#### 1.1.2.4 Economie

A Ganvié, tous les déplacements se font à l'aide de la pirogue qui est le premier outil à acquérir par les riverains.

Sur le plan économique, toutes les activités tournent autour de l'eau et sont dominées par la production halieutique.

- **La pêche**

D'ingénieuses techniques mises au point à travers les âges, permettent de capturer ou d'élever les poissons. Ainsi la pêche se pratique par les hommes sous plusieurs formes :

- la pêche au harpon, surtout pratiquée pendant la saison des pluies ;
- la pêche aux filets : filets fixes à flotteurs ou non, filets à lancer, filets trainants, etc ;
- la pêche à l'épervier par exemple (filets à lancer), se pratique isolément ou à plusieurs filets avec six ou sept pirogues disposées en cercle ; la surface limitée est couverte par les éperviers ;
- la pêche à la ligne ou à l'hameçon ;
- les pièges à poisson appelés « acadja », cette technique a une double fonction : élevage et pêche. Elle est la plus pratiquée à Ganvié, de ce fait, les habitants y sont plus pisciculteurs que pêcheurs.

Les pêcheurs vendent leurs prises aux femmes et en particulier à leurs épouses, qui viennent les vendre sur terre ferme, à savoir : Cotonou, Calavi, et autres villages ; elles ramènent en retour les produits alimentaires et manufacturés.

Il est à noter que cette activité est aujourd'hui en difficulté comme le confirment certains pêcheurs en énumérant les causes suivantes : la couleur sombre de l'eau (forte charge en matières organiques), sa nature trop saumâtre (ouverture du canal de chenal) appauvrit le milieu en faune ichtique (disparition d'espèces de poissons et baisse de la productivité).

- **Autres activités**

L'élevage des mammifères, en l'occurrence celui des porcs et celui de la volaille, se développe dans la cité. Ces animaux sont élevés dans des enclos bourrés de fourrage surtout pendant la période de crue. Il existe le gros bétail élevé hors de la cité à des endroits émergés.

Le transport par la pirogue de matériaux, notamment le bois de chauffe, constitue la préoccupation de quelques femmes qui font la navette entre la terre ferme et l'eau. Aussi, le trafic des produits pétroliers (transport par pirogue) et la contrebande des marchandises constituent des activités très rémunératrices pour les populations.

Il faut préciser que ces produits pétroliers se déversent par accident ou à l'aide des barques motorisées dans le lac et constituent des sources de pollution par les métaux.

## 1.2 Approche méthodologique

La recherche méthodologique est subdivisée en deux étapes : (i) une première consacrée à la recherche documentaire et collecte des données (recherche documentaire, observations et prélèvements), (ii) une seconde consacrée aux travaux de laboratoire.

### 1.2.1 Recherche documentaire et collecte des données

Les données ont été collectées en fonction des objectifs de l'étude, lesquels dépendent étroitement des hypothèses formulées. Ainsi, elles portent sur les axes suivants :

### 1.2.2 Recherche documentaire

Afin de mieux cerner la problématique des métaux lourds et de disposer d'informations nécessaires pour évaluer la pollution d'écosystème aquatique de la cité lacustre de Ganvié, nous avons procédé à une recherche documentaire sur le site Internet Google, à la consultation des mémoires et thèses de doctorat dans les bibliothèques de l'Ecole Polytechniques d'Abomey-Calavi (EPAC), de la Faculté des Sciences de la Santé (FSS),

Faculté des Sciences et Techniques (FAST), de l'Ecole Doctorale Pluridisciplinaire (EDP), de la Faculté des Lettres, Arts et Sciences Humaines (FLASH), du Ministère de l'Environnement de l'Habitat et de l'Urbanisme (MEHU), du Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (CIFRED) au Bénin et de la Faculté des Sciences SEMLALIA de l'Université de Cadi Ayyad au Maroc.

### 1.2.3 Observation de terrain

Les visites de terrain ont été réalisées d'abord pour identifier les poissons les plus consommés par la population et ensuite pour identifier les sites de prélèvement tout en tenant compte des fortes concentrations des habitations, des marchés et des principales sources de pollution (rejets d'ordures ménagères et résidus solides de tout genre, utilisation poussée des barques motorisées à essence, le trafic intense de l'essence par barque, le déversement de produits pétroliers dans le lac).

### 1.2.4 Prélèvements

- **Sites de prélèvement, mesure des coordonnées géographiques et des paramètres physico-chimiques**

Au vu des critères, de fortes concentrations des habitations, d'emplacement des marchés et des principales sources de pollution, sur la cité lacustre de Ganvié, dix sites de prélèvement sont retenus, dont cinq à Ganvié I et cinq à Ganvié II.

- **Instruments de mesure utilisés**

Afin de recenser les données géographiques de chaque site de prélèvement et les données sur la qualité physico-chimique de l'eau, certains appareils ont été utilisés. A ce titre nous pouvons citer :

- un Global Position System (GPS) de marque GARMIN etrex. Cet instrument a servi à relever les coordonnées géographiques des sites de prélèvements sur la cité lacustre de Ganvié avant toute autre mesure ;




**Photo 2: Global Position System (GPS)**

- un multi paramètre de marque Horiba, modèle U-10, qui a permis de mesurer la conductivité, la salinité, la température et le pH de l'eau sur chaque site de prélèvement.



**Photo 3: Multi paramètre**

- une benne de Beckmann qui a servi au prélèvement des sédiments du lac,



**Photo 4: Benne de Beckmann**

- **Sites de prélèvements et paramètres physico-chimiques**

**Tableau I**: **Coordonnées géographiques des sites de prélèvements et paramètres physico-chimiques de l'eau et des sédiments**

| Sites de prélèvement | | Coordonnées géographiques | Température (°C) | pH | Salinité (%) | Conducti-vité |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GANVIE I | Site 1 (Sokomey) | N 06°27' 834'' E 002°23' 363'' | 31 | 9,9 | 0,8 | 14 |
| | Site 2 (Sokomey) | N 06°27' 910'' E 002°23' 377'' | 31 | 9,2 | 0,8 | 14 |
| | Site 3 (Kpassikomey) | N 06°27' 958'' E 002°23' 340'' | 31 | 9,1 | 0,8 | 14 |
| | Site 4 (Kpassikomey) | N 06°28' 019'' E 002°23' 320'' | 31 | 9,5 | 0,8 | 14 |
| | Site 5 (Agonmekomey) | N 06°28' 091'' E 002°23' 401'' | 31 | 9,3 | 0,8 | 14 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GANVIE II | Site 6 (Kindji) | N 06°28' 176'' E 002°23' 470'' | 31 | 9,5 | 0,8 | 14 |
| | Site 7 (Kindji) | N 06°28' 063'' E 002°23' 470'' | 31 | 8,8 | 0,8 | 14 |
| | Site 8 (Dossou – Gao) | N 06°28' 036'' E 002°23' 617'' | 31 | 7,9 | 0,8 | 14 |
| | Site 9 (Dakomey) | N 06°27' 988'' E 002°23' 669'' | 31 | 8,3 | 0,8 | 14 |
| | Site 10 (Dakomey) | N 06°27' 962'' E 002°23' 566'' | 32 | 9,1 | 0,8 | 14 |

***Source :*** *Travaux de terrain*

- **Les éléments de l'étude**

Pour évaluer la pollution de la cité lacustre de Ganvié, l'étude s'est axée sur trois éléments qui sont :

- l'eau ;
- les sédiments ;
- les poissons et crustacés.

- **Les prélèvements proprement dits**

Les différents éléments ont été prélevés dans des tubes Falcon en polypropylène afin d'éviter d'éventuels relargages de métaux. Tous les prélèvements ont été réalisés dans la matinée, congelés à -20°C et gardés au froid à 4°C jusqu'à leur acheminement au laboratoire de Gestion, Traitement, et Valorisation des Déchets (GTVD) de l'Université de Lomé (Togo).

- ***L'eau***

Les eaux ont été prélevées au moyen d'une bouteille de deux litres incrustée dans une cage en fer épousant sa forme. Celle-ci est lestée par deux masses métalliques qui lui sont latéralement fixées. La bouteille dispose d'un bouchon en polystyrène auquel est attaché un fil qu'on a tiré pour la déboucher (un nœud est fait à chaque mètre pour évaluer la profondeur de l'immersion); la bouteille est retirée de l'eau lorsqu'elle est remplie. Les eaux prélevées sont acidifiées avec de l'acide nitrique (HNO3 à pH compris entre 2 et 4) et conservées au froid à -20°C.

Au total, 10 échantillons d'eau sont prélevés.



**Photo 5: Prélèvement de l'eau**

- ✓ ***Les sédiments***

A chaque prélèvement d'eau correspond un prélèvement de sédiments. 10 prélèvements sont réalisés. Le sédiment humide est prélevé par site au moyen d'une benne de Beckmann. Elle consiste à déposer l'instrument ouvert sur le substrat et, à l'aide d'un déclencheur, il prélève le sédiment. Une fois prélevés, ces sédiments sont versés dans des flacons stériles puis placés dans des glacières où ils sont conservés à 4°C jusqu'au laboratoire.

- ✓ ***Les poissons et les crustacés***

Le prélèvement des poissons est fait dans les captures issues de la pêche artisanale faite à partir des filets, des trous à poissons (houédos) et des acadjas. Il s'agit des espèces benthiques et pélagiques, des espèces omnivores et carnivores. Le régime alimentaire permet d'étudier la toxicité dans la chaîne trophique. On a privilégié les espèces de poissons consommées par la population locale.

Ceux prélevés sont mis dans des tubes Falcon en polypropylène étiquetés, conservés sous glace et aussitôt acheminés au laboratoire.

Cinq différentes espèces de poissons les plus consommées ont été sélectionnées et 6 échantillons de chacune d'elles ont été prélevés (au total 30 échantillons).

Ainsi, les espèces les plus fréquentes et les plus consommées de cet écosystème lacustre qui ont été prélevées sont :

- *Sarotherodon melanotheron,* Cichlidae
- *Chrysichthys auratus,* Claroteidae
- *Ethmalosa fimbriata ,* Clupeidae
- *Liza falcipinnis ,* Mulgilidae
- *Penaeus Kerathurus,* Peneidae.

Ces 5 espèces ont été retenues après des enquêtes menées au près de ménages, des vendeuses et des pecheurs. (Voir questionnaire en annexe)

❖ **Noms, famille et régime alimentaire des différentes espèces de poissons et crustacées étudiées.**

Les différentes espèces de poissons et crustacées étudiées sont désignées selon les groupes ethniques. Ainsi dans le tableau V sont présentés les noms, la famille et le régime alimentaire des différentes espèces de poissons prélevées sur la cité lacustre de Ganvié.

**Tableau II : Noms, famille et régime alimentaire des différentes espèces de poissons et de crustacées étudiés**

| Nom Scientifique | Nom vulgaire | Noms en langues nationales | | | Famille | Régime alimentaire |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Fon | Goun | Dendi | | |
| *Sarotherodon Melanotheron* | Tilapia | Akpavi | Wè | Kossia-bi | Cichlidae | Omnivore |
| *Chrysichthys auratus* | Silure blanc | Ofin | Djan | Bololo | Claroteidae | Carnivore |
| *Ethmalosa fimbriata* | Sardinelle jaune | Ahouè | Tchèkè | | Clupeidae | Carnivore |
| *Liza falcipinnis* | Mulet | Wétin | Wétin adakpla | | Mulgilidae | Omnivore |
| *Penaeus Kerathurus* | Crevette | Degon | Tchatcha | Zatohlinde | Peneidae | Ovipare |

Poids moyen des poissons: 60±15g

***Source** : Travaux de terrain*

- **Caractéristiques de la famille des différentes espèces de poissons et de crustacées étudiées**

  - **Les Cichlidae**

Les Cichlidae se reconnaissent à la présence d'une seule narine de chaque côté. Le corps comprimé est couvert d'écailles jusqu'à la tête. Toutes les nageoires sont présentes. L'espèce *Sarotherodon melanotheron* se distingue par sa nageoire pectorale plus longue que la ventrale et aussi par le fait que le coin de la bouche atteint la hauteur de l'œil (Van Thielen, *et al.,* 1993). Les écailles entre les pectorales et les pelviennes presque de même taille que celles des flancs. On remarque aussi sur cette espèce :

- une tache noire sur l'opercule ;
- des taches noires irrégulières sur la gorge et le bas de la tête ;
- 3 à 6 rangées de dents sur les mâchoires ;
- coloration générale bleu opalin clair avec une tache plus foncée ;
- l'opercule de la femelle mature est transparent et le rouge des branchies en- dessous lui donne une apparence pourpre. (Murai et *al.*, 2003).



**Photo 6:** ***Sarotherodon melanotheron,*** **Cichlidae**

- **Les Claroteidae**

Poisson au corps modérément allongé, portant généralement 4 paires de barbillons. On remarque la présence d'une forte épine précédant la dorsale, les nageoires pectorales et la présence d'une nageoire adipeuse (Murai et *al.*, 2003) **.**

L'espèce *Chrysichthys auratus* étudiée est caractérisée par :

- 1er rayon branchu de la nageoire dorsale prolongé par un long filament,
- 8 à 9 rayons mous à la nageoire pectorale,
- coloration : livrée uniforme, jaunâtre ou dorée ; nageoire dorsale, caudale et adipeuse souvent bordées de noir ; tache noire souvent derrière l'opercule.



**Photo 7:** *Chrysichthys auratus,* Claroteidae

- **Les Clupeidae**

Poisson argenté au corps fusiforme, à taille faible, ne dépassant pas 73 mm. Les écailles se détachent facilement. Les jeunes cristallins, transparents sont beaucoup plus allongés que les adultes. Une véritable métamorphose intervient entre 25 et 30 mm de longueur.

L'espèce *Ethmalosa fimbriata* se caractérise par *:*

- corps élevé, comprimé latéralement,
- 16 à 19 rayons à la nageoire dorsale,
- 37 à 42 écailles au bord distal lacinié le long de la ligne longitudinale.



**Photo 8: *Ethmalosa fimbriata ;* Clupeidae**

- **Les Mulgilidae**

Ce sont des poissons allongés, au corps dépourvu de ligne latérale et recouvert d'écailles moyennes et grandes. La bouche est petite, terminale et infère. L'estomac de type caecal, forme un gésier musculeux. Ils ont : deux moyennes dorsales courtes et bien séparées l'une de l'autre, un processus axillaire au-dessus des nageoires pectorales et pelviennes, les pectorales situées assez haut sur les flancs et les pelviennes en position abdominale.

L'espèce *Liza falcipinnis* étudiée se caractérise par :

- Corps robuste cylindrique légèrement comprimé latéralement ;
- Paupière adipeuse bien développée s'étendant sur la majeure partie de la pupille ;
- 1à 6 rangées de dents fines et petites à la lèvre supérieure ;
- 8 rayons à la nageoire anale ;

- 14 à 15 rangées transversales d'écailles entre l'origine de la 1ère dorsale et celle des pelviennes ;
- Processus axillaire pectoral bien développé ;
- Coloration : dos gris bleuté, flanc et ventre argentés avec des reflets dorés. lignes longitudinales sombres sur les flancs.



**Photo 9: *Liza falcipinnis* , Mulgilidae**

- **Les Penaeidae**

Crevette à rostre développée et munie de dents dépassant le bord distal des yeux.

Le *Penaeus kerathurus* se distingue par :

- un rostre légèrement recourbé vers le haut à l'extrémité avec généralement onze dents (de 8 à 13) sur le bord dorsal,
- présence d'une seule forte épine sur le bord ventral,
- le 6ème (dernier) segment abdominal sans sillon dorso-latéral de chaque côté de la carène dorsale.
- coloration très variable et différente selon le sexe ; mâles souvent clairs avec des barres transversales roses sur l'abdomen ; femelles jaune-verdâtres, éventail caudal souvent bleu vers l'extrémité et bordé de rouge. (Murai *et al.,* 2003)



**Photo 10: *Penaeus Kerathurus,* Peneidae**

### 1.2.5 Méthodologie des travaux de laboratoire

Elle a consisté à :

- doser le plomb et le cadmium par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (Thermo Orion assisté du logiciel Solaar S2) selon la méthode Moustaid *et al.* (2005) au Laboratoire de Gestion, Traitement, et Valorisation des Déchets (GTVD) de l'Université de Lomé (Togo) ;
- doser le mercure par Spectrophotomètre d'Absorption Moléculaire selon la méthode HACH (HACH-LANGE DR 2800) selon la méthode HACH après minéralisation et extraction par la vapeur froide, au Laboratoire de Contrôle de Qualité des Eaux et Aliments du Ministère de la Santé au Bénin.

#### 1.2.5.1 Conservation et prétraitement des échantillons au laboratoire

Tous les échantillons de poissons prélevés sont découpés et séchés au four électrique : dans un premier temps à 50°C pendant 12 heures puis passés à 120°C pendant 24 heures. Les prélèvements de sédiments recueillis en verre propres étiquetés sont également séchés au four électrique à 154°C pendant 24 heures. Mais les échantillons d'eau sont maintenus sous climatisation pendant une semaine.

### 1.2.5.2 Dosages des métaux lourds dans les échantillons

#### 1.2.5.2.1 Dosage du plomb et du cadmium par SAA

Toutes les analyses ont été effectuées dans les bonnes pratiques de laboratoire, une eau distillée et des acides purs adaptés à l'analyse des éléments traces, ont été utilisés. Tous les échantillons, après une macération dans de l'acide nitrique ($HNO_3$), ont subi une digestion dans un digesteur (bain de sable électronique à 125 °C pendant 1 heure) pour l'extraction de la totalité des métaux lourds. Mais seuls les éléments suivants ont été dosés par spectrophotomètre d'absorption atomique (AAS) : Plomb et cadmium.

- **Principe de la méthode**

La spectrophotométrie d'absorption atomique est définie comme l'absorption d'une énergie de rayonnement par les atomes. Cette absorption est en relation avec la concentration des ions métalliques présents.

Soit un atome métallique à l'état énergétique fondamental Eo, cet atome reçoit une énergie provenant d'un rayonnement lo, un électron périphérique passe de son orbite normale (Eo) à une orbite plus externe d'énergie E avec E = Eo + hμ.

L'absorption d'un photon d'intensité lo = hμ est à la base de la spectrophotométrie d'absorption atomique. Après absorption, l'énergie incidente lo devient I<lo, c'est cette diminution d'énergie qui est mesurée dans la spectrophotométrie d'absorption atomique. La diminution de l'intensité du rayonnement transmis peut être représentée par la loi de beerlambert :

I = Io expo – (KCL)

I = intensité du rayonnement transmis

Io = intensité du rayonnement incident

K = coefficient d'absorption

C = concentration en atome

L = longueur du chemin parcouru par le rayonnement à travers l'échantillon

Absorbance = A = log (lo / l) = Kcl

Il y aura diminution du nombre d'atomes à l'état fondamental qui sera proportionnelle à la concentration du milieu absorbant. L'absorbance est proportionnelle au nombre d'atomes à n'importe quelle température et longueur d'onde.

- **Appareillage et réactifs**

  - Spectrophotomètre d'absorption atomique (AAS) marque Thermo Orion assistée du logiciel Solaar S2, Bain de sable ;
  - fioles jaugées de 50 mL ;
  - Jeu de pipettes atomiques ou micropipettes (100 à 1000 µL) ;
  - Pipette à volume réglable, de 1 à 5 mL muni d'un aspirateur en caoutchouc ;
  - Balance électrique marque SCHIMADZU type BX 3200 D ;
  - Mortier et pilon en silice ;
  - Calculatrice Pipette automatique ou micropipettes, pour la préparation des étalons d'analyse ;
  - Digesteur ;
  - Tube de téflons ;
  - Flacons de stockage de 125 mL et des embouts jetables ;
  - Étalons de référence pour Cd et Pb ;
  - Chronomètre ;
  - Chiffons de laboratoire ;
  - Acide nitrique (HNO3) pur, concentré (65%) pour les analyses ;
  - Acide chloridrique (Hcl) pur, concentré (37%) pour les analyses ;
  - Eau distillée.

- **Préparation des solutions étalons**

Les solutions étalons sont préparées à partir de solutions aqueuses étalons des mêmes métaux, de même concentration acide que les échantillons, afin de minimiser l'effet de matrice. La concentration de toutes les solutions mères commerciales (étalons de référence) est de 1000 ppm, afin d'en assurer la stabilité.

Les étalons préparés étaient : Pb et Cd: 1, 2 et 4 ppm

Le tableau suivant résume les résultats de la préparation des étalons.

**Tableau III**: **Concentrations des étalons**

| N° | Etalon de référence (ppm) | Volume final (mL) | Volume prélevé (mL) et Etalon final (ppm) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pb | | Cd | |
| | | | V. Prélevé | C. finale | V. Prélevé | C. finale |
| 1 | 1000 | 50 | 0,05 | 1 | 0,05 | 1 |
| 2 | 1000 | 50 | 0,1 | 2 | 0,1 | 2 |
| 3 | 1000 | 50 | 0,2 | 4 | 0,2 | 4 |

***Source : Travaux de laboratoire***

Nous avons réalisé un étalonnage selon les normes exigées par la Directive 2001/22/CE de la Commission du 8 mars 2001**.** La concentration des étalons a couvert la gamme des concentrations des échantillons qui sont mesurés, et le nombre d'étalons est lié au nombre de métaux à doser. Deux blancs pur (témoins) sont aussi préparés pour vérifier la qualité des échantillons. Le premier est constitué d'eau distillée et de 2 mL d'acide nitrique pour les poissons. Le second pour les échantillons de sol, est constitué de 3 mL d'acide chloridrique et de 1mL d'acide nitrique ($HNO_3$).

- **Préparation des échantillons en vue du dosage à l'AAS**

Il s'agit essentiellement du broyage et de la digestion acide.

La technique de broyage ne produit pas nécessairement un échantillon uniforme, mais elle facilite l'étape de digestion et augmente son niveau de reproductibilité. Et les contaminations croisées entre échantillons sont négligeables. Après le broyage, peser 1g à la balance électronique de marque SCHIMADZU type BX 3200 D du matériel broyé dans un mortier en silice. Renverser dans les tubes à téflons préalablement étiqueté, puis y ajouter 5mL d'eau distillée. Ensuite rajouter, 2 mL d'acide nitrique $HNO_3$ concentré (65%) sur les échantillons de poissons ; 1 mL d'acide nitrique $HNO_3$ concentré (65%), 3 mL d'acide chlorhydrique concentré (37%) et 1 mL de $H_2O_2$ sur les échantillons de sédiments (technique d'attaque à l'eau régale).

Après ces étapes, on passe à la digestion acide, qui consiste à placer les tubes de téflon contenant chaque mélange au bain de sable pendant 1h. Une fois la digestion terminée, les tubes de téflons sont retirés du bain sable et sont ramenés à la température ambiante. Le produit minéralisé est récupéré dans une fiole de 50 mL et complété avec de l'eau distillée

jusqu'au trait de jauge. Il est ensuite filtré et conservé à 4°C dans un flacon de 125 mL jusqu'au dosage. Quant aux prélèvements d'eau, chaque échantillon est dosé directement. Les eaux étaient assez claires pour qu'aucune décantation ne soit nécessaire avant le dosage par AAS.

C'est la spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme qui a été utilisée. Le dosage a été effectué par interpolation sur les courbes d'étalonnage, préparées à partir de solutions étalons. C'est ainsi qu'ont été dosés le Pb, et le Cd, présents dans l'eau, les sédiments et les poissons.

Le mode opératoire pour la préparation des échantillons est résumé dans la figure 23.

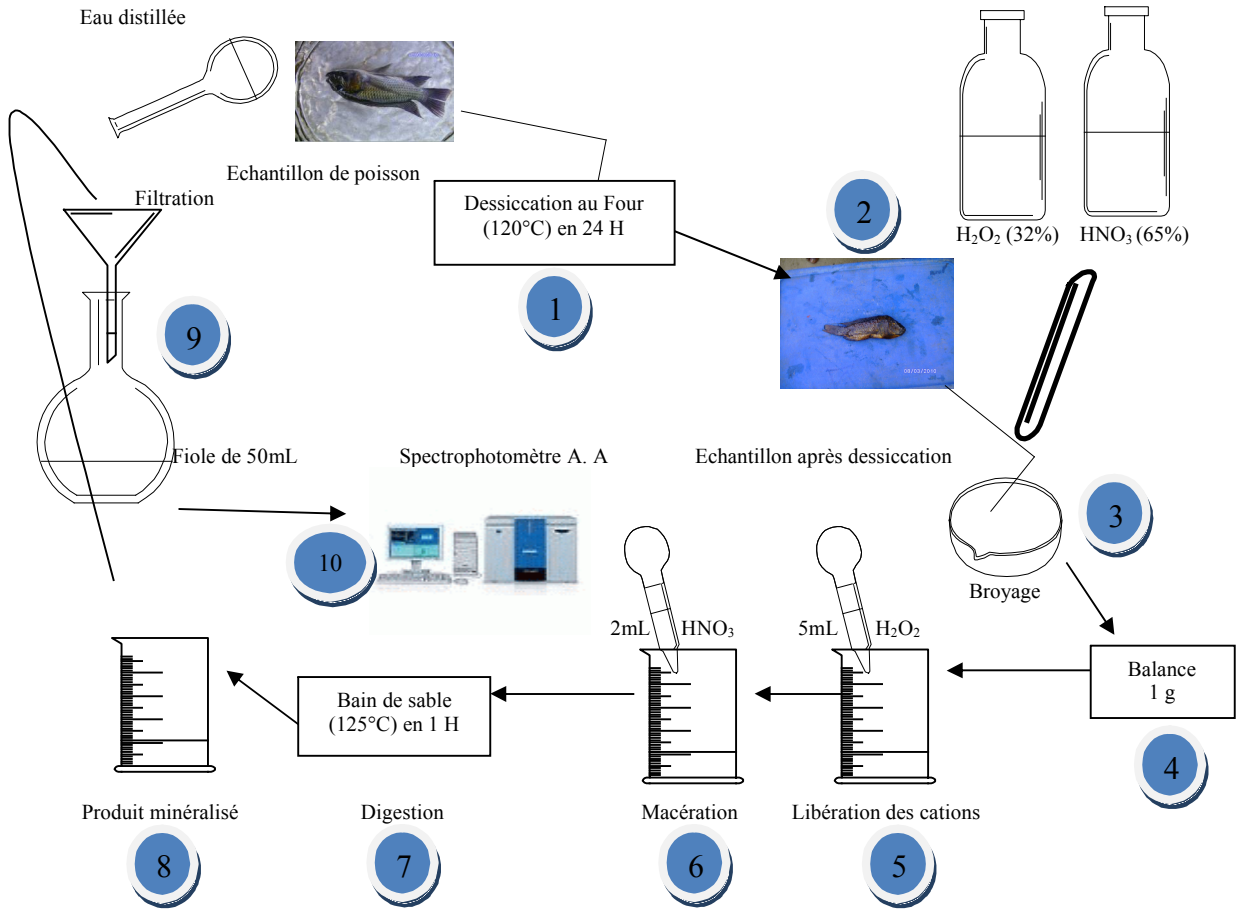



**Figure 2**: **Schéma du mode opératoire de l'analyse des métaux lourds à l'AAS**




**Photo 11: Spectrophotomètre d'absorption atomique**

- **Calculs**

Les résultats affichés par le logiciel Solaar S2 sur l'écran de l'ordinateur associé au spectrophotomètre, sont pour une solution (l'AAS limite les interférences) et ils sont exprimés en ppm. Pour avoir la concentration corrigée on a multiplié cette valeur par le facteur de dilution de l'échantillon et divisé par le poids initial de l'échantillon avant la digestion.

Soit :

$$\text{Concentration finale (ppm)} = \frac{\text{Concentration affichée} \times 50\ \text{mL}}{1\text{g}}$$

Ce calcul ne s'applique pas aux échantillons d'eau pour lesquels, il n'y a eu aucune pesée de masse ou de volume.

#### 1.2.5.2.2 Dosage du mercure par SAM

Le mercure a été dosé par spectrophotomètre d'absorption moléculaire selon la méthode HACH. Le spectrophotomètre utilisé est HACH- LANGE DR/2800 après minéralisation et extraction par la vapeur froide.

Cette méthodologie se déroule en 3 phases.

➢ **Phase 1 : Digestion**

- Transférer un litre de l'échantillon dans un erlenmeyer de 2000 mL et le placer sur une plaque chauffante muni d'un agitateur magnétique pendant 50 min ;
- ajouter 50 mL d'acide sulfurique concentré ;
- ajouter 25 mL d'acide nitrique concentré ;
- ajouter 4.0 g de persulfate de potassium et contunier l'agitation jusqu'à dissolution ;
- ajouter 7.5 g de permanganate de potassium et agiter jusqu'à dissolution ;
- couvrir l'erlenmeyer et commencer à chauffer l'échantillon à une température de 90°C après la dissolution des réactifs. Eviter l'ébullition ;
- continuer à agiter et de chauffer l'échantillon à 90 °C pendant 2 heures ;
- laisser l'échantillon déjà digéré se refroidir à la température ambiante;
- retourner l'échantillon frais et digéré sur la plaque magnétique et chauffante muni d'agitateur magnétique;
- ajouter 0. 5 g d'hydroxylamine-hydrochlorure jusqu'à disparition de la couleur violet. Si au bout de 30secondes la couleur violet ne disparait pas, continuer d'ajouter l'hydroxylamine-hydrochlorure ;
- retirer le barreau aimanté ;
- la digestion de l'échantillon est prête pour la phase suivante.




**Photo 12: Réactifs de minéralisation**

➢ **Phase 2 : Séparation et pré concentration par vapeur froide**

- Transférer l'échantillon digéré dans la bouteille du dispositif à vapeur froide ;
- déposer la bouteille sur son support ;
- connecter l'erlenmeyer de 100 ml à la colonne d'absorption de mercure ;

- introduire à l'aide d'une pipette 8ml du réactif B dans la colonne d'absorption de mercure ;
- connecter la pompe à vide et aspirer les 8ml du réactif B dans l'erlenmeyer ;
- arrêter la pompe à vide et remplacer l'erlenmeyer par une éprouvette (récepteur du distillat) ;
- ajouter 2ml du réactif C dans la colonne d'absorption ;
- connecter la colonne d'absorption à la bouteille ;
- casser une ampoule du réactif A et le dissoudre dans la solution ;
- boucher le cou latéral de la bouteille avec le couvercle ;
- connecter la pompe à la colonne ;
- connecter les différents éléments et mettre le dispositif en marche pendant 5min ;
- ouvrir après les 5min, le couvercle supérieur de la colonne d'absorption du mercure sans arrêter la pompe ;
- ajouter 8ml du réactif B dans la colonne d'absorption du mercure pour lessiver dans le receveur le mercure capté. Laisser la pompe toujours en marche pendant 10 secondes ;
- arrêter la pompe ;
- transférer les 10ml de solution dans la cuve de lecture pour la phase 3.




**Photo 13: Réactifs d'extraction**

➢ **Phase 3 : analyse colorimétrique ou lecture**

- Entrerle programme pour la méthode d'extraction de mercure par vapeur froide en appuyant **312.** La longueur d'onde **412 nm** s'affiche automatiquement ;
- ajouter le réactif 3 à l'aide d'un entonnoir et agiter pour mélanger ;

- ajouter le réactif 4 à l'aide d'un entonnoir et agiter pour mélanger ;
- ajouter 8 gouttes du réactif 5, agiter pour mélanger et laisser réagir pendant 2 min ;
- faire le zéro ;
- ajouter immédiatement le réactif 6, agiter pour mélanger.
- faire la lecture. L'appareil affiche automatiquement le résultat en µg/L.

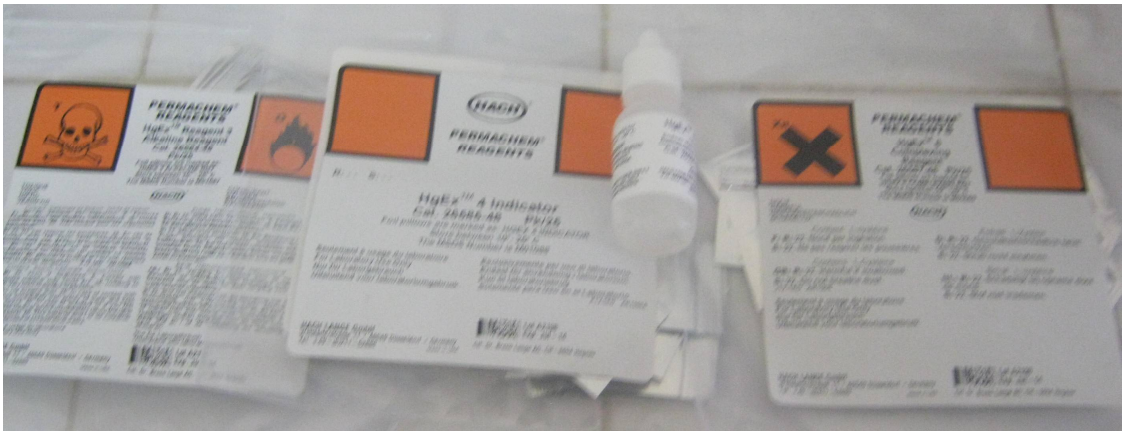



**Photo 14: Réactifs de révélation**




**Photo 15: Dispositif de mesure de mercure par la méthode à vapeur froide**




**Photo 16: Spectrophotomètre d'Absorption Moléculaire DR/ 2800**

**NB** : la limite de détection de l'appareil est de **0, 1** µg/L Hg (Voir toutes les détails en annexe)

## II. Evaluation du risque d'exposition de la population via la consommation des poissons

La démarche d'évaluation des risques est standardisée (Ricoux et Gasztowtt, 2005) et conduite en quatre étapes :

- la sélection des substances et identification des dangers ;
- la sélection des valeurs toxicologiques de référence ;
- l'estimation de l'exposition qui va croiser les niveaux de contamination des poissons en Pb et en Cd aux quantités consommées par un échantillon de la population. Les données sur les habitudes, la quantité et la fréquence de consommation des poissons pêchés ont été recueillies par quelques interviews de proximité ;
- la caractérisation du risque.

## III. Analyse Statistique

Toutes nos données obtenues dans la première partie ont subi des traitements statistiques. Le logiciel utilisé est le SPSS, version 17.0. Les moyennes, les écart-types ont été calculés grâce à la statistique descriptive. Les tests de conformité ont été réalisés grâce au test de Student au seuil d'erreur de 5% utilisant la section « compare means, one way ANOVA».

A l'issue de ce test, les moyennes obtenues ont été comparées aux normes fixées par GESAMP pour l'eau et les sédiments et à la norme française 466/2001, en ce qui concerne les poissons.

Par ailleurs des tests d'homogénéité et d'égalité des variances des données collectées exécutées utilisant la section «  Indépendant Variable Analysis » ont été utilisés.

# Chapitre 2 : Méthodologie d'évaluation in vivo de l'effet protecteur de la « vitamine C » contre l'effet de cadmium et du mercure

## I. Lieu d'étude, matériel et méthode

### 1.1 Lieu d'étude

Les études se sont déroulées dans l'animalerie **« Botanical and Zoological Garden »** à l'université de Lagos Unilag au Nigéria. Les tests de toxicité des échantillons sur les rats sont réalisés à « **Unilag Génétics Laboratory »**, Departement of Cell Biology and Genetic of Science, (University of Lagos), Nigéria. Les analyses des paramètres sanguins se sont déroulées au laboratoire « **Haematology Unit, Lagos state University Teaching Hospital (ULTH)** » (Lagos, Nigéria) et celles d'histopathologie au laboratoire « **Histology section, Veterinary dept, University of Ibadan** » (Ibadan, Nigeria).




**Photo 17: Animalerie "Botanical and Zoological Garden"**

### 1.2 Matériel

#### 1.2.1 Matériel animal

Le matériel animal est constitué de 65 rats mâles albinos de souche Wistar âgés de 6 à 8 semaines et ayant un poids moyen de 108±25g. Ces rats obtenus à l'Unité Animale d'élevage de l'université de Lagos, au Nigéria ont été acclimatés aux conditions de l'animalerie pendant

deux semaines avant le début des expérimentations. Ils sont placés dans des cages stériles conçues en polypropylène dans une salle dont la température est de 25-30°C et où l'humidité relative est de (60°C ± 5%). Elles sont naturellement éclairées avec une séquence de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux avaient libre accès à l'eau potable et à une nourriture « standard rodent laboratory chow (Ladokun feed Nigeria®) *ad libitum,»* dans l'animalerie « Botanical and Zoological Garden » in Unilag (University of Lagos), Nigéria où se sont déroulées les expérimentations.



**Photo 18: Animalerie ayant servi de site expérimental "Botanical and Zoological Garden"**



**Photo 19: Rat wistar**

### 1.2.2 Produits chimiques

**Produits d'intoxication**

Les produits chimiques d'essai utilisés pour l'expérience sont le chlorure de cadmium ($CdCl_2$) et chlorure anhydre de mercure ($HgCl_2$). Les poudres du chlorure de mercure ($HgCl_2$ = 271.50; Minimum assay Hg: 98%) et du cholrure de cadmium ($CdCl_2$ = 183.32; Minimum assay Cd: 99%) ont été acheté à « General Purpose reagent BDH Chemicals Ltd Poolo England ».

**Antioxydant considéré dans l'étude**

L'acide ascorbique pharmaceutique encore appelé vitamine C a été l'antioxydant utilisé tout au long de l'expérimentation. La Vitamine C, comprimé de 100 mg, enregistré sous MAFDAC REG. N° 04 - 1453, manufacturé par 'Emzor Pharmoceutical Industries Ltd., Plot 3C Block A, a été acheté à la pharmacie "Outpatient Pharmacy Department of the Lagos University Teaching Hospital Lagos " au Nigéria. La date de péremption était prévue pour le 02 /01/2014. Les comprimés de vitamine C qui étaient difficilement solubles étaient rendus sous forme d'une fine poudre avant leur mise en solution qui a été vigoureusement secouée avant chaque administration par voie orale.



**Photo 20 : Vitamine C**

### 1.2.3 Autres matériels de laboratoire

- Cages en polypropylène
- Une balance analytique électronique de marque Acculab® USA, Model-vic-303
- Un appareil photo de marque Sony
- Un mortier de laboratoire
- Une spatule
- Une éprouvette graduée de 500ml
- Des plastiques pour la conservation des solutions
- Une canule
- Deux pipettes de 1ml
- Des gans
- Des tubes capillaires (heparinized 70 ml micro – haematocrit capillary tubes)
- Des tubes avec anticoagulant (EDTA 8,5 pour cent)
- Un parc de dissection constitué de trois paires de ciseaux, de scapel, deux serings
- Une planche de dissection
- Des tubes de conservation universelle
- Des papiers filtre whatman
- Eau distillée
- Eau physiologique salée [0,9% (W/V) NaCl]
- Solution de formol
- Hémalun
- Eosine
- L'acide acétique
- Chlorure de calcium
- L'éthanol
- Méthanol 70°
- Xylène
- Les lames
- Un analyseur automatique « haematology auto analyzer Sysmex KX-21N »
- Un microscope photonique de marque Olympus BX 41 muni d'une caméra (DSC-S730).

## 1.3 Méthodes

### 1.3.1 Préparation des différentes solutions

Une faible et une forte concentration de chaque métal (Cd ; Hg) et de leur combinaison (Cd + Hg) a été considérée.

- Cadmium : 0,25 mg/kg et 2,5 mg/kg [représente respectivement la dose produisant des résultats sigificatif : 0. 25 mg/kg (Ganesh et Satish, 1994) et 10 foie cette concentration]
- Mercure: 0,12 mg/kg et 1,2mg/kg [représente respectivement les 1/10 et les 1/100 de la $DL_{50}$ (Bharat et *al.,* 2010)]
- Combinaisons de cadmium et de mercure : (0,25 mg/kg Cd + 0,12 mg/kg Hg) et (2,5 mg/kg Cd +1,2 mg/kg Hg)
- Une dose journalière de vitamine C (150mg/kg) a été utilisée tout au long de l'expérimentation.

Les différentes concentrations de solution ci-dessous sont fonction des différentes doses journalières, du poids moyen de chaque lot et du volume journalier administré aux rats (1 ml).



**Photo 21 : Les différentes solutions préparées au cours de l'expérimentation**

### 1.3.2 Répartition des rats et essais

Toutes les expériences sur des animaux ont été conduites selon les directives [CIOMS, 1985] sur l'utilisation des animaux pour l'étude expérimentale de toxicologie. Après les deux semaines d'acclimatation, les 65 rats sont répartis au hasard en 13 lots de 5 regroupés en 2 groupes de 6 lots et 1 lot témoin. Les 6 lots de rats du 1$^{er}$ groupe ont reçu des doses

journalières de cadmium, mercure et leur combinaison dans un volume final de 1mL d'eau. Les deux premiers lots (A, B) ont été exposés respectivement au chlorure de cadmium (0,25 mg/kg ; 2,5 mg/kg); deux autres lots ( C, D) ont reçu respectivement du chlorure de mercure (0,12 mg/kg ; 1,2 mg/kg) et les deux derniers lots de ce groupe (E , F) ont été traités respectivement avec la combinaison de ces deux métaux (0,25 mg/kg Cd + 0,12 mg/kg Hg) ; (2,5 mg/kg Cd +1,2 mg/kg Hg). Les six (6) lots du 2ème groupe ($A_C$, $B_C$, $C_C$, $D_C$, $E_C$, $F_C$) ont reçu respectivement en plus de ces différentes doses précédentes de métaux (Cd ; Hg ; Cd+Hg), une dose journalière de 150 mg/kg de Vitamine C pendant la même période. Le lot témoin (G) a reçu uniquement le même volume d'eau distillée (tableau X).

**Tableau IV: Répartition des lots**

| | | | Cadmium (Cd) (mg / Kg) | | Mercure (Hg) (mg / Kg) | | Vita-mine C (mg / Kg) | Eau Distillée |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Lots** | **Nbre** | **0,25** | **2,5** | **0,12** | **1,2** | **150** | **-** |
| **1er Groupe** | **A** | **5** | **x** | | | | | |
| | **B** | **5** | | **x** | | | | |
| | **C** | **5** | | | **x** | | | |
| | **D** | **5** | | | | **x** | | |
| | **E** | **5** | **x** | | **x** | | | |
| | **F** | **5** | | **x** | | **x** | | |
| **2ème Groupe** | **Ac** | **5** | **x** | | | | **x** | |
| | **Bc** | **5** | | **x** | | | **x** | |
| | **Cc** | **5** | | | **x** | | **x** | |
| | **Dc** | **5** | | | | **x** | **x** | |
| | **Ec** | **5** | **x** | | **x** | | **x** | |
| | **Fc** | **5** | | **x** | | **x** | **x** | |
| **Contrôle** | **G** | **5** | | | | | | **x** |

### 1.3.3 Mode d'administration

Une dose journalière de 1 ml de chacune des solutions précédentes (de cadmium, de mercure, des combinaisons (Cd+Hg), de Vitamine C et d'eau distillée) est administrée par

gavage (par sonde gastrique) pendant 28 jours consécutifs suivant la méthode de Alimba *et al.* (2006) et Awodele *et al.* (2010) (photo 22).

La vitamine C chez les lots concernés a été appliquée après l'administration des métaux lourds (le cadmium et le mercure et leur combinaison).



**Photo 22: Administration de la solution par gavage aux rats**

### 1.3.4 Observations cliniques et mesure de poids corporel

Pendant la période expérimentale, les animaux ont été soumis à un examen clinique de façon quotidienne. Certains signes comme la perte d'appétit, le refus de s'abreuver, la coloration de la muqueuse oculaire, les caractéristiques des déjections (diarrhéiques ou non), apparition d'abcès, disparition de poils, blessures étaient pris en compte. Le comportement des animaux était aussi observé pour apprécier d'éventuels problèmes d'origine digestive ou nerveuse. Le taux de mortalité était aussi évalué. Le poids corporel de chaque animal a été mesuré au début de l'expérience et une fois par semaine pendant 28 jours en utilisant la balance analytique électronique de marque Acculab® USA, Model-vic-303.




**Photo 23: Pesée des rats**

### 1.3.5 Prélèvement du sang par ponction du sinus rétro-orbitaire

A l'issue des 28 jours d'exposition, les rats ont été mis à jeun durant la nuit. Ils ont été pesés avant le prélèvement du sang et leur sacrifice et ceci pour déterminer le poids corporel final. Tous les prélèvements ont été effectués entre 7 h et 9 h du matin pour éviter les variations dues au rythme nycthéméral. Le sang entier a été obtenu à partir d'une ponction du sinus rétro-orbitaire par la méthode conventionnelle (Van Herck *et al*., 1992 ; Descat, 2002) sous une anesthésie légère de chloroforme. Cette méthodologie consiste à introduire lentement l'extrémité du microhématocrite (heparinized 70 ml micro – haematocrit capillary tubes) dans l'angle médial de l'œil. La progression à travers les tissus a été facilitée en imprimant une légère rotation à la pipette. La paroi des vaisseaux a été très fragile et dès qu'on atteint le plexus veineux, le sang jaillit dans l'espace périorbitaire et monte par capillarité dans la pipette qui a été mise dans des tubes avec anticoagulant (EDTA 8,5 %) pour les analyses hématologiques. Les échantillons de sang recueilli dans les tubes à anticoagulant EDTA (Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid) sont aussitôt retournés jusqu'au mélange avec l'anticoagulant à l'intérieur du tube et ceci pour éviter la coagulation et l'hémolyse du sang. Tous les échantillons de sang ont été marqués et immédiatement convoyés au laboratoire pour l'analyse.



**Photo 24 : Tube capillaire "heparinized 70 ml Micro-haematocrit capillary tubes"**



**Photo 25: Prélèvement sanguin**

### 1.3.6 Autopsie des rats et prélèvement d'organes

Les rats marqués après le prélèvement du sang sont :

- **sacrifiés par dislocation cervicale.**

  Cette technique consiste à :

  - Placer le pouce et l'index à la base du crâne et le tenir fermement en place ;
  - Effectuer une pression sur les doigts en tirant simultanément sur la base de la queue ;
  - S'assurer de la séparation du crâne et de la moelle épinière (espace vide entre la base du crâne et la colonne vertébrale).

- **Fixés et habillés sur une planche, la tête en extension**



**Photo 26 : Fixation du rat**



**Photo 27 : Habillage du rat**

- **Dissection**

Il est procédé à une incision médiane allant de la pointe du sternum à la région pubienne. Les muscles abdominaux sont inclinés révélant les viscères abdominaux pour un examen macroscopique du foie et des deux reins.



**Photo 28: Dissection de rat**

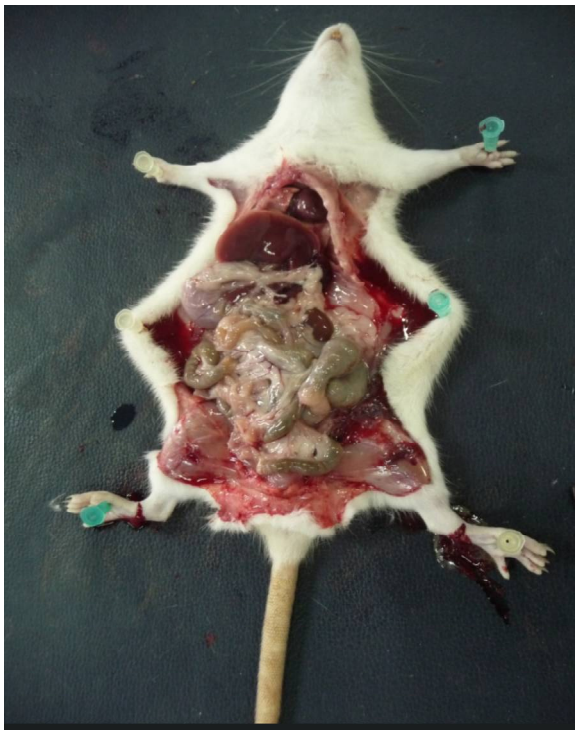


**Photo 29: Observation macroscopique**

- **Prélèvement des Organes cibles**

Le foie, les reins et le cerveau des animaux ont été chirurgicalement enlevés avec une paire de ciseaux et de scapel. Ces organes, conservés dans des tubes universels avec la solution tampon de formol 10% sont traités au laboratoire d'histologie à l'université d'Ibadan, Nigeria.



**Photo 30: Organes prélevés**



**Photo 31: Conservation des organes**

# II. Examens

## 2.1 Examens Hématologiques

Les paramètres hématologiques analysés sont : nombre de globules blancs (GB), nombre de globules rouges (GR), la concentration d'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (Ht), la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), le volume globulaire moyen d'un érythrocyte (VGM), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), le nombre de plaquettes (P) et le nombre de lymphocytes (L). Tous les paramètres hématologiques ont été analysés convenablement dans le laboratoire « Haematology Laboratory of the University of Lagos Teaching Hospital (ULTH)» au moyen de la méthode automatisée en utilisant l'analyseur automatique « haematology auto analyzer Sysmex KX-21N ».



**Photo 32 : Analyseur automatique Sysmex KX-21N**

### 2.2 Examens histopathologiques

- **Traitement des prélèvements : fixation, enrobage et coupe**

Des coupes du lobe droit du foie, du rein gauche et du cerveau gauche des animaux exposés et témoins sont découpées en pièces. Elles sont fixées au formol tamponné pendant 24 heures. Elles sont ensuite enrobées à la paraffine dans l'histokinette en respectant le programme automatique qui suit :

- Bain d'eau physiologique I (NaCl 9‰) 1 h
- Bain d'eau physiologique II 1 h

**Déshydratation**

- Bain d'éthanol 50° 1 h
- Bain d'éthanol 70° 1 h
- Bain d'éthanol 95°C 1 h
- Bain d'éthanol 95°C 1 h
- Bain d'éthanol 100°C 1 h
- Bain d'éthanol 100°C 1 h

**Eclaircissement**

- Bain de xylène I — 1 h
- Bain de xylène II — 1 h
- Bain de Xylène / Paraffine 1/1 — 1 h

**Imprégnation**

- Bain de paraffine pure 56°C — 6 h

Les coupes sont confectionnées à l'aide d'un microtome (microtome – drive model 103). Elles sont d'environ 3 à 5 µm d'épaisseur et sont étalées avec de la gélatine dans de l'eau distillée sur lames ordinaires pour la coloration.

- **Coloration à l'hémalun-éosine (HE)**

**Principe :** coloration dichromique. L'hémalun colore le noyau cellulaire en bleu et l'éosine colore le cytoplasme et les fibres conjonctives en rose.

**Mode opératoire :**

***Déparaffinage***

- Deux bains de xylène — (5 min x2)

***Hydratation***

- Bain d'éthanol absolu — 3 à 5 min
- Bain d'éthanol à 90°C — 3 à 5 min
- Bain d'éthanol à 70° — 3 à 5 min
- Bain d'eau courante — 3 à 10 min
- Bain d'eau distillée — (rinçage)

***Coloration à l'Hématéine-Eosine*** *(10 à 15min)*

- Bain d'eau courante — (rinçage)
- Bain d'eau ammoniacale — 30 sec à 1 min
- Bain d'eau courante — 15 min
- Coloration à l'Eosine — 10 sec

***Mordançage***

| | |
|---|---|
| • Bain de la solution de chlorure de calcium | 2 min |
| • Bain de la solution de calcium | 2 min |
| • Bain d'eau courante | (rinçage) |

***Déshydratation***

| | |
|---|---|
| • Bain d'éthanol 70° | 30 sec |
| • Bain d'éthanol 70° | 30 sec |

***Eclaircissement***

| | |
|---|---|
| • Bain de xylène | 30 sec |
| • Bain de xylène | 30 sec |

Monter à l'Eukitt, elles sont observées sur un microscope photonique de marque Olympus BX-41 muni d'une caméra (DSC-S730). Les observations sont faites au grossissement X 400. Les images sont enregistrées au format JPEG sur ordinateur et transférées sur clé USB.

## III. Traitement et analyses statistiques

Les résultats obtenus dans cette deuxieme partie sont exprimés en moyenne ± esm[1] de n expériences (ou n représente le nombre d'animaux utilisés). Les différences entre les rats traités et le contrôle ont été évaluées en utilisant le test de Students t-test p (T>t) = 0.05. Les logiciels utilisés sont Microsoft Excel 2010 et XL Stat 2011. Les différences sont statistiquement significatives si la valeur de P est inférieure à 0,05, et non significatif si la valeur de p est supérieure ou égale à 0,05.

# *TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION*

Cette partie de la thèse comprend deux étapes :

La première présente les résultats de pollution par les éléments traces métalliques (Plomb, cadmium et mercure) à Ganvié et évaluation de risque d'exposition de la population.

La deuxième aborde la présentation des résultats de la toxicité des métaux (cadmium et mercure) sur les rats et évaluation de l'effet protecteur de l'acide ascorbique « vitamine C ».

# Chapitre 1 : Pollution par les éléments traces métalliques (plomb, cadmium et mercure) à Ganvié et évaluation de risque d'exposition de la population.

## I. Evaluation du degré de pollution de l'écosystème de Ganviè par le plomb et le cadmium (Publication 1).

Les seuils de détection des appareils de mesure utilisés au Laboratoire de Gestion, Traitement, et Valorisation des Déchets (GTVD) de l'Université de Lomé pour les éléments et traces métalliques recherchés sont les suivants :

- Plomb : 0,02 mg/kg de poids frais ;
- Cadmium : 0,01 mg/kg de poids frais.

### 1.1 L'eau

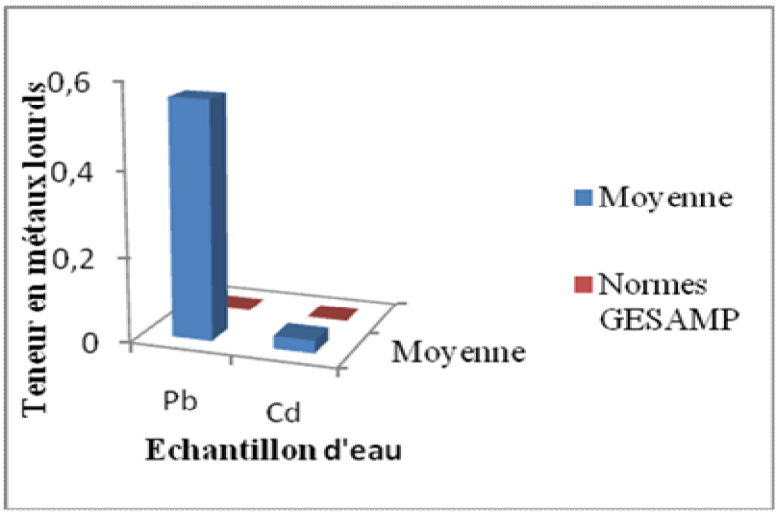



**Figure 3: Teneur moyenne (mg/L) en Pb et en Cd dans les échantillons d'eau**

De l'analyse de la figure 24, il ressort que la teneur moyenne en plomb (0,56mg/L) des différents sites de prélèvement est très élevée par rapport à la norme fixée par GESAMP (0,0004mg /L). De même, la teneur moyenne en cadmium (0,03mg/L) est plus élevée que la norme fixée par GESAMP (0,00021mg/L). Ces résultats nous amènent à dire que l'eau de Ganvié est très polluée en plomb et en cadmium.

### 1.2 Les sédiments

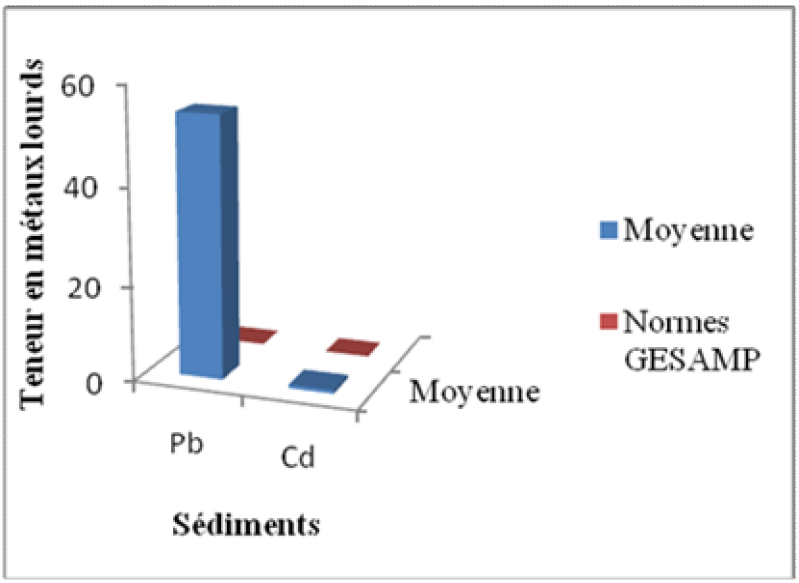



**Figure 4: Teneur moyenne (mg/L) en Pb et en Cd dans les Sédiments**

Il est à remarquer que la teneur moyenne en plomb (54,04 mg/kg) dans les sédiments des différents sites de prélèvement est très élevée et systématiquement supérieure à la norme fixée par GESAMP (19. $10^{-9}$ mg/kg). De même, la teneur moyenne en cadmium (0,74mg/kg) est plus élevée que la norme fixée par GESAMP (0,11 $10^{-9}$mg /kg). Il ressort de ces analyses que les sédiments de Ganvié sont fortement contaminés par le plomb et le cadmium.

### 1.3 Les poissons

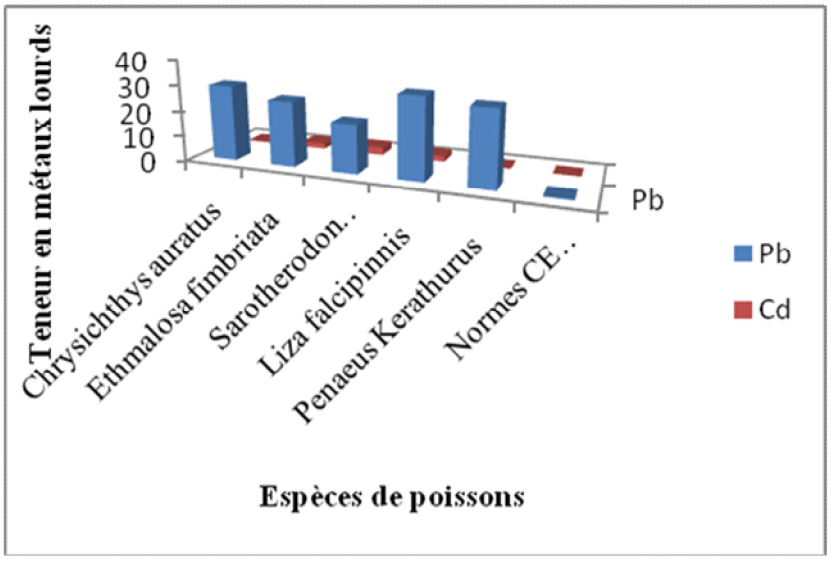



**Figure 5: Comparaison des teneurs(mg/kg) en métaux lourds dans les différentes espèces de poissons étudiés**

Il est constaté que toutes les espèces ont accumulé de façon exagérée le plomb. *Liza falcipinnis* a le plus accumulé (31,7mg/kg) suivie de *Chrysichthys auratus* (29,52 mg/kg) *et Penaeus Kerathurus* (29,52 mg/kg), puis *d'Ethmalosa fimbriata (*25,46 mg/kg) et enfin de *Sarotherodon melanotheron* (19,18mg/kg). Toutes ces valeurs enregistrées pour le plomb dépassent largement la norme fixée par le Règlement français CE 466/2001(0,2 à 0,4mg/kg).

Il ressort de l'analyse de cette figure que le cadmium a été aussi accumulé par les poissons. *Sarotherodon melanotheron* (2,193 mg/kg), *Ethmalosa fimbriata* (2,12mg/kg) et *Liza falcipinnis (*2,11mg/kg), *Chrysichthys auratus* (0,3mg/kg) et *Penaeus Kerathurus* (0,3mg/kg) présentent des teneurs au dessus de la norme CE 466/2001 (0,01 à 0,05mg/kg).

Le Facteur de contamination (F= concentration moyenne / concentration des normes) révèle le degré de contamination de l'eau, des sédiments et des poissons par le plomb et le cadmium. Ces facteurs de contamination enregistrés à la cité lacustre de Ganvié sont les suivants : Eau (F-Pb: 1400 ; F-Cd: 143) ; Sédiment (F-Pb: 2844 ; F-Cd: 6727) poisson (F-Pb: 67 ; F-Cd: 40).

### 1.4 Analyse de variance

Le test d'analyse de variance nous a permis de rechercher parmi les trois composantes étudiées (eau, sédiment et poisson), celle qui accumule, plus de métaux.

#### 1.4.1 Teneur en plomb

**Tableau V : Variance de la teneur en plomb dans les différentes composantes**

| Facteur | Nombre d'échantillons | Moyenne | Ecart type |
|---|---|---|---|
| Eau | 10 | 0,56 | 0,22 |
| Sédiment | 10 | 54,04 | 35,36 |
| Poisson | 30 | 26,81 | 12,50 |
| Total | 50 | 27,03 | 24,72 |

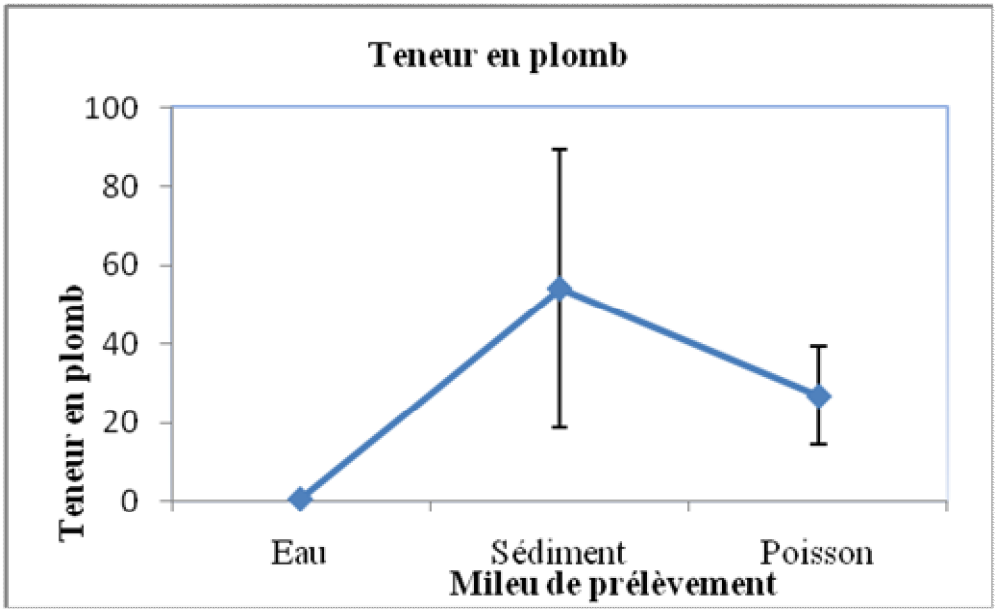



**Figure 6 : Variation de la teneur en Pb dans l'eau, les sédiments et les poissons**

### 1.4.2 Teneur en cadmium

**Tableau VI: Variance de la teneur en cadmium dans les différentes composantes**

| Facteur | Nombre d'échantillons | Moyenne | Ecart type |
|---|---|---|---|
| Eau | 10 | 0,02 | 0,03 |
| Sédiment | 10 | 0,67 | 0,68 |
| Poisson | 30 | 2,03 | 1,32 |
| Total | 50 | 1,314 | 1,32 |

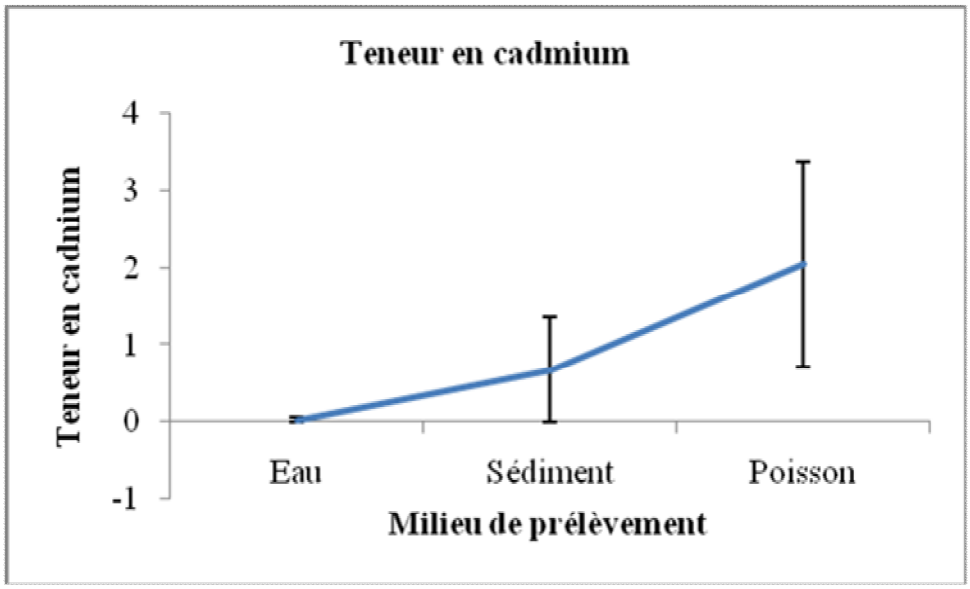



**Figure 7 : Variation de la teneur en Cd dans l'eau, les sédiments et les poissons**

L'analyse de la figure 27, révèle que les sédiments ont le plus accumulé le plomb, suivi des poissons et enfin l'eau. En considérant la figure 28, on constate que, les poissons ont plus accumulé le cadmium, suivi des sédiments et enfin l'eau.

Les teneurs moyennes en plomb (0,56mg/L) et en cadmium (0,03mg/L) enregistrées dans l'eau de Ganvié sont significativement plus élevées que les normes fixées par GESAMP (Groupe mixte d'Experts chargé d'étudier les Aspects Scientifiques de la Protection de l'Environnement Marin) (Pb : 0,0004mg/L et Cd : 0,00021mg/L). En comparaison avec les résultats obtenus dans différents travaux au Bénin, nos résultats diffèrent de ceux trouvés par Agonkpahoun en 2006 (Pb : 0,043 ; Cd : 0,0043), Montcho en 2005 (Pb : 0,000379 ; Cd : 0,000073), respectivement dans la rivière Okpara et dans le lac Nokoué. Les teneurs moyennes en plomb (54,04 mg/kg) et en cadmium (0,74 mg/kg) enregistrées dans les sédiments à Ganvié sont significativement plus élevées que celles obtenues dans l'eau (Pb: 0,56 ; Cd: 0,03) du même lac. Ces observations ont été approuvées par d'autres auteurs tels que Lau et *al. (*1998) et Eja et *al. (*2003) qui ont démontré que les sédiments accumulent plus de métaux toxiques que l'eau. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces métaux s'accumulent dans les sédiments, se solubilisent ensuite pour contaminer le milieu aqueux. Dans les sédiments, les concentrations moyennes en cadmium obtenues par Guédénon (2009) (3,309 mg/kg ; 3,112 mg/kg) respectivement dans le fleuve Ouémé et dans le lac Nokoué, Edorh et *al. (*2010) (0,93 mg/kg) dans le lac Nokoué, Agonkpahoun (2006) (0,93mg/kg) dans

le lac Nokoué sont supérieures à celles trouvées par la présente étude (0,74 mg/kg). Par contre, celles obtenues par Djossou (2009) (0,39 mg/kg) dans le lac Azili, Edorh et *al. (*2010) (0,17 mg/kg) dans le lac Nokoué lui sont inférieures. Ces variations de résultats pourraient être dues aux saisons, à la période d'échantillonnage, aux sites de prélèvements et aussi en rapport avec les différentes activités anthropiques qui s'y mènent. Dans les poissons, les teneurs moyennes des métaux étudiés (Pb : 26,80mg/kg ; Cd : 2,03 mg/kg) sont supérieures à la norme CE 466/2001 (Pb: 0,2mg/kg; Cd: 0,01mg/kg). Elles sont considérablement plus élevées que celles dans l'eau (Pb : 0,56 ; Cd : 0,02), ceci indique ainsi le phénomène de bioaccumulation (Ademoroti, 1996 ; Karadede et *al.,* 1998 ; Çalta et *al.,* 2000 ; Farkas et *al.,* 2000). La mise en parallèle d'une relation entre des contaminations de poissons et une pollution environnementale dans les sédiments n'est pas évidente à priori. Ainsi, dans certains cas, les sédiments renferment plus de métaux toxiques que les poissons. C'est le cas du plomb dans cette étude où la teneur moyenne dans les sédiments est de 54,04mg/kg et de 26,80mg/kg en ce qui concerne les poissons. Par contre dans d'autres cas, comme celui du cadmium, les poissons ont plus accumulé (2,04 mg/kg) que les sédiments (1,32mg/kg). *L'espèce Penaeus Kerathurus* a accumulé la même teneur en plomb (29,52mg/kg) que *Chysichthys auratus ;* mais *Liza falcipinnis* avec sa forte teneur (31,7 mg/kg), se révèle l'espèce la plus accumulatrice de plomb. Cette large capacité d'accumulation de métaux lourds observée chez certaines espèces en particulier les espèces de fond a été reportée par Nicolas et *al.,* 1987.

De ces deux métaux étudiés, le plomb semble être le plus fortement accumulé dans l'eau, dans les sédiments et dans les différentes espèces étudiées. Ce constat pourrait s'expliquer par la pression démographique à Ganvié, l'intensité du trafic routier et fluvial des hydrocarbures ainsi qu'une activité économique intense. En effet, la mauvaise gestion d'une grande quantité de déchets divers pourrait entraîner une contamination de l'écosystème aquatique. Le plomb étant principalement utilisé comme additif dans les carburants (Audry, 2003). Au Bénin l'essence est supposée être sans plomb depuis 2005 ; mais nos carburants sont-ils effectivement sans plomb ? Nous n'avons pas pu trouver d'étude portant sur le sujet?

Au regard de l'utilisation de cette eau polluée et de la consommation des poissons contaminés, ces teneurs présentent des risques pour la santé des populations. Par ailleurs, le plomb peut causer des troubles neurologiques, hématologiques, gastro-intestinaux, reproductifs, immunologiques et apoptotiques (Patrick, 2006 ; Xu *et al.,* 2008) . Une exposition excessive au cadmium pourrait causer la mort (Othumpangat *et al.,* 2005).

**Conclusion partielle**

L'eau et les sédiments de Ganvié sont pollués par le plomb et le cadmium. Toutes les différentes espèces de poissons ont accumulé de façon exagérée le plomb et le cadmium. La population consommatrice de ces espèces contaminées court un risque de santé.

## II. Risque d'exposition de la population au Pb et au Cd via la consommation des poissons (Publication 2)

L'évaluation de risque d'exposition liée au plomb et au cadmium via la consommation des poissons a été effectuée consécutivement à la mesure du niveau élevé de pollution du système aquatique du village lacustre de Ganvié par des études récentes. Cette évaluation est faite chez des adultes et des enfants par le calcul des DJE en croisant les niveaux moyens de contamination des poissons en plomb et en cadmium avec les niveaux de consommation alimentaire de ces denrées. Pour cela, trente six échantillons de trois espèces de poissons ont été prélevés dans le lac Nokoué, aux abords du village lacustre de Ganvié puis dosés en plomb et cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique. Les teneurs moyennes en plomb et en cadmium dépassent les limites admises : 26,80 ± 0,57 ppm (contre 0,4 ppm) pour le Pb et 1,79 ± 0,29 ppm (contre 0,05 ppm) pour le Cd.

### 2.1 Identification des risques

Les principaux effets toxiques résultant de la consommation d'aliments contaminés par le cadmium concernent le système rénal. Ces effets néphrotoxiques se caractérisent par une atteinte des tubules proximaux et une élévation de l'excrétion urinaire de protéines de faible poids moléculaire associés à des lésions osseuses. Une exposition au cadmium pourrait conduire, chez l'homme à une baisse de la mobilité et de la densité des spermatozoïdes et chez la femme à une diminution du poids du nouveau-né à la naissance.

Pour le plomb dont 95 % sont fixées dans les globules rouges, l'anémie est la manifestation biologique de toxicité dont la prévalence et la sévérité sont directement corrélées à la plombémie. Plusieurs enquêtes épidémiologiques suggèrent fortement une relation entre l'exposition au plomb et l'hypertension artérielle, même à des niveaux d'exposition très faibles comparables à ceux auxquels une très large fraction de la population est exposée. Mais la néphropathie saturnine est associée à une exposition à des niveaux élevés de plomb pendant plusieurs années. Plus préoccupantes encore sont les conséquences de

l'exposition à de faibles doses de plomb sur l'apparition d'anomalies congénitales et le développement neuro-comportemental pendant la petite enfance.

### 2.2 Valeurs toxicologiques de référence

L'AFSSA a retenu respectivement pour le cadmium et le plomb les valeurs de 1 µg/kg et de 3,6 µg/kg de poids corporel comme recommandation de dose journalière admissible (AFSSA, 2003). D'après le règlement français 466/2001, la concentration maximale autorisée de Cd dans les poissons est de 0,05 mg/kg et de 0,4 mg/kg pour le plomb.

### 2.3 Estimation de l'exposition et niveaux de contamination des poissons.

- **Recueil des données de consommation des poissons**

Le tableau XIII résume les données recueillies sur le niveau de consommation des poissons dans la zone d'étude.

**Tableau VII : Résultats de l'enquête sur la quantité de consommation des poissons**

| Fréquence de consommation | Quantité (g) | % Enfants |
|---|---|---|
| Au moins 1fois/J | 25 | 15 |
| | 50 | 34 |
| | 75 | 20 |
| | 100 | 11 |
| | 150 | 9 |
| | 175 | 7 |
| | 200 | 2 |
| | 250 | 1 |
| | 300 | 1 |
| Moyenne/enfant | 83,25 | 100 |

Les quantités ont été estimées suivant des images de poissons présentées sur des supports auprès des parents qui donnent au moins une fois le poisson à leurs enfants dans une journée.
La quantité moyenne minimale de poisson consommée par enfant dans une journée est la médiane M :
$M = (25 \times 15 + 50 \times 34 + 75 \times 20 + 100 \times 11 + 150 \times 9 + 175 \times 7 + 200 \times 2 + 250 \times 1 + 300 \times 1)/100 = 83{,}25$ g.

- **Mesure du plomb et du cadmium dans les échantillons de poisson**

Le tableau XIII présente les résultats des dosages de plomb dans les échantillons de poissons.

**Tableau VIII : Teneur du plomb dans les poissons**

| Substance recherchée | Echantillons | Niveau de contamination des poissons en métaux lourds (mg/kg) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Chrysichthys auratus | Sarotherodon melanotheron | Liza falcipinnis |
| **Pb** | 1 | 23,12 | 13,12 | 35,21 |
| | 2 | 28,42 | 21,02 | 30,17 |
| | 3 | 31,49 | 19,48 | 32,69 |
| | 4 | 29,59 | 17,13 | 34,01 |
| | 5 | 27,44 | 20,18 | 32,54 |
| | 6 | 29,12 | 18,59 | 32,02 |
| | 7 | 32,56 | 21,01 | 29,87 |
| | 8 | 32,57 | 19,44 | 30,12 |
| | 9 | 30,34 | 16,98 | 31,65 |
| | 10 | 28,22 | 20,12 | 29,87 |
| | 11 | 27,93 | 22,06 | 31,78 |
| | 12 | 33,44 | 21,03 | 30,47 |
| | Moyenne±Ecart-type | 29,52±2,84 | 19,18±2,46 | 31,70±1,71 |
| | **Moyenne générale ± Ecart-type** | | **26,80±0,57** | |

Il y a une différence significative ($p < 0,05$) entre S. melanotheron et L. falcipinnis. Pour les autres moyennes, il n'y a pas de différence significative ($p > 0,05$). Cependant, étant donné qu'il s'agit d'une exposition, on peut calculer la quantité moyenne de Pb que peut ingérer un enfant via la consommation de ces trois espèces de poisson, ce qui est de 26,8 ± 0,57 mg/kg.

Le tableau XV présente les résultats des dosages du cadmium dans les échantillons de poissons.

**Tableau IX : Teneur du cadmium dans les poissons**

| Substance recherchée | Echantillons | Niveau de contamination des poissons en métaux lourds (ppm) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Chrysichthys auratus | Sarotherodon melanotheron | Liza falcipinnis |
| **Cd** | 1 | 0,23 | 2,22 | 2,18 |
| | 2 | 0,26 | 2,56 | 3,31 |
| | 3 | 0,41 | 3,32 | 2,12 |
| | 4 | 0,27 | 2,55 | 2,54 |
| | 5 | 0,32 | 4,02 | 1,98 |
| | 6 | 0,13 | 1,88 | 1,65 |
| | 7 | 0,57 | 3,12 | 3,04 |
| | 8 | 0,47 | 2,74 | 2,02 |
| | 9 | 0,33 | 3,42 | 1,13 |
| | 10 | 0,18 | 3,91 | 1,34 |
| | 11 | 0,22 | 2,86 | 2,22 |
| | 12 | 0,21 | 2,92 | 1,79 |
| | Moyenne±Ecart-type | 0,3±0,12 | 2,96±0,64 | 2,11±0,63 |
| | Moyenne générale± Ecart-type | | 1,79±0,29 | |

Il n'y a pas de différence significative entre les trois moyennes prises deux à deux ($p > 0,05$). On peut donc calculer la quantité moyenne de Cd que peut ingérer un enfant via la consommation de ces trois espèces de poisson, ce qui est de 1,79± 0,29 mg/kg.

### 2.4 Caractérisation du risque : calcul de la DJE

On rappelle que la Dose Journalière d'Exposition ou Dose Journalière Admise pour un métal se calcule en croisant les données de consommation de l'aliment contaminé par le métal avec la moyenne des teneurs du toxique mesurées dans l'échantillon.

- **Pour les espèces de poissons contaminées par le Pb et consommées par les enfants on a :**

**$DJE_{Pb} = (Q \times C_{Pb})/PC$**

Avec :

$DJE_{Pb}$ : dose journalière d'exposition pour le plomb en µg/kg/jour
Q : quantité moyenne de poisson consommée par un enfant en kg
$C_{Pb}$ : concentration moyenne en plomb mesurée dans les trois espèces de poisson en µg /kg
PC : poids corporel du consommateur (enfant) en kg

Q = 83,25 g/j = 0,083 kg/j

$C_{Pb}$ = 26,80 mg/kg = 26800 µg /kg

PC = 20 kg (AFSSA, 2003).

D'où : $DJE_{Pb}$ = (0,083 kg/j x 26800 µg/kg)/20 kg = **111,22 µg /kg**

Pour un adulte de 65 kg cette DJEe donnera **34,22 µg /kg**

- **Pour les espèces de poissons contaminées par le Cd et consommées par les enfants on a :**

**$DJE_{Cd} = (Q \times C_{Cd})/PC$**

Avec :

$DJE_{Cd}$ : dose journalière d'exposition pour le plomb en µg/kg/jour
Q : quantité moyenne de poisson consommée par un enfant en kg
$C_{Cd}$ : concentration moyenne en plomb mesurée dans les trois espèces de poisson en µg /kg
PC : poids corporel du consommateur (enfant) en kg

$Q_{Cd}$ = 83,25 g/j = 0,083 kg/j

$C_{Cd}$ = 1,79 mg/kg = 1790 µg /kg

PC = 20 kg (AFSSA, 2003).

D'où : $DJE_{Cd}$ = (0,083 kg/j x 1790 µg/kg)/20 kg = **7,42 µg /kg**

Pour un adulte de 65 kg cette DJEe donnera **2,28 µg /kg**

A ces $DJE_{Pb}$ et $DJE_{Cd}$ doit s'ajouter l'exposition au plomb et au cadmium via l'alimentation générale.

Le tableau XVI montre pour un enfant la quantité de plomb et de cadmium apportée par l'alimentation journalière moyenne (AJM) et la DJE de l'alimentation générale (AFSSA, 2003).

**Tableau X : Apports journaliers moyens et doses journalières d'exposition alimentaire au plomb et au cadmium**

| | Plomb | Cadmium |
|---|---|---|
| AJM enfant 3 à 8 ans | 52 µg/jour | 7,6 µg/jour |
| DJE al enfant (20 kg) | 2,60 µg/kg/jour | 0,38 µg/kg/jour |
| DJE al adulte (≥65 kg) | 0,68 µg/kg/jour | 0,16 µg/kg/jour |

Donc la **$DJE_{enfant}$ = DJE e + DJE al**

DJE enfant = dose journalière d'exposition totale pour un toxique en µg/kg/jour
DJE e = dose journalière d'exposition apportée par la consommation de poissons contaminés par un toxique en µg/kg/jour
DJE al = dose journalière d'exposition à un toxique apportée par l'alimentation générale en µg/kg/jour.

D'où :

Pour le Pb : $DJE_{enfant}$ = 111,22 µg /kg/j + 2,60 µg/kg/j = **113,80 µg /kg/j**

Pour le Cd : $DJE_{enfant}$ = 7,42 µg /kg/j + 0,38 µg/kg/j = **7,80 µg /kg/j**

Théoriquement, étant donné que les repas sont souvent les mêmes au sein des foyers, pour un adulte, on aura :

**DJE adulte = (DJE enfant × $PM_{enfant}$) $PM_{adultes}$**

DJE enfant = dose journalière d'exposition chez l'enfant en µg/kg/jour
DJE adulte = dose journalière d'exposition de l'adulte en µg/kg/jour
PM = Poids Moyen d'un adulte = 65 kg

D'où :

Pour le Pb : DJE adulte = (113,80 µg /kg/j × 20)/65 = **35,01 µg /kg/j** (ou encore 34,22 µg /kg + 0,68 µg/kg/jour = 34,90 ≈ 35 µg /kg/j)

Pour le Cd : DJE adulte = (7,80 µg /kg/j × 20)/65 = **2,40 µg /kg/j** (ou encore 2,28 µg /kg + 0,16 µg/kg/jour = 2,44 ≈ 2,40 µg /kg/j)

### 2.5 Calcul des quotients de danger

Le quotient de danger est défini par le rapport entre la DJE observée en moyenne et la DJT correspondante, selon la formule :

**QD = DJEtotale /DJT**

Avec :

QD = quotient de danger

DJEtotale = dose journalière d'exposition totale en µg/kg/jour

DJT = dose journalière tolérable en µg/kg/jour du plomb = 3,5 µg/kg/jour

Pour les enfants :

Pour le Pb : QD = 113,80 µg /kg/j/3,6 µg/kg/jour = **31,60**

Pour le Cd : QD = 7,80 µg /kg/j/1 µg/kg/jour = **7,80**

Pour les adultes :

Pour le Pb : QD= 35,01 µg /kg/j/3,6 µg/kg/jour = **9,72**

Pour le Cd : QD= 2,40 µg /kg/j/1µg/kg/jour = **2,40**

Le tableau XVII récapitule les principaux résultats de l'évaluation de l'exposition au Pb et au Cd par la consommation des poissons contaminés dans le village lacustre de Ganvié.

**Tableau XI : Récapitulatif des résultats de l'évaluation de l'exposition au Pb et au Cd**

| | Q (kg/j) | Ce (mg/kg) | PC (kg) | | DJE (µg /kg/j) | | DJE total (µg/kg/jour) | | QD | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | enfant | adulte | Enfant | Adulte | enfant | adulte | enfant | Adulte |
| Plomb | | 26,80 | | | 111,22 | 34,22 | 113,80 | 35,01 | 31,60 | 9,72 |
| | 0,083 | | 20 | 65 | | | | | | |
| Cadmium | | 1,79 | | | 7,42 | 2,28 | 7,80 | 2,40 | 7,80 | 2,40 |

DJE : dose journalière d'exposition en µg/kg/jour
DJE total : dose journalière d'exposition totale en µg/kg/jour
Q : quantité moyenne de poisson consommée par un enfant en kg
$C_e$: concentration moyenne de plomb ou de cadmium mesurée dans les trois espèces de poisson en mg/kg
PC : poids corporel du consommateur en kg
QD = quotient de danger

**Discussion**

L'évaluation de l'exposition au plomb et au cadmium de la population cible dans le village lacustre de Ganvié a nécessité l'exploitation de deux sources de données suivant Ricoux et Gasztowtt (2005): les informations apportées par le questionnaire de consommation (Tableau XII) et les résultats des mesures de plomb et de cadmium dans les échantillons de poisson (Tableau XIII et Tableau XIV). Seules les teneurs moyennes en plomb entre *S. melanotheron* et *L. falcipinnis* sont significativement différentes ($p < 0,05$). Pour les autres résultats, il n'existe pas de différence significative ni pour le plomb ni pour le cadmium ($p > 0,05$) d'une espèce de poisson à l'autre. Respectivement pour le Pb et le Cd on note une moyenne de 26,80 ± 0,57 ppm et de 1,79 ± 0,29 ppm. Les normes de l'OMS (1998) pour la limite des concentrations étant respectivement 0,4 ppm et de 0,05 ppm, la DJE chez un enfant de 20 kg a été de 111,22 µg /kg pour le Pb et de 7,42 µg /kg pour le Cd. Ces valeurs de la DJE largement supérieures aux limites admises par l'OMS (1998) qui sont dans cet ordre de 3,6 et de 1 µg/kg sont de loin plus alarmantes que celles obtenues avec les adultes de 65 kg qui sont respectivement de 34,22 µg /kg et de 2,28 µg /kg. Cependant, à cette DJE obtenue chez les enfants doit être ajoutée la dose journalière apportée par l'alimentation générale (DJEal), étant donné que les enfants sont exposés à ce même métal via d'autres aliments de la même façon que la population générale (Ricoux et Gasztowtt, 2005). Les apports journaliers moyens (AJM) et les doses journalières d'exposition (DJEal) apportés par l'alimentation générale juste pour le plomb (Tableau XV) supposent que les autres denrées alimentaires sont contaminées de la même façon que les poissons. La dose journalière d'exposition totale respectivement au plomb et au cadmium est plus faible chez les adultes (35,01 et 2,40 µg /kg/j) que chez les enfants (113,80 et 7,80 µg /kg/j). Le quotient de danger est dans tous les cas très largement supérieur à 1 pour les enfants (31,60 et 7,80) et plus proche de 1 pour les adultes (9,72 et 2,40). Ainsi, les enfants paient un double tribut à cette pollution car, non seulement ils sont plus exposés et leur organisme est plus fragile. Les enfants sont davantage exposés vu qu'ils consomment, par rapport à leur poids, au-delà de deux fois plus d'aliments que les adultes et que les contaminants sont plus facilement absorbés dans leur organisme (RCAP, 1996). Les contaminants ingérés, comme les métaux, peuvent être encore plus nocifs pour eux. L'organisme de l'enfant absorbe potentiellement plus de contaminants et ne peut pas les éliminer aussi facilement que l'adulte vu que son système d'évacuation est moins développé. Les enfants passent plus de temps à jouer dehors et sont plus exposés aux

contaminants aéroportés (RCAP, 1996) qui entrent également d'une manière ou d'une autre dans l'exposition générale. Par ailleurs, il y a un excès de risque pour une consommation moyenne de 83 g/j de poisson contaminé dans le village de Ganvié, ce qui n'est pas le cas chez les adultes où le risque s'avère théoriquement moins élevé. Les adultes sont les principales victimes de contamination ou d'intoxication au plomb et au cadmium mais lorsque les jeunes enfants sont touchés, leur santé se trouve particulièrement en danger. De très faibles quantités de métaux peuvent entraver leur développement cognitif et causer des problèmes d'attention. En outre, une proportion importante des polluants en particulier le plomb introduit dans leur corps, environ 25 %, reste en circulation et exerce ses effets neurotoxiques. A titre comparatif, chez les adultes, seulement 5 % à 10 % du plomb absorbé demeure en circulation. Le reste se fixe dans les os et les dents (Sanborn *et al.,* 2002). Les doses journalières d'exposition au plomb, via la consommation des espèces de poisson Liza falcipinnis, Sarotherodon melanotheron, Chrysichthys auratus se sont avérées en général plus élevées par rapport à la DJE apportée par l'alimentation générale (111,22 µg /kg/j > 2,60 µg/kg/j pour le Pb et 7,42 µg /kg/j > 0,68 µg/kg/j pour le Cd), ce qui suppose que l'exposition au plomb est plus importante via la consommation des poissons que par d'autres sources alimentaires. Le tableau XVI récapitule l'ensemble des résultats de cette évaluation de l'exposition. Par ailleurs, les données observées dans la population d'étude peuvent être extrapolées à l'ensemble des enfants de la région en raison de la relative homogénéité des moyennes des teneurs en plomb et en cadmium trouvées dans les poissons (Ricoux et Gasztowtt, 2005), mis à part la différence significative qu'il y a entre S. melanotheron et L. falcipinnis.

**Conclusion partielle**

Connaissant les effets du plomb et du cadmium sur la santé au regard de l'identification des risques, cette situation ne peut perdurer ; mais, il convient de rappeler que le moyen le plus efficace pour diminuer un risque sanitaire, reste sa réduction à la source c'est-à-dire la dépollution des eaux du lac Nokoué. Cela interpelle donc les utilisations des engrais chimiques et des pesticides dans les plantations environnantes, les rejets des ordures ménagères et résidus solides de tout genre dans le lac ainsi que la décharge accidentelle de l'essence frelatée de la contrebande des produits pétroliers. La dépollution d'une grande étendue d'eau nécessite beaucoup de moyens financiers et aussi le temps. Ainsi en attendant la réalisation de cette solution nous pouvons aussi penser à l'utilisation des compléments alimentaires jouant le rôle d'antioxydant.

# III. Evaluation du degré de contamination de la cité lacustre de Ganvié par le mercure

## 3.1 L'eau

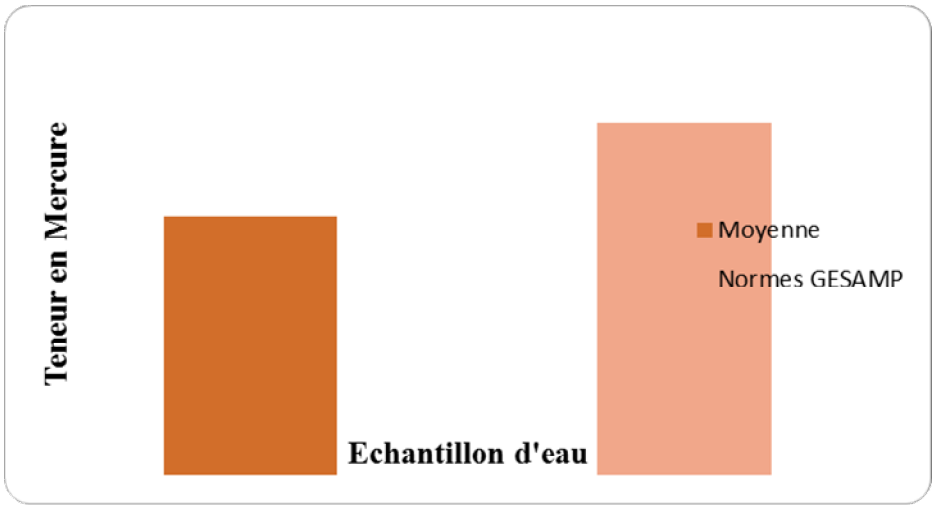



**Figure 8: Teneur moyenne (µg/L) en Hg dans les échantillons d'eau**

De l'analyse de la figure 29, il ressort que la teneur moyenne en mercure (0,176 µg /L) dans l'eau sur les différents sites de prélèvement ne dépasse pas la norme fixée par GESAMP (0,01 à 0,24 µg /L). Ces résultats nous amènent à dire que le mercure est bien présent dans l'eau de Ganvié mais ne dépasse pas les limites admises.

## 3.2 Les sédiments

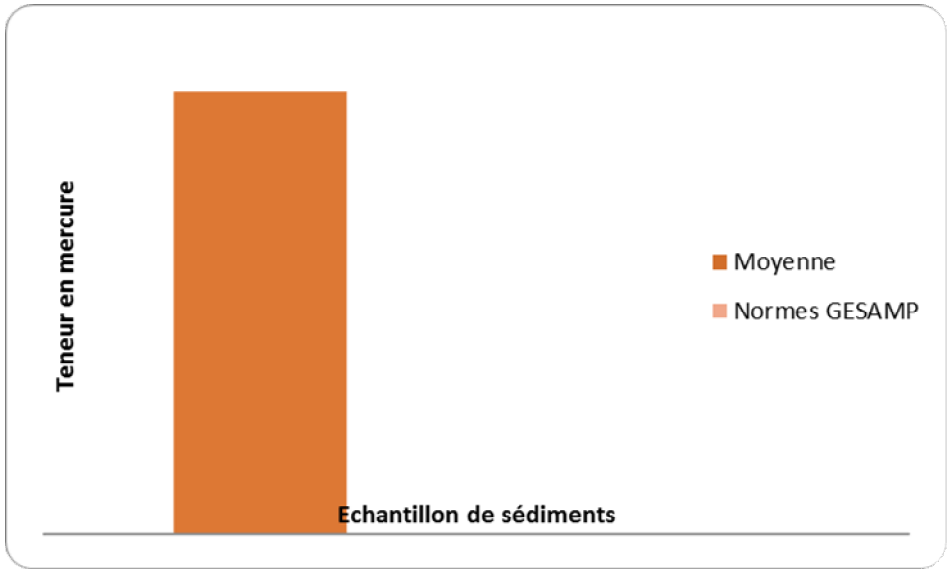



**Figure 9: Teneur moyenne (mg/kg) en Hg dans les Sédiments**

Il est à remarquer que la teneur moyenne en mercure (0,143 mg/kg) dans les sédiments des différents sites de prélèvement est largement supérieure à la norme fixée par GESAMP ($0,05\ 10^{-9}$ à $0,3\ 10^{-9}$ mg/Kg). Il ressort de ces analyses que les sédiments de Ganvié sont pollués par le mercure.

### 3.3 Les poissons

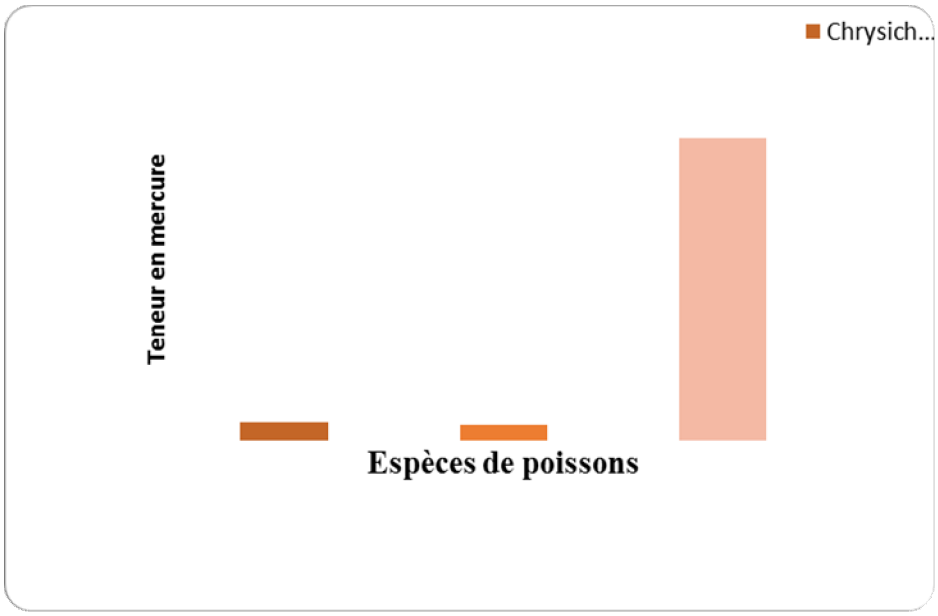



**Figure 10 : Comparaison des teneurs(mg/kg) en Hg dans les différentes espèces de poissons étudiés**

Il est constaté que toutes les espèces renferment dans leur chair fraîche du mercure. *Chrysichthys auratus* a plus accumulé (0,028 mg/kg) que *Sarotherodon melanotheron* (0,024 mg/kg). Toutes ces valeurs enregistrées pour le mercure ne dépassent pas la norme fixée par le Règlement français CE 466/2001(0,5 mg/kg).

Il ressort de l'analyse de cette figure que le mercure a été identifié dans la chair musculaire fraîche de tous les poissons de différentes espèces échantillonnées.

### 3.4 Analyse de variance

Le test d'analyse de variance nous a permis de rechercher parmi les trois composantes étudiées (eau, sédiment et poisson), celle qui accumule, plus de mercure.

**Tableau XII : Variance de la teneur en mercure dans les différentes composantes**

| Facteur | Nombre d'échantillons | Moyenne | Ecart type |
|---|---|---|---|
| **Eau** | 10 | 0,176 $10^{-9}$ | 0,050 |
| **Sédiment** | 10 | 0,143 | 0,002 |
| **Poisson** | 12 | 0,026 | 0,002 |
| **Total** | 32 | 0,056 | 0,062 |

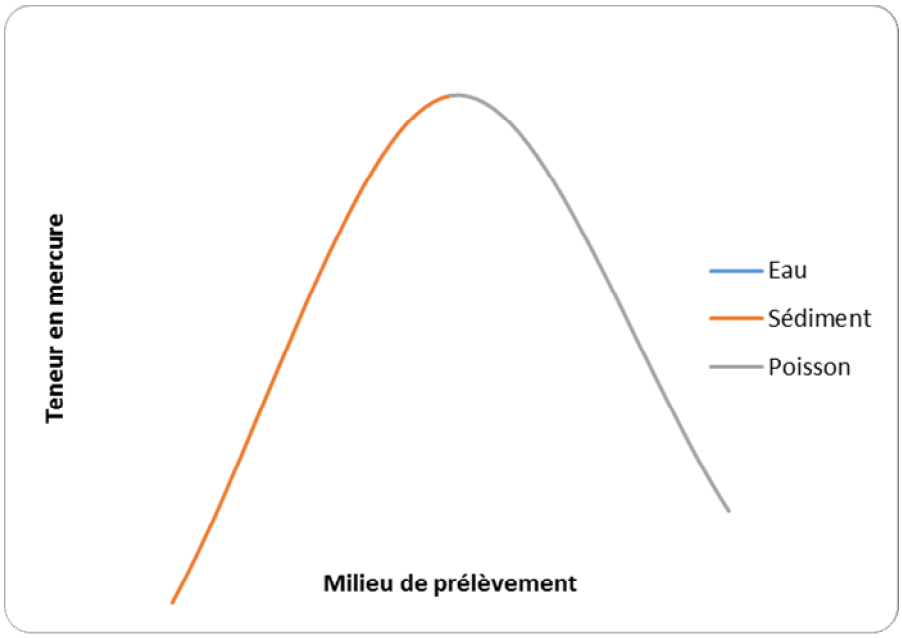



**Figure 11: Variation de la teneur en Hg dans l'eau, les sédiments et les poissons**

Il ressort de l'analyse de la figure 32, que les sédiments ont le plus accumulé le mercure, suivi des poissons et enfin l'eau.

**Discussion**

La teneur moyenne en mercure (0,176 µg /L) dans l'eau sur les différents sites de prélèvement ne dépasse pas la norme fixée par GESAMP (0,01 à 0,24 µg /L). Ce résutat rejoint les travaux de Maiaa (2008) qui a enrégistré des faibles teneurs en mercure (0,12 à 0,28 pmol / L et 1,09 à 3,67 pmol/g) dans le lac « varzea do Curuai » au Brésil. Il justifie alors

cet appauvrissement par l'absorption biologique de MeHg par les phytoplanctons particulièrement abondant.

Les sédiments pollués (0,143mg/kg), renferment plus de mercure, suivis des poissons (0,02 mg/kg) et enfin l'eau (0,176 µg /L). Ces observations ont été approuvées par d'autres auteurs tels que Lau et *al. (*1998) et Eja et *al. (*2003) qui ont démontré que les sédiments accumulent plus de métaux toxiques que l'eau. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le mercure s'accumule dans les sédiments, se solubilise ensuite pour contaminer le milieu aqueux. Les poissons vivant dans l'eau déjà contaminée bioaccumulent au fil du temps ce métal très toxique. Ce qui justifie la teneur élévée de mercure enregistrée dans les poissons par rapport à l'eau. Cette concentration de mercure dans les différents composantes (sédiments, poissons et eau) a été prouvée par les travaux de Saiki *et al.,* 2010 réalisés dans le réservoir « Bear River » à California. Ce phenomène de bioaccumulation du mercure est vérifé par d'autres auteurs comme (Paulsson et Lundbergh, 1991 ; Southworth *et al.,* 2000). Bien que les poissons soient exposés au mercure de l'eau et de la nourriture, la bioaccumulation du mercure par la chaîne alimentaire joue un rôle plus important dans la détermination de la teneur en mercure (Hall *et al.,* 1997; Wiener *et al*., 2003). Les poissons assimilent 65-80% du méthylmercure dans la nourriture qu'ils mangent et éliminent probablement le méthylmercure lentement relativement aux taux pris (Wiener *et al.,* 2003), ayant pour résultat une augmentation nette des teneurs en mercure. C'est une raison que les concentrations en mercure augmentent typiquement avec la taille et l'âge des poissons (Lange *et al.,* 1994;Wiener *et al.,* 2003).

Les teneurs moyennes en mercure dans la chair fraîche *de Chrysichthys auratus* est de 0,028 mg/kg et de 0,024 mg/kg pour *Sarotherodon melanotheron*. Ces deux teneurs sont en dessous de la norme CE 466/2001 (0,05mg/kg). Ces résultats obtenus au cours de cette étude sont similaires à ceux de Dégila (2011) qui a eu comme teneur moyenne en mercure (0,02 mg/kg) dans l'espèce *Salothérondon melanotheron* échantillonnée sur huit différents sites du lac Nokoué. Une brève comparaison de nos résultats à ceux obtenus au niveau des poissons de quelques cours d'eau de la sous région montre que les teneurs moyennes que nous avons eues pour le mercure (0,026 mg/kg) sont inférieures à celles obtenues par Biney (1991) au Ghana dans le bassin de Kpong et la rivière Wiwi qui sont respectivement de 0,053 et 0,37mg/kg de poids frais. Selon Machiwa (2004) dans le lac victoria en Tanzanie, les teneurs en mercure dans trois différentes espèces de poissons (*Lates niloticus* 0,006mg/kg *; Oreochromis*

*Niloticus* 0,011 mg/kg ; *Clarias gariepinus* 0,006mg/kg) sont inférieures à celles obtenues par notre étude.

Parmis les métaux étudiés le mercure semble être celui qui présente le moins de risques sanitaires pour l'homme. Mais il est à notifier que ce métal présent sous forme de méthyl mercure dans les poissons est très dangereux à très faible dose (Dégila, 2011). Plusieurs chercheurs (Grieb *et al.,* 1990; Bloom, 1992; Wiener et Spry 1996 ; Mason *et al.,* 2006) ont rapporté qu'approximativement 95 - 99% de mercure dans la chair musculaire des poissons est sous la forme du méthylmercure. Le méthylmercure, la forme la plus toxique du Hg, peut représenter jusqu'à près de 100% du Hg total dans les poissons de fin de chaîne trophique (Stein *et al.,* 1996 ; Horvat, 1999).

**Conclusion partielle**

Le mercure est présent dans l'eau, les sédiments et les poissons de la cité lacustre de Ganvié. Il est fortement concentré dans les sédiments, puis des poissons et enfin l'eau. Etant un métal très dangereux sous forme méthylé à très faible dose, la bioaccumulation dans la chaîne alimentaitre et aussi la consommation d'autres produits contaminés par ce même métal confronte l'homme dernier maillon de la chaîne alimentaire à un danger.

# Chapitre 2 : Résultats de la toxicité des métaux (cadmium et mercure) sur les rats et évaluation de l'effet protecteur de l'acide ascorbique « vitamine C »

## I. Signes clinques de toxicité

Pendant la durée d'exposition, les rats ont montré les signes cliniques de toxicité tels que : apparition d'abcès sur la joue (photo 33), blessure sur la queue (photo 34), la perte de poils notamment le dos et le bras (photos 35 et 36) ; chez les lots de rats traités avec la forte concentration de mercure (photos 33; 36) et la combinaison de la forte concentration de cadmium et de mercure (photos 34; 35).

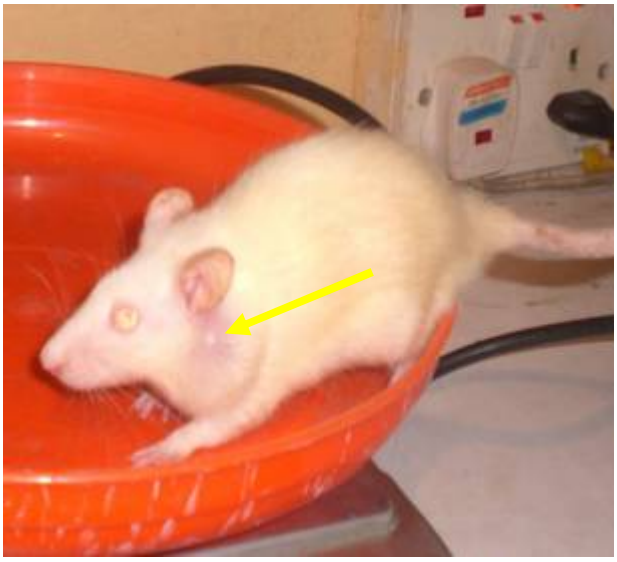


**Photo 33: Abcès sur la joue**

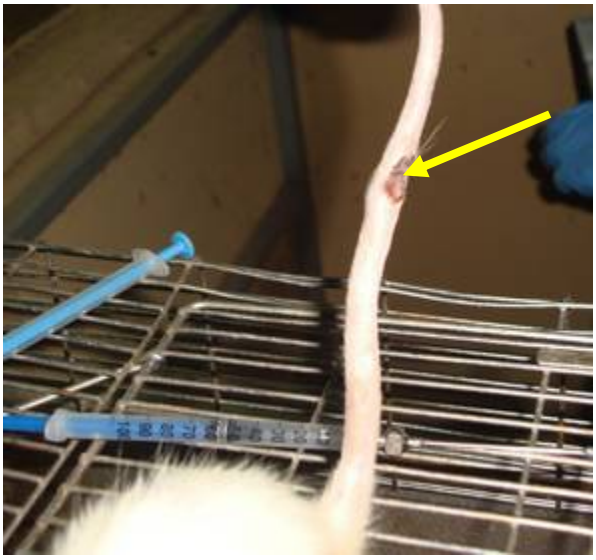


**Photo 34**: **Blessure sur la queue**



**Photo 35 : Perte de poils sur le dos**

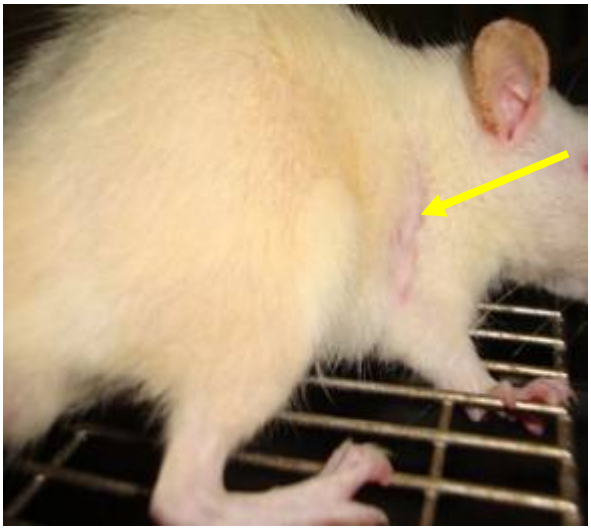


**Photo 36: Perte de poils sur le bras**

Des observations semblables faites par Alimba *et al.* (2012) ont noté une perte de poils et une apparition d'abcès chez les rats exposés au lixiviat de décharge qui renferme des métaux lourds après analyses. De même Boujelbene *et al.* (2002) après des expérimentations confirment que les poils constituent un biomarqueur d'exposition fiable pour mettre en évidence une intoxication au cadmium.

## II. Variation des paramètres hématologiques et effet protecteur de la vitamine C

### 2.1 Toxicité (Publication 3)

Les variations hématologiques sont les premiers indicateurs des effets toxiques sur les tissus (Paprikar et Sharma, 2003). Le sang est le tissu le plus important, dans lequel les changements des processus métaboliques continuent. Le changement anormal des paramètres de sang est l'indicateur fiable des effets toxiques des xénobiotiques (Lodia et Kansala, 2012).

Le cadmium et le mercure sont largement dispersés dans l'environnement et sont, en concentration excessive toxique pour l'être humain (Jarup, 2003). A cet égard cette partie de l'étude a été conçue pour étudier l'effet des doses chroniques de cadmium, de mercure et la combinaison de ces deux métaux sur les rats pendant 28 jours. Les paramètres hématologiques analysés sont : Globule Blanc (GB $X10^3/\mu L$), Globule Rouge (GR $X10^6/\mu L$), Hémoglobine (Hb g/dL), Hématocrite (Ht %), Volume Globulaire Moyen (VGM fL), Taux Corpusculaire Moyen en Hémoglobine (TCMH pg), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH g/dL), Plaquettes (P $X10^3/\mu L$) et Lymphocytes (L %). Les valeurs moyennes et écart-type des paramètres hématologiques du sang des rats exposés au cadmium, au mercure et à la combinaison des deux métaux à diverses concentrations sont présentés dans le tableau XIX.

**Tableau XIII : Valeurs moyennes et écart-type des paramètres hématologiques du sang des rats exposés au Cd, au Hg et au (Cd+Hg)**

| Concentration | Paramètres | Contrôle | Cd | Hg | Cd+Hg |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **G** | **A** | **C** | **E** |
| | GB | 13,95±0,21 | 13,55±1,76 | 10,17± 2,32 | 8,47±1,50* |
| | GR | 8,46±0,72 | 7,45±1,76 | 7,36±0,49 | 7,18±0,69 |
| | Hb | 14,40±0,35 | 13,60±2,40 | 13,47±1,57 | 13,32±1,12 |
| **Faible** | Ht | 47, 450±0,07 | 44,95±8,83 | 46,47±5,20 | 45,07±4,84 |
| | VGM | 60,30±1,98 | 61,00±2,54 | 63,00±4,86 | 62,87±5,15 |
| | TCMH | 18,20±0,42 | 18,50±1,13 | 18,25±1,40 | 18,60±1,10 |
| | CCMH | 31,30±0,84 | 30,30±0,56 | 29,00±1,07 | 29,60±0,89 |
| | P | 624,50±16,26 | 965,00±158,39 | 768,50±163,59 | 742,50±94,60 |
| | L | 69,60±10,46 | 69,00±10,46 | 69,87±11,96 | 69,80±6,29 |
| | | **G** | **B** | **D** | **F** |
| | GB | 13,95±0,21 | 12,50±1, 20 | 9,85±0,49* | 8,15± 0,49* |
| | GR | 8,46±0,72 | 7,78±0,66 | 5,59±1,02* | 5,46±0,78* |
| | Hb | 14,40±0, 35 | 14,47±0,96 | 10,37±1,97* | 9,65±0,77* |
| | Ht | 47, 450±0,07 | 48,00±3,57 | 37,55±8,74 | 35,85±4,73 |
| **Forte** | VGM | 60,30±1,98 | 61,00±1,91 | 66,62±5,86 | 60,50±0,72 |
| | TCMH | 18,20±0,42 | 18,60±0,58 | 18,52±0,48 | 18,45±0,77 |
| | CCMH | 31,30±0,84 | 30,20±0,29 | 27,35±1,39* | 27,00±0,70* |
| | P | 624,50±16,26 | 901,50±241,41 | 822,50±378,70 | 841,00±427,09 |
| | L | 69,60±10,46 | 71,32±11,02 | 65,75±5,47 | 65,30±4,38 |

* La différence entre les valeurs des paramètres de sang des groupes exposés et celles témoin à 0, 05.

GB : Globules Blancs ($X10^3/\mu L$) ; Ht : Hématocrite (%) ;

GR : Globules Rouges ($X10^6/\mu L$) ; VGM : Volume Globulaire Moyen (fL) ;

Hb : Hémoglobine (g/dL) ; P : Plaquettes ($X10^3/\mu L$) ;

TCMH : Taux Corpusculaire Moyen en Hémoglobine (pg) ; L : Lymphocytes (%) ;

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (g/dL).

**L'analyse des résultats de ce tableau révèle:**

Pour le nombre de Globules Blancs (**GB)**, on note une diminution significative (9,85±0,49) chez les animaux du lot D (exposés à la forte concentration de mercure) et (8,47±1,50) chez les rats du lot E (exposés à la combinaison de faible concentration de

cadmium et de mercure) et (8,15± 0,49) chez les rats du lot F (exposés à la combinaison de forte concentration de cadmium et de mercure) par rapport au lot témoin G (13,95±0,21).

Pour le nombre de Globules Rouges **(GR)** on remarque une diminution significative (5,59±1,02) chez les animaux du lot D (exposés à la forte concentration de mercure) et (5,46±0,78) chez les rats du lot F (exposés à la combinaison de forte concentration de cadmium et de mercure) par rapport au lot témoin G (8,46±0,72).

La concentration en Hémoglobine **(Hb)** diminue significativement dans le sang des rats du lot D (10,37±1,97) (exposés à la forte concentration de mercure) et du lot F (9,65±0,77) (exposés à la combinaison de forte concentration de cadmium et de mercure) par rapport au lot témoin G (14,40±0,35).

La Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine **(CCMH)** diminue significativement dans le sang des rats du lot D (27,35±1,39) (exposés à la forte concentration de mercure) et du lot F (27,00±0,70) (exposés à la combinaison de forte concentration de cadmium et de mercure) par rapport au lot témoin G (31,30±0,84).

Une diminution de l'Hématocrite (**Ht**), et du Lymphocyte (**L**) avec la forte concentration de mercure (1,2 mg/kg Hg) et la combinaison de forte concentration de cadmium et de mercure (2,5 mg/kg Cd +1,2 mg/kg Hg) a été mentionnée. De plus on enregistre une augmentation du nombre de plaquettes (**P**) chez tous les lots intoxiqués par rapport au lot témoin.

En résumé, les résultats de cette étude montrent une diminution significative ($P<0,05$) des Globules Blancs (GB) chez le lot de rats traités avec la combinaison de faible concentration de cadmium et de mercure (0,25 mg/kg Cd + 012 mg/kg Hg). Aussi, ces résultats indiquent une diminution significative ($P<0,05$) du nombre de Globules Blancs (GB) et de Globules Rouges (GR) et de la concentration d'Hémoglobine (Hb), de la Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH) et une diminution de l'Hématocrite (Ht), et du Lymphocyte (L) avec la forte concentration de mercure (1,2 mg/kg Hg) et la combinaison des fortes concentrations de cadmium et de mercure (2,5 mg/kg Cd +1,2 mg/kg Hg). De plus on enregistre une augmentation du nombre de plaquettes (P) chez tous les lots intoxiqués par rapport au lot témoin.

**Discussion**

Les résultats de cette étude permettent de constater que certains paramètres varient considérablement selon les lots de rats Wistar intoxiqués au cadmium, mercure et à leur combinaison et le lot témoin. C'est par exemple le cas de la numération érythrocytaire : en effet chez les animaux des lots D et F, elle a atteint les valeurs de $5{,}59.10^6/\mu L$ et à $5{,}46.10^6/\mu L$ contre $8{,}46.10^6/\mu L$ chez les animaux du lot G (témoin). Ce nombre de globules rouges obtenus chez les animaux du lot D et F est très bas par rapport aux résultats de Boukerche *et al.* (2007) où ces auteurs ont trouvé $8{,}45.10^6/\mu L$ comme nombre de globules rouges chez des rats Wistar sains. Il est probable que la forte dose de mercure et la combinaison des fortes doses de cadmium et de mercure fassent baisser le nombre de globules rouges provoquant ainsi une anémie chez les rats Wistar intoxiqués. Ces résultats ont été prouvés par : (Guédénon *et al.,* 2012 b ; Vinodhini et Narayanan, 2008 ; McLeay et Gorden, 1977) sur des poissons exposés au cadmium, mercure et au plomb; (Bersényi *et al.,* 2003) sur les lapins traités avec du plomb ; (Veena *et al*., 2011, Lavicoli *et al*., 2003; Lodia et Kansala, 2012) sur les souris intoxiquées au plomb ; (Kanhiya *et al.,* 2009) sur des rats traités par du chlorure de mercure (0.926 mg/kg) oralement pendant 21 jours. Le nombre de globules rouges diminue après intoxication grâce à l'hémolyse (Darmono, 1995 ; Lavicoli *et al.,* 2003). La numération des globules rouges chez les rats non intoxiqués (témoin) est stable et varie très peu d'un sujet à l'autre. Même si cette stabilité semble caractéristique du rat Wistar sain, le nombre de globules rouges obtenus chez les rats du lot G au cours de cette étude est presque similaire à $8{,}45.10^6/\mu L$ obtenu par Boukerche *et al*. (2007) mais supérieur à la valeur de $7{,}1.10^6/\mu L$ proposé par Lahouel *et al.* (2004).

En ce qui concerne l'hémoglobine une tendance similaire a été obtenue avec les niveaux les moins élevés chez les rats du lot D et F. Cette diminution de l'hémoglobinémie a été aussi constatée par Lahouel *et al.* (2004) chez des rats intoxiqués au paracétamol, par Bersenyi *et al.* (2003) chez les lapins intoxiqués au plomb, par Kanhiya et Prabhu (2009) sur des rats traités par du chlorure de mercure (0.926 mg/kg) oralement pendant 21 jours, par Ognjanović *et al.* (2003) chez les rats exposés au chlorure de cadmium ; par (Veena *et al*., 2011 ; Lodia et Kansala, 2012) chez les souris traitées par le plomb ; par Sinha *et al.* (2008), chez les chauves-souris exposées au chlorure de cadmium. Cependant, la réduction de la

concentration en hémoglobine (Hb) peut être probablement due à la production de l'espèce réactive de l'oxygène (ROS) sous l'influence du chlorure mercurique et du chlorure de cadmium. Ceci a comme conséquence la destruction de la membrane de globule rouge et de sa fonction.

En ce qui concerne l'hématocrite, une tendance similaire a été obtenue avec les niveaux les moins élevés chez les rats du lot D et F. Ces résultats corroborent ceux de Bersényi *et al.,* 2003 et Tadjine *et al.*, 2008 sur les lapins traités avec métaux.

En ce qui concerne les globules blancs, des fluctuations ont été observées surtout au niveau des rats des lots D et F chez lesquels leur nombre a été plus bas. Ces faibles valeurs seraient liées à l'action toxique du mercure et de la combinaison cadmium et mercure qui peut induire une leucopénie et une thrombopénie en cas de grave dysfonctionnement du foie (Lee, 2004). Ces observations ont été aussi réalisées par (Veena *et al*., 2011 ; Lodia et Kansala, 2012) chez les souris traitées par le plomb.

La diminution significative de l'hémoglobinémie (10,37±1,97 et 9,65±0,77 g/dl) chez les rats du lot D et F, associée à une baisse de la CMCH (27,35±1,39 et 27,00±0,70g/l) indiquerait une tendance à la macrocytose et à l'hypochromie de l'hématopoïèse dans laquelle le foie intervient efficacement.

Le mercure et la combinaison des fortes concentrations de cadmium et de mercure pourraient inhiber la synthèse de l'hème des globules rouges comme prouvé par (Veena *et al*., 2011 ; Lodia et Kansala, 2012) après une intoxication au plomb. Ce phénomène provoque des signes d'anémie décrits par Bottomley et Muller-Eberhard, (1998). Cependant, les globules rouges restent pauvres en hème, d'où la baisse de la CMCH, déjà signalée par nos résultats au niveau des rats du lot D et F.

La diminution du nombre d'érythrocytes, d'hémoglobine et d'hématocrite indique l'anémie prouvée par d'autres auteurs (Dhanapakiam et Ramasamy 2001; Horiguchi, 2007). Il a été démontré qu'elle a été provoquée non seulement par la plus grande destruction des érythrocytes (Kori-Siakpere *et al.,* 2009) mais également par la diminution de la synthèse et du dégagement des érythrocytes dans la circulation de sang (Vinodhini et Narayanan, 2008). Les mêmes auteurs affirment que l'accumulation des métaux lourds dans le foie, et les reins inhibent les activités hematopoietiques des tissus.

### 2.2 Evaluation de l'effet protecteur de la vitamine C sur la variation des paramètres hématologiques des rats intoxiqués au cadmium, au mercure et à leur combinaison (Publication 4)

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XX sous forme de valeurs moyennes et écart-type des paramètres hématologiques du sang des rats exposés au cadmium, au mercure et à la combinaison des deux métaux à diverses concentrations et des rats intoxiqués et traités avec la vitamine C.

**Tableau XIV : Moyennes et écart-type des paramètres hématologiques des rats exposés au Cd, Hg et traités avec la vitamine C**

| Concentration | Paramètres | contrôle | Cd | Hg | Cd+Hg | Cd + Vit C | Hg + Vit C | Cd+Hg+ Vit C |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **G** | **A** | **C** | **E** | **Ac** | **Cc** | **Ec** |
| | GB | 13,95±0,21 a | 13,55±1,76 a | 10,17± 2, 32 a | 8,47±1,50* b | 24,40±5, 39 a | 13, 95± 2, 76 a | 14,05±5,20 a |
| | GR | 8,46±0,72 a | 7,45±1,76 a | 7,36±0,49 a | 7,18±0,69 a | 7,72±1,07 a | 7,49± 0,30 a | 7,305±0,78 a |
| | Hb | 14,40±0,35 a | 13,60±2,40 a | 13,47±1,57 a | 13,32±1,12 a | 13,55±1,52 a | 13,32±0,44 a | 12,72±0,69 a |
| | Ht | 47, 450±0,07 a | 44,95±8,83 a | 46,47±5,20 a | 45,07±4,84 a | 47,50±6,02 a | 43,67±0,80 a | 43, 95±3,65 a |
| **Faible** | VGM | 60,30±1,98 a | 61,00±2,54 a | 63,00±4,86 a | 62,87±5,15 a | 61,70±3,22 a | 58,32±1,99 a | 69,30±2,13 a |
| | TCMH | 18,20±0,42 a | 18,50±1,13 a | 18,25±1,40 a | 18,60±1,10 a | 17,60±0,67 a | 17,80±0,45 a | 17,50±1,27 a |
| | CCMH | 31,30±0,84 a | 30,30±0,56 a | 29,00±1,07 a | 29,60±0,89 a | 28,57±1,49 a | 30,50±0,78 a | 29,02±1,38 a |
| | P | 624,50±16,26 a | 965,00±158,39 a | 768,50±163,59 a | 742,50±94,60 a | 1078,75±180,28 a | 874,75±46,42 a | 1254,50±262,67 a |
| | L | 69,60±10,46 a | 69,00±10,46 a | 69,87±11,96 a | 69,80±6,29 a | 54,82±14,15 a | 55,32±13,98 a | 52,30±15,39 a |
| | | **G** | **B** | **D** | **F** | **Bc** | **Dc** | **Fc** |
| | GB | 13,95±0,21 a | 12,50±1, 20 a | 9,85±0,49* b | 8,15± 0,49* b | 14,75±1,93 a | 14,70±4,18 a | 10,70±2, 34 a |
| | GR | 8,46±0,72 a | 7,78±0,66 a | 5,59±1,02* b | 5,46±0,78* b | 7,45±1,26 a | 8,10±0,70 a | 8,02±0,12 a |
| | Hb | 14,40±0, 35 a | 14,47±0,96 a | 10,37±1,97* b | 9,65±0,77* b | 14,17±0,35 a | 14,93±0,68 a | 14,25±0,45 a |
| | Ht | 47,450±0,07 a | 48,00±3,57 a | 37,55±8,74 a | 35,85±4,73 a | 46,12±7,58 a | 47,00±3,12 a | 46,30±1,49 a |
| **Forte** | VGM | 60,30±1,98 a | 61,00±1,91 a | 66,62±5,86 a | 60,50±0,72 a | 61,50±1,05 a | 58,03±1,30 a | 60,30±2,13 a |
| | TCMH | 18,20±0,42 a | 18,60±0,58 a | 18,52±0,48 a | 18,45±0,77 | 21,22±5,27 a | 18,46±0,65 a | 17,77±0,34 a |
| | CCMH | 31,30±0,84 a | 30,20±0,29 a | 27,35±1,39* b | 27,00±0,70* b | 30,85±1,27 a | 31,80±0,72 a | 30,77±0,56 a |
| | P | 624,50±16,26 a | 901,50±241,41 a | 822,50±378,70 a | 841,00±427,09 a | 734,00±248,17 a | 1014,33±110,18* b | 907,25±120,40* b |
| | L | 69,60±10,46 a | 71,32±11,02 a | 65,75±5,47 a | 65,30± 4,38 a | 49,35±7,86 a | 60,86±14,23 a | 57,75±9,24 a |

* La différence entre les valeurs des paramètres de sang des groupes exposés et celles témoin à 0, 05. Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes ; a et b (significativité entre le lot contrôle, les lots intoxiqués aux métaux et leurs correspondants intoxiqués et traités avec la vitamine C ; a : non significatif et b : significatif).

**Interprétation des résultats**

❖ **Numération érythrocytaire**

Au sein des rats Wistar, la numération érythrocytaire a présenté d'importantes variations significatives et varie de 8,46±0,72 chez les animaux du lot G (Témoin) à 5,59±1,02 et à 5,46±0,78 chez ceux du lot D et F ($p < 0,05$). Le nombre de globules rouges a été plus élevé (8,10±0,70 et 8,02±0,12) au niveau des rats des lots $D_C$ et Fc quand on le compare à celui des rats du lot D et F mais plus bas que celui des rats du lot G ($p< 0,05$).

❖ **Numération des globules blancs**

Les valeurs signivicativement les plus basses de leucocytes 9,85±0,49 ; 8,47±1,5 ; 8,15±0,49 ont été rencontrées respectivement chez les rats des lots D, E, F contre 14,70±4,18; 14,05±5,20 et 10,70±2, 34 ; 13,95±0,21 pour les animaux des lots Dc, Ec, Fc et G ($p< 0,05$). Quant aux plaquettes, le nombre a augmenté chez tous les rats intoxiqués (A, B, C, D, E, F) par rapport au témoin (G) et a de plus accru avec l'application de la vitamine C (Ac, Bc, Cc, Dc, Ec, Fc).

❖ **Hémoglobine**

La concentration en hémoglobine a été significativement plus basse chez les rats du lot D et E (10,37±1,97 et 9,65±0,77) quand on les compare respectivement à (14,40±0,35; 14,93±0,68 ; 14,25±0,45) celles des rats des lots G, Dc et Fc ($p< 0,05$).

❖ **Hématocrite**

Les valeurs de l'hématocrite chez les rats Wistar ont varié de 47,450±0,07chez les animaux du lot G à 37,55±8,74 et 35,85±4,73 respectivement chez ceux du lot D et F en passant par des valeurs intermédiaires (47,00±3,12 et 46,30±1,49) chez les rats des lots Dc et Fc.

❖ **Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)**

Les concentrations corpusculaires moyennes en hémoglobine (CCMH) ont été fluctuantes avec les valeurs les plus faibles (27,35±1,39 et 27,00±0,70) respectivement chez les rats du lot D et F comparées à ceux des autres lots ($p< 0,05$).

**Discussion**

Les résultats de cette étude permettent de constater que certains paramètres varient selon les lots de rats Wistar intoxiqués au mercure, à la combinaison du cadmium et du mercure et ceux intoxiqués et traités avec la vitamine C. C'est par exemple le cas de la numération érythrocytaire : en effet chez les animaux des lots D et F, elle a atteint les valeurs de $5,59.10^6$/µL et à $5,46.10^6$/µL contre $8,46.10^6$/µL chez les animaux du lot G (témoin) avec des valeurs intermédiaires chez les animaux traités Dc et Fc avec la vitamine C. Ce nombre de globules rouges obtenus chez les animaux du lot D et F est très bas par rapport aux résultats de Boukerche *et al.,* (2007) où ces auteurs ont trouvé $8,45.10^6$/µL comme nombre de globules rouges chez des rats Wistar sains. Il est probable que la forte dose de mercure et la combinaison des fortes doses de cadmium et de mercure fassent baisser le nombre de globules rouges provoquant ainsi une anémie chez les rats Wistar intoxiqués. Ces résultats ont été prouvés par d'autres auteurs (Veena *et al*., 2011, Lavicoli *et al*., 2003) réalisés sur les souris intoxiquées au plomb. Ces auteurs affirment que le nombre de globules rouges a dimunié grâce à l'hémolyse. La numération des globules rouges chez les rats non intoxiqués (témoin) est stable et varie très peu d'un sujet à l'autre. Même si cette stabilité semble caractéristique du rat Wistar sain, le nombre de globules rouges obtenu chez les rats du lot G au cours de cette étude est presque similaire à $8,45.10^6$/µL trouvé par Boukerche *et al.* (2007) mais supérieur à la valeur de $7,1.10^6$/µL proposée par Lahouel et *al.* (2004).

Au niveau des rats qui ont été intoxiqués à la forte dose de mercure et la combinaison des fortes doses de cadmium et de mercure et traités à la vitamine C, la régénération érythrocytaire a été remarquable au niveau des lots (Dc et Fc). Des résultats similaires ont été observés par Lahouel *et al.* (2004) chez des rats Wistar intoxiqués au paracétamol et traités avec de la propolis ; et par Veena *et al*. (2011) chez les souris intoxiquées au nitrate de plomb et traitées avec un supplément d'extrait éthanoïque de coriandre.

En ce qui concerne l'hémoglobine et l'hématocrite, une tendance similaire a été obtenue avec les niveaux les moins élevés chez les rats du lot D et F. Les valeurs de ces paramètres hématologiques ont connu une augmentation liée au traitement avec la vitamine C. Tout semble confirmer la conclusion de Friot et Calvet (1973) qui affirment que les facteurs qui affectent l'état général de l'animal tels que le niveau nutritionnel, l'équilibre hydrique et le statut pathologique influencent l'hématocrite.

En ce qui concerne les globules blancs, des fluctuations ont été observées surtout au niveau des rats des lots D et F chez lesquels leur nombre a été plus bas. Ces faibles valeurs qui ont augmenté chez les rats des lots Dc et Fc traités avec la vitamine C seraient liées à l'action toxique du mercure et de la combinaison cadmium et mercure qui peut induire une leucopénie et une thrombopénie en cas de grave dysfonctionnement du foie (Lee, 2004).

La diminution significative de l'hémoglobinémie (10,37±1,97 et 9,65±0,77 g/dl) chez les rats du lot D et F, associée à une baisse de la CCMH (27,35±1,39 et 27,00±0,70g/l) indiquerait une tendance à la macrocytose et à l'hypochromie de l'hématopoïèse dans laquelle le foie intervient efficacement.

Cette diminution des cellules sanguines a été corrigée chez les rats des lots Dc et Fc suite à l'action favorable de la vitamine C utilisée comme complément alimentaire. La vitamine C aurait un potentiel antioxydant ce qui a été confirmé par (Szeto et *al.,* 2001) qui affirme que la quantité élevée de vitamine C dans l'ananas comus contribue au delà de 30% de son potentiel antioxydant ; ce qui favorise son action favorable sur le foie dans la régulation de l'hématopoïèse.

Cette diminution de l'hémoglobinémie a été aussi constatée par Lahouel *et al.* (2004) chez des rats intoxiqués au paracétamol, par Bersenyi *et al*. (2003) chez les lapins intoxiqués au plomb, par Veena *et al.* (2011) chez les souris traitées par le plomb ; par Sinha *et al.* (2008), chez les chauves-souris exposées au chlorure de cadmium *;* par Ognjanović *et al.* (2003) chez les rats exposés au chlorure de cadmium ; par contre différé, des résultats obtenus par Smaoui *et al*. (2000) sur des rats exposés au gaz d'échappement qui avait induit une érythropoïèse par hypoxie. Le mercure et la combinaison des fortes concentrations de cadmium et de mercure pourraient inhiber la synthèse de l'hème des globules rouges et provoquer des signes d'anémie décrits par Bottomley et Muller-Eberhard (1998). Ces signes sont compensés par l'effet bénéfique de la vitamine C. Cependant, les globules rouges restent pauvres en hème, d'où la baisse de la CCMH, déjà signalée par nos résultats au niveau des rats du lot D et F. Nous avons constaté par ailleurs que les taux de Gobule Rouge, Globule Blanc, Hémoglobine, Hématocrite, de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ne sont pas statistiquement différents chez les rats témoins (G) et ceux intoxiqués et traités (lots Dc et Fc). Ceci pourrait s'expliquer par le rôle antioxydant de la vitamine C. Elle a la capacité de capturer et de désactiver les radicaux libres. Selon Siess *et al.* (2000), il agit par empêchement de la fixation des radicaux libres sur l'ADN, par activation

du système de détoxication et par protection des parois capillaires comme l'ont souligné Kawabata et *al.* (1990).

Awodele et *al.* (2010) rapportent que l'administration de la vitamine C (8mg/kg) a corrigé en partie les potentiels préjudiciables de la rifamicin sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) des souris. Ceci est dû à la petite dose inférieure à celle utilisée au cours de cette étude (150 mg/kg). Ognjanović *et al*. (2003) ont également prouvé que le prétraitement avec la vitamine E et C a montré un rôle protecteur des effets toxiques du cadmium sur les paramètres hématologiques. Des résultats semblables ont été obtenus par Fox *et al.* (1971) qui ont montré l'effet protecteur de la vitamine C sur l'anémie induite par les métaux lourds chez les rats.

**Conclusion partielle**

Ces résultats suggèrent que le cadmium et le mercure présents dans l'environnement et en particulier dans les produits alimentaires de première nécessité causent des perturbations hématologiques dans le sang. Cependant, la Co-administration de (cadmium et mercure) et d'antioxydant (vitamine C) a révélé l'effet protecteur hématotoxique de la vitamine C. On pourrait conclure que la vitamine C a un potentiel antioxydant efficace contre les pertubations hématologiques du cadmium et du mercure.

# III. Observation histopathologique et effet protecteur de la vitamine C

## 3.1 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués au cadmium.

### 3.1.1 Reins

En microscopie photonique, les photos 37, 38, 39, 40 et 41 montrent respectivement les photos de rein normal de rats Wistar témoin (G); des reins de rats intoxiqués au cadmium (0.25 mg/kg, 2.5 mg/kg) (lots A ; B) et des reins de rats intoxiqués au cadmium et traités avec la vitamine C (150 mg/Kg) (lots Ac ; Bc).

Chez les rats du lot témoin, les reins sont normaux. Les tubules collecteurs sont bordés par un épithélium cubique simple court. Les segments épais des branches descendante et ascendante de l'anse de Henlé, les tubes collecteurs contournés de petit calibre, et un peu de tissu interstitiel sont visibles dans ces coupes transversales (photo 37).

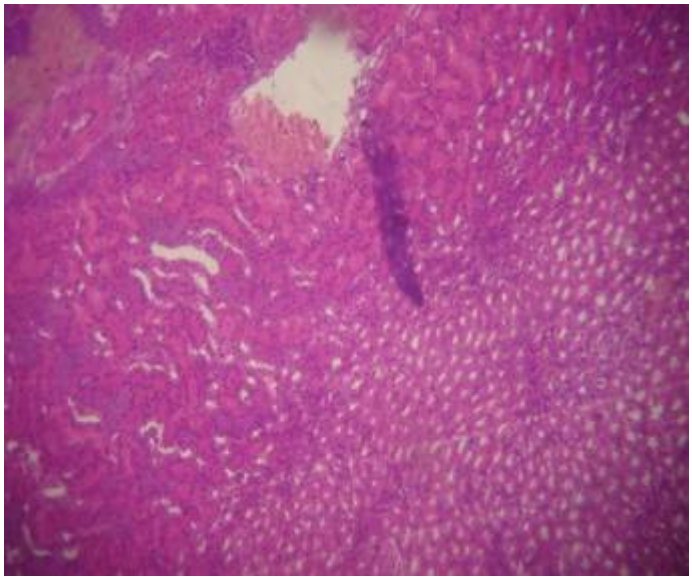


**Photo 37: Aspect morphologique du rein normal du rat témoin (G)**

Chez les rats du lot A intoxiqués à une faible dose de cadmium, il a été constaté des vaisseaux sanguins rénaux nettement congestionnés (photo 38). De même chez les rats du lot B intoxiqués à une forte dose de chlorure de cadmium, il a été noté quelques tubules dilatés dans la papille rénale (photo 39).

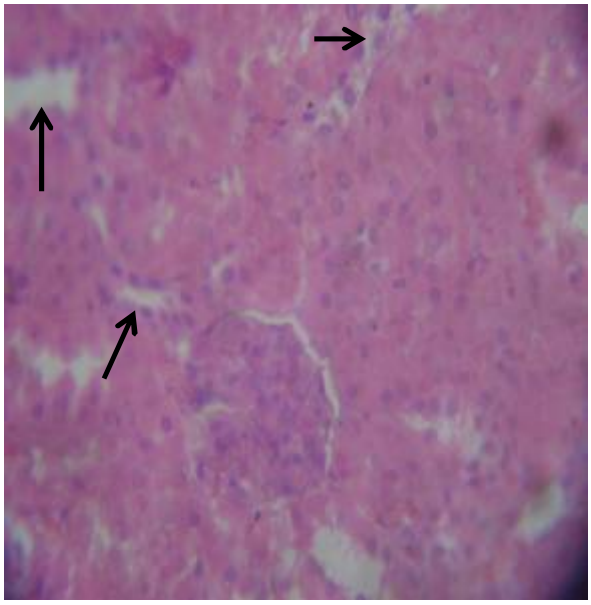


**Photo 38: Congestion vasculaire (Flèche)**

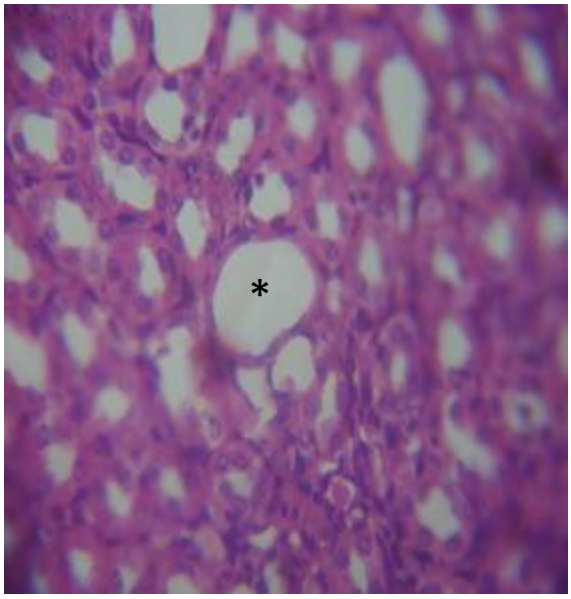



**Photo 39: Quelques tubules dilatés (astérix) au sommet des papilles**

Chez les rats du groupe Ac intoxiqués à faible dose de cadmium et traités avec la vitamine C, on constate une absence de lésion visible (rein normal) comme chez les lots témoins. Chez les rats du groupe Bc intoxiqués à forte dose de cadmium et traités avec la vitamine C, il y a eu un léger agrégat de cellules inflammatoires comprenant les macrophages, les neutrophiles et un peu de lymphocytes dans l'interstitium rénal. On y retrouve quelques tubules dans le cortex rénal qui contiennent un matériel intralumial éosinophile (flèche) (photos 40 et 41).

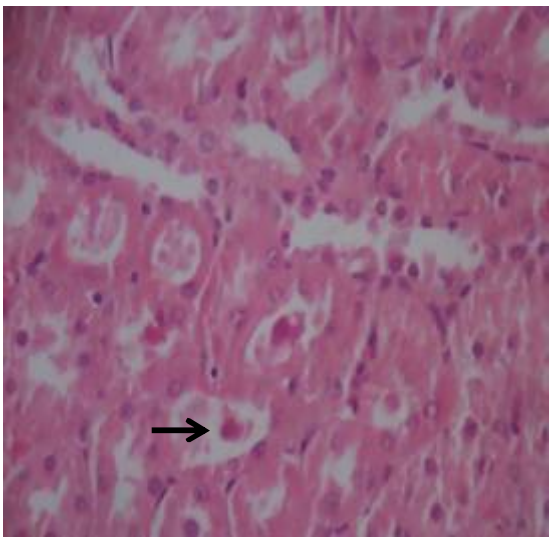


**Photo 40: Matériel intralumial éosinophile**

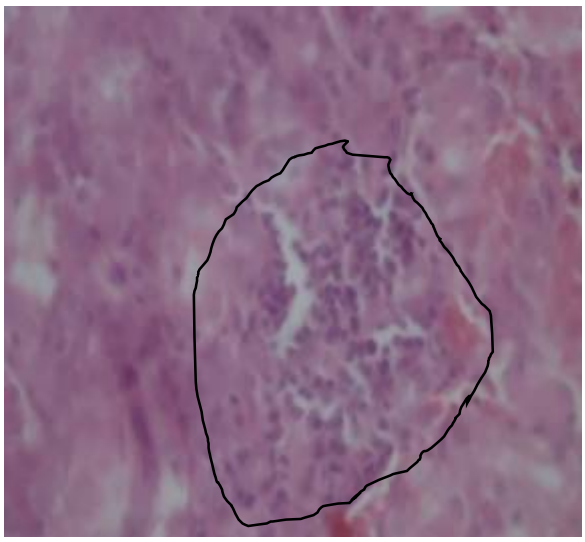


**Photo 41: Agrégat de cellules (flèche) inflammatoires (zone entourée) et infiltrat de lymphocytes dans l'interstitium rénal**

### 3.1.2 Foie

En microscopie photonique, les photos 42, 43, 44, 45, 46, 47 et 48 montrent respectivement les photos de foie normal de rats témoins (G); de foie de rats intoxiqués au cadmium (A et B) et de foie de rats intoxiqués au cadmium et traités avec la vitamine C (Ac et Bc).

L'architecture du parenchyme hépatique normal chez les rats témoins est marquée par des travées hépatocytaires disposées de façon radiaire autour de la veine centrolobulaire. Les hépatocytes présentent un cytoplasme basophile et volumineux ; un ou deux noyaux bien visibles et peu colorés (photo 42).

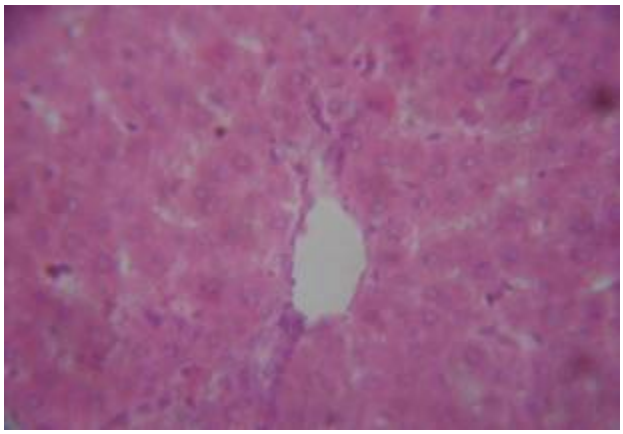


**Photo 42 : Aspect morphologique du foie normal de rat Wistar (lot G)**

Chez les rats du groupe A, intoxiqués à la faible dose de cadmium, il a été constaté que les veines hépatiques sont fortement congestionnées (cogestion vasculaire). On note également que les hépatocytes contiennent des vacuoles cytoplasmiques claires de taille variable (changement vacuolaire) (photo 43). Chez les rats du groupe B intoxiqués à une forte dose de cadmium, il a été observé que les travées hépatocytaires sont légèrement amaincies (atrophie hépatique) et on note la présence des foyers isolés de nécrose hépacellulaire encore appelés les cellules fantômes qui sont indiqués par des flèches (photo 44).

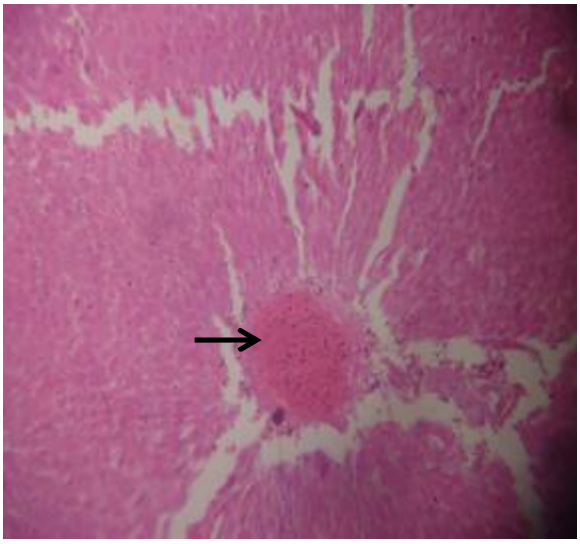


**Photo 43: Congestion vasculaire (flèche)**

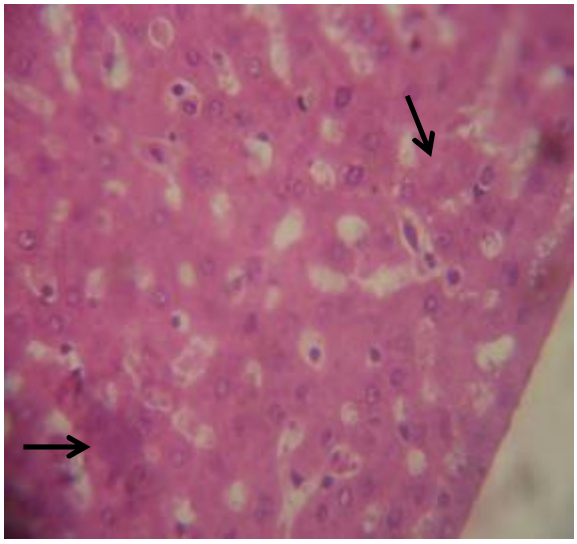


**Photo 44: Nécrose hépatocellulaire fantômes (flèches) cellules**

Chez les rats du groupe Ac, intoxiqués à faible dose de cadmium et traités avec la vitamine C, il a été observé un léger changement vacuolaire des hépatocytes périportaux, des cellules de kupffer contiennent des quantités variables de pigments noirs (Photos 45 et 46).

Chez les rats du groupe Bc intoxiqués à forte dose de cadmium et traités avec la vitamine C, il a été observé une légère dissociation des travées hépatiques ainsi que l'individualisation des hépatocytes. Il a été remarqué de rares hépatocytes nécrotiques isolés et des cellules de Kupffer chargées de pigments (photos 47, 48).

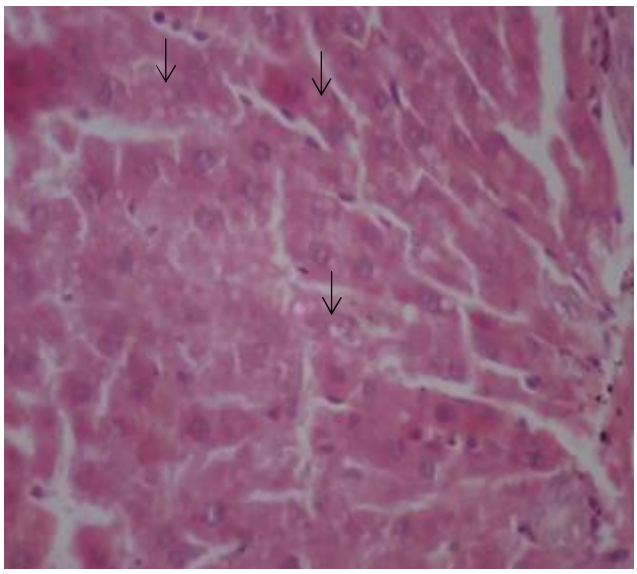


**Photo 45: Vacuoles (têtes de flèche) Cellules de Kupffer chargées de pigments noirs (flèches)**

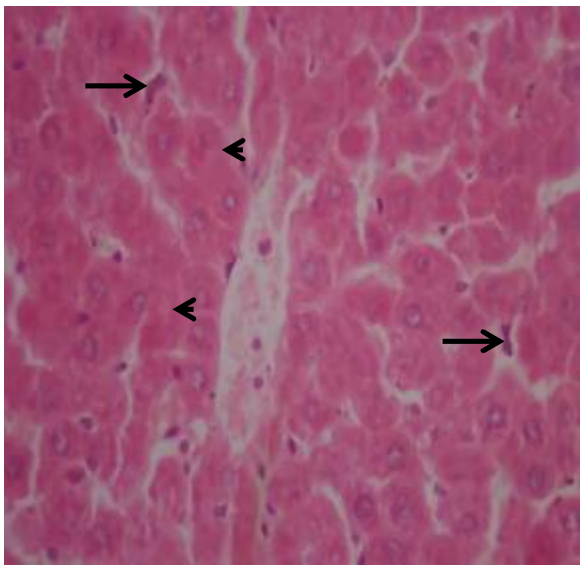


**Photo 46 :Légère modification vacuolaire des hépatocytes périportaux (flèches)**

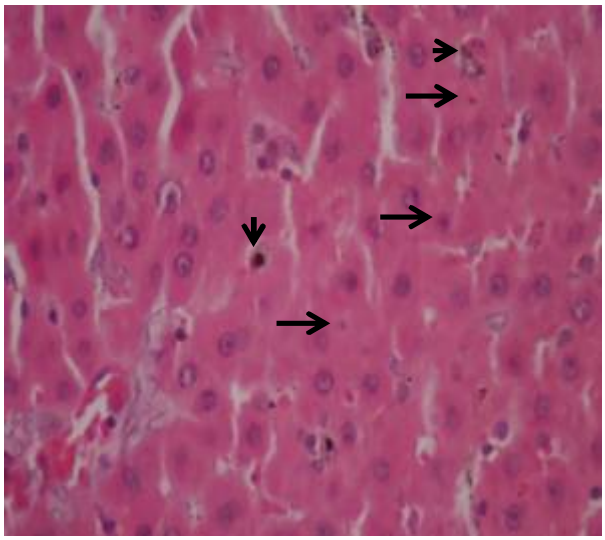


**Photo 47: Hépatocytes nécrotiques isolés ; les cellules de Kupffer chargées de pigments noirs (têtes de flèche)**

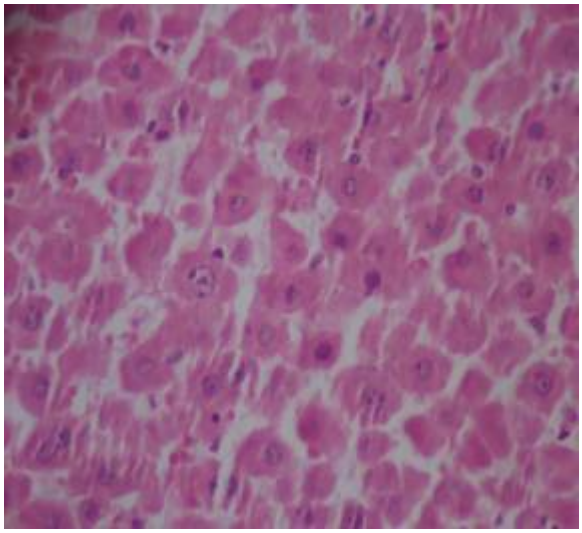


**Photo 48: Légère dissociation des travées hépatiques et individualisation des hépatocytes**

### 3.1.3 Cerveau

En microscopie photonique, les photos 49, 50, 51, 52, 53, 54 et 55 montrent respectivement les photos du cerveau normal de rats témoins (G); du cerveau de rats

intoxiqués au chlorure de cadmium (0.12 mg/kg; 1.2mg/kg) (A, B) et du cerveau de rats intoxiqués au cadmiumet traités avec la vitamine C (150mg/kg) (Ac, Bc).

Chez les rats témoins, on note une absence de lésion visible du cerveau (photo 49).

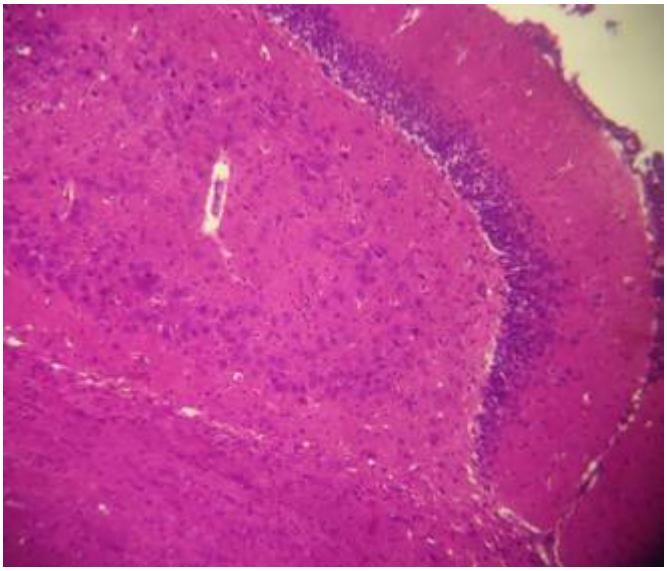


**Photo 49: Aspect morphologique du cerveau normal du rat wistar (lot G)**

Chez les rats du lot A, intoxiqués à la faible dose de chlorure de cadmium, Il y a été observé une nécrose neuronale aiguë modérée (flèche) et une gliose focale (tête de flèche) (photo 50).

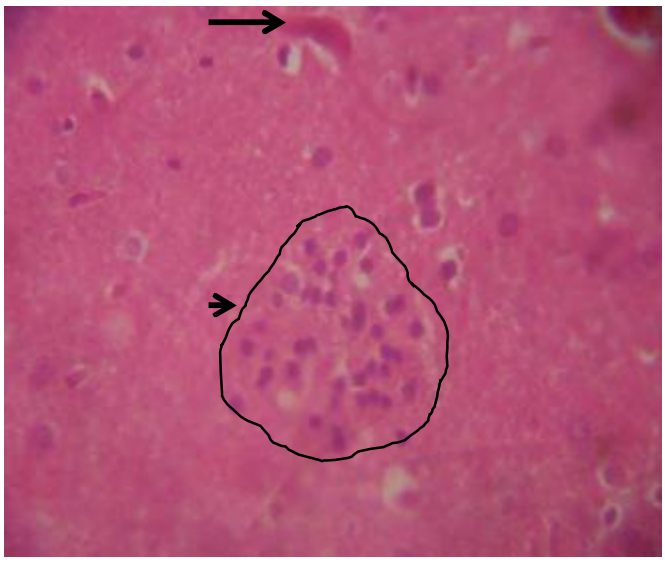


**Photo 50: Nécrose neuronale aiguë (flèche), gliose focale (tête de flèche)**

Chez les rats du lot B intoxiqués à forte dose de cadmium, il a été constaté une transformation spongieuse du neuropile, une gliose multifocale (zone entourée) et une congestion des vaisseaux sanguins (flèche) (photos 51, 52).

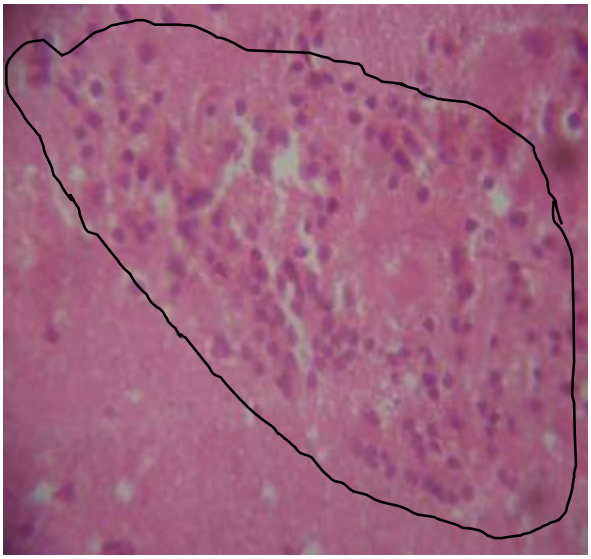


**Photo 51: Neuropile spongieux, gliose multifocale (zone entourée)**

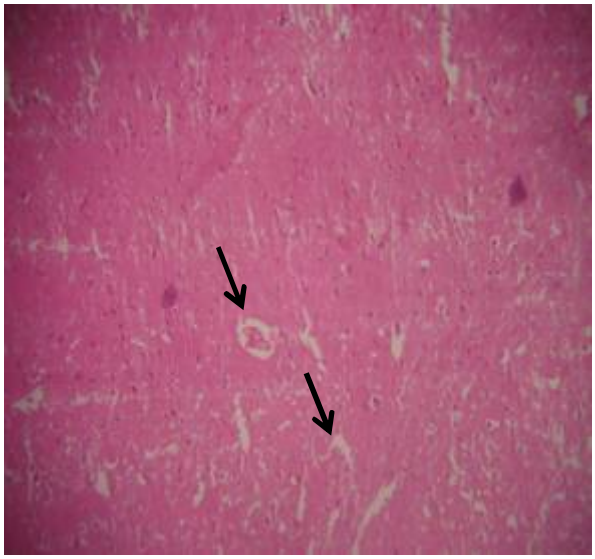


**Photo 52 : Congestion vasculaire (flèche)**

Chez les rats du lot Ac intoxiqués à faible dose de cadmium et traités avec la vitamine C, il a été observé une absence de lésion visible (cerveau normal) (photo 53).

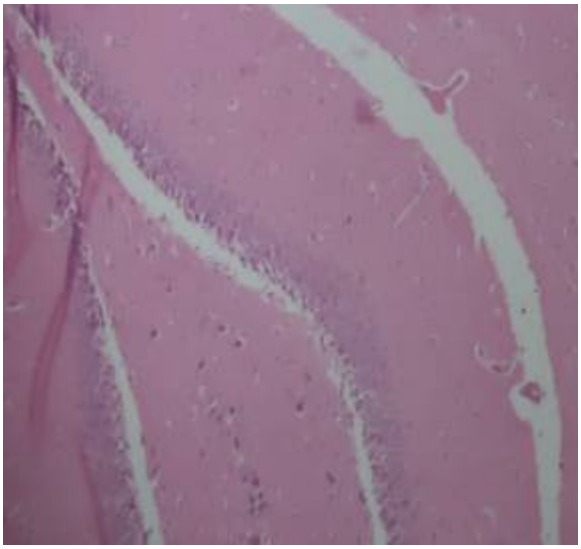


**Photo 53 : Aspect morphologique du cerveau normal de rat wistar (lot Ac)**

Chez les rats du lot Bc intoxiqués à forte dose de cadmium et traités avec la vitamine C, il a été constaté une absence de lésion visible chez certains rats et chez d'autres on note la

présence de nombreuses vacuoles (flèche) dans le neuropile ainsi que dans le cytoplasme des neurones (spongiose) (photos 54, 55).

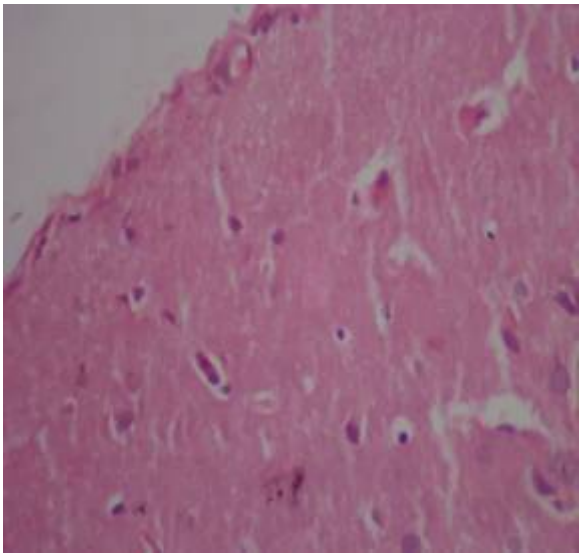


**Photo 54: Absence de lésion visible**

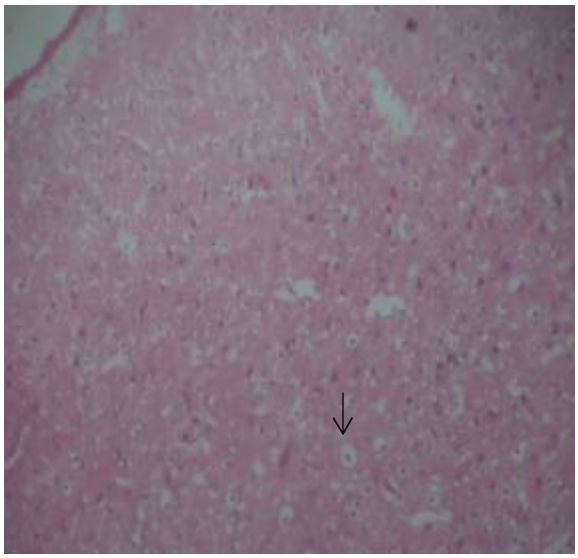


**Photo 55: Spongiose, vacuoles (flèche) dans le neuropile et dans le cytoplasme des neurones**

**Tableau XV: Comparaison des résultats d'histopathologie entre les lots de rats intoxiqués au cadmium et ceux intoxiqués au cadmium puis traités avec la vitamine C**

| | Lots | organes / Traitement | Foie | Rein | Cerveau |
|---|---|---|---|---|---|
| | **G** | **Eau distillée** | **-** | **-** | **-** |
| **Cadmium (Cd)** | **A** | **0.25mg/kg Cd** | **+** | **+ /-** | **+** |
| | **Ac** | **0.25mg/kg cd + 150 mg/kg Vit.C** | **+ /-** | **-** | **-** |
| | **B** | **2.5mg/kg cd** | **+++** | **+** | **++** |
| | **Bc** | **2.5mg/kg cd + 150 mg/kg Vit.C** | **+** | **+** | **+** |

\+ : altération histopathologique ;
++ : altération histopathologique accentuée (lésion visible accentuée) ;
+++ : altération histopathologique très accentuée ;
+/- : légère altération histopathologique ;
- : absence de lésion visible.

**Discussion**

Le cadmium est un polluant environnemental, extrêmement toxique ayant une longue demi-vie chez l'homme. Il a été démontré que le cadmium induit plusieurs changements des tissus des animaux de laboratoire et des humains (Foulkes *et al.,* 1986).

La toxicité du cadmium est associée à plusieurs complications cliniques, dysfonctionnement rénal, les maladies d'os, dysfonctionnement hépatique (Jarup *et al.,* 2000) et dommages du cerveau (Shukla *et al.,* 1996, Thomas *et al.,* 1982). Les dommages tubulaires rénaux sont probablement l'effet nuisible le plus commun (Goyer et Cherian 1995; Jarup *et al.,*1998). La toxicité de cadmium dépend de la dose, de la durée et de l'itinéraire de l'exposition (Jarup *et al.,* 1998).

Les résultats histopathologiques sur le tissu des reins après une intoxication chronique au cadmium indiquent des vaisseaux sanguins rénaux nettement congestionnés (faible dose) et la présence de quelques tubules dilatés dans la papille rénale (forte dose). Ces résultats ont été prouvés par Obianime et Roberts (2009); Beiglböck *et al*. (2002) ; Brzóska *et al*. (2002), Boujelbene *et al.* (2002) qui ont aussi montré que le cadmium cause une altération du rein. De même Kjellström (1986); World Health Organization (1992); Nordberg *et al.* (1994) ont affirmé qu'une intoxication chronique du cadmium engendre un disfontionnement des tubules. Le cadmium a été également montré pour empêcher les activités de diverses protéases pancréatiques (Obianima et Roberts, 2009). Le cadmium induit une peroxidation qui engendre la prolifération des radicaux libres (Llobet *et al.,* 1998). Ces radicaux libres causent la destruction des macromolécules et des tissus sensibles (Lafuente *et al*., 2000).

Les résultats obtenus chez les rats intoxiqués à faible dose de cadmium et traités avec la vitamine C montrent une absence de lésion visible (rein normal) chez les rats du lot Ac. Il a été observé chez les rats du lot Bc, intoxiqués à une forte dose de mercure et traités avec la vitamine C, un léger agrégat de cellules inflammatoires comprenant les macrophages, les neutrophiles et un peu de lymphocytes dans l'interstitium rénal. On y retrouve quelques tubules dans le cortex rénal qui contiennent un matériel intralumial éosinophile. Ces résultats comparativement au premier montrent que la vitamine C utilisée a réduit la gravité de l'intoxication rénale due au cadmium chez les rats wistar. Cet effet favorable de la vitamine C a été prouvé par Omonkhua et Obi (2008) après une intoxication des rats au cadmium. Ces résultats sont semblables à ceux de Dougnon *et al.,* 2006 qui a aussi obtenu des lésions rénales similaires après une intoxication au paracétamol et une correction comme celle montrée par cette étude avec de l'ananas.

Quant au foie, les résultats obtenus après l'intoxication au cadmium ont montré une congestion vasculaire, des changements vacuolaires (faible dose de cadmium); une atrophie hépatique, des foyers isolés de nécrose hépatocellulaire (forte dose de cadmium). Les lésions hépatiques similaires ont été observées par Shiraishi *et al.* (1993), Jarup *et al.* (2000), Brzóska et *al.* (2002) ; Kjellström, 1986, après l'exposition des rats au cadmium. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Sarkar *et al.* (1995) qui ont montré que le cadmium induit un stress oxydatif dans les différents tissus en provoquant la peroxydation des lipides membranaires et en détériorant le système antioxydant cellulaire. Ceci s'explique par le fait que l'intoxication au cadmium engendre une augmentation du lipide peroxydation (LPO) dans le rein et le foie après 12 heures d'intoxication. Les enzymes antioxydantes et d'autres antioxydants assurent la protection des cellules contre des dommages oxydants. L'activité du superoxide distimutase (SOD) a augmenté dans le rein et le foie après une intoxication au cadmium. La teneur en GSH et l'activité de GR ont diminué dans le rein et le foie 72 h après l'administration de cadmium, ce qui a été suggéré pour être la cause de l'augmentatation accrue du LPO dans les tissus. Le traitement avec la vitamine C après l'intoxication des rats montre un léger changement vacuolaire des hépatocytes périportaux, des cellules de kupffer contiennent des quantités variables de pigments noirs (faible dose). Chez les rats intoxiqués à forte dose de cadmium et traités avec la vitamine C, il a été observé une légère dissociation des travées, hépatiques ainsi que l'individualisation des hépatocytes. Il a été remarqué de rares hépatocytes nécrotiques isolés et des cellules de Kupffer chargées de pigments. En comparaison avec les résultats précédents, on constate que la vitamine C a réduit considérablement la gravité de l'intoxication hépatique du cadmium chez les rats wistar. Ces résultats sont confirmés par Shiraishi *et al.* (1993) qui a prouvé que le cadmium induit des lésions hépatiques qui se sont améliorées grâce à un prétraiement des rats avec de l'acide ascorbique. La vitamine C est alors un puissant antioxydant qui, utilisée comme complément alimentaire ou comme préventif, réduit par chélation ou par production de glutation, l'élimination ou la transformation des radicaux libres. Ce qui empêche l'altération des tissus.

Les résultats histopathologiques sur le cerveau après une intoxication chronique au cadmium indiquent une nécrose neuronale aiguë modérée et une gliose focale (faible dose); une transformation spongieuse du neuropile, une gliose multifocale et une congestion des vaisseaux sanguins (forte dose). Les alétrations similaires du cerveau ont été observées par Webster et Valois (1981), Shukla *et al.* (1996) après l'exposition des rats au cadmium. Ces

résultats sont aussi confirmés par les travaux de Wong et Klaassen (1982) après une intoxiction des rats au cadmium. Le traitement avec la vitamine C après l'intoxication à faible dose de cadmium des rats révèle une absence de lésion visible du cerveau, la présence de nombreuses vacuoles dans le neuropile ainsi que dans le cytoplasme des neurones (spongiose). La comparaison de ces résultats avec la précédente montre l'effet protecteur de la vitamine C sur l'altération du cerveau dû au cadmium. Ces résultats sont confirmés par Thomas *et al.* (1982) qui ont prouvé que l'acide ascorbic a éliminé le stock de cadmium contenu dans le cerveau et qui a induit des lésions chez *Mugil cephalus* Linn.

### 3.2 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués au mercure. (Publication 5)

#### 3.2.1 Reins

En microscopie photonique, les photos 56, 57, 58, 59 et 60 montrent respectivement les photos de rein normal de rats témoins (G), des reins de rats intoxiqués au mercure (0.12 mg/kg ; 1.2mg/kg) (C, D) et des reins de rats intoxiqués au mercure et traités avec la vitamine C (150 mg/Kg) (Cc, Dc).

Chez les rats du lot témoin, les reins sont normaux (photo 56).

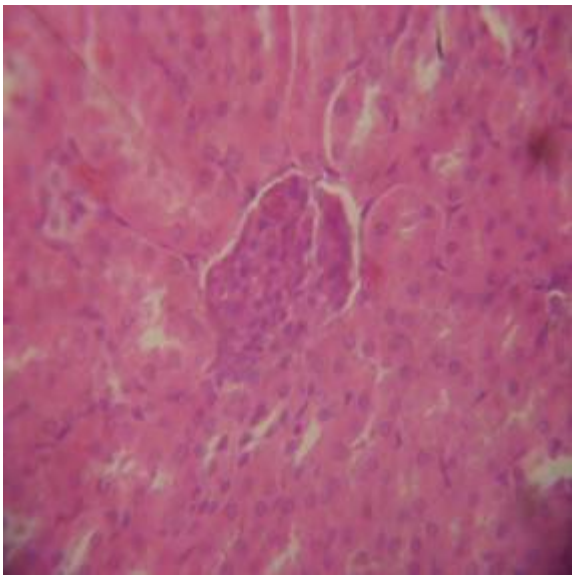


**Photo 56: Morphologie du rein normal du rat wistar (lot G)**

Chez les rats du lot C intoxiqués à une faible dose de mercure, il a été observé de multiples foyers de tubules amincis avec épithélium pavimenteux, probablement des tubules de régénération (photo 57). De même chez les rats du lot D intoxiqués à une forte dose de

chlorure de mercure, il a été noté des changements vacuolaires de l'épithélium tubulaire au niveau des papilles rénales et quelques-unes sont pavimenteuses (flèche) au lieu d'être cubiques (photo 58).

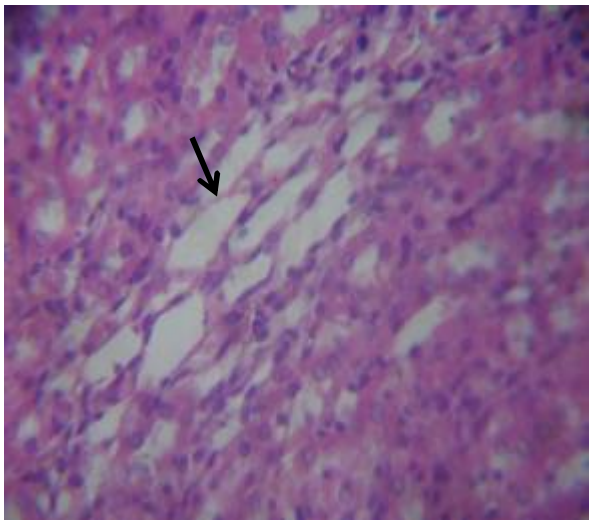


**Photo 57: Tubules amincis (flèche)**

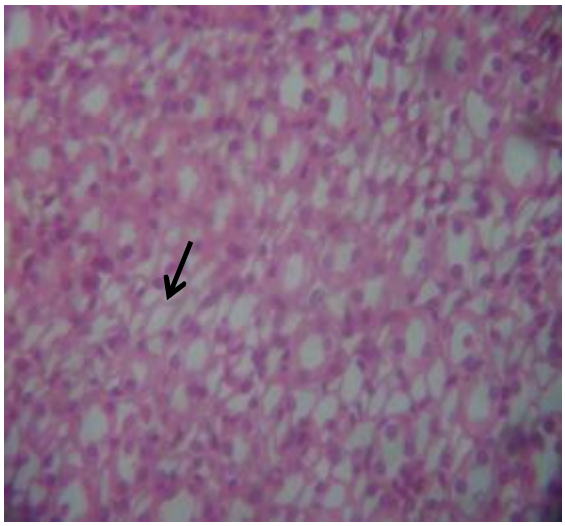
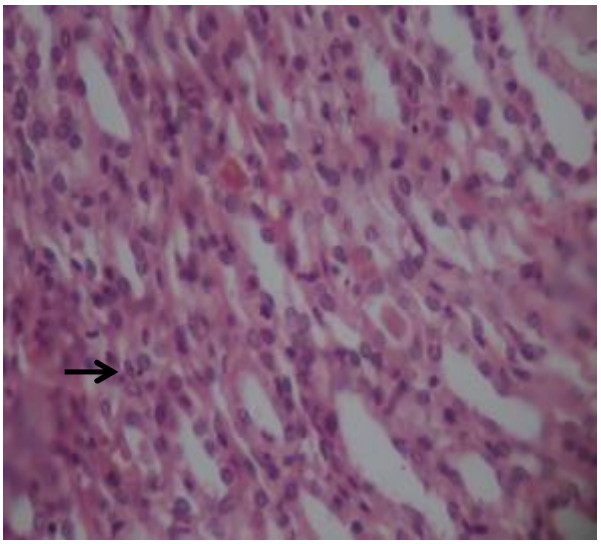


**Photo 58: Tube à épithélium pavimenteux (flèche)**

Chez les rats du lot Cc intoxiqués à faible dose de mercure et traités avec la vitamine C, on constate une absence de lésion visible (rein normal) comme chez les lots témoins(G). Chez les rats du groupe Dc intoxiqués à forte dose de mercure et traités avec la vitamine C, il a été observé une légère perte focale de l'épithélium de quelques tubules dans la médullaire rénale. Ces tubules ont cependant des restes de leurs membranes basales. Il a été noté un léger agrégat de cellules inflammatoires dans l'interstitium rénal (flèche). On observe dans la médullaire rénale un changement de l'épithélium tubulaires passant de la forme cubique à la forme cylindrique (astérix) (photos 59 et 60).



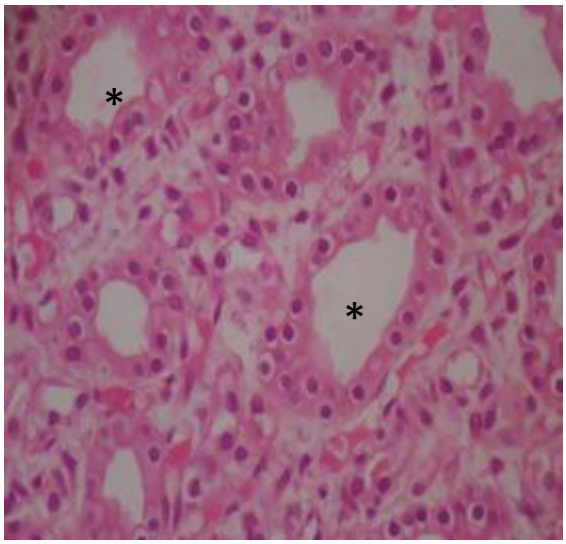


**Photo 59: Infiltrations inflammatoires dans l'interstitium rénal (flèche)**

**Photo 60 : Epithélium cylindrique dans la dans médullaire rénale (astérix)**

### 3.2.2 Foie

Au plan macroscopique, le foie des rats intoxiqués au mercure a été comparé au foie normal. Il a été noté que la consistance des foies des rats intoxiqués est friable contrairement aux rats témoins.

En microscopie photonique, les photos 61, 62, 63, 64 et 65 montrent respectivement les photos de foie normal de rats Wistar (Groupe contrôle); de foie de rats intoxiqués au mercure (C, D) et de foie de rats intoxiqués et traités avec la vitamine C (Cc, Dc).

L'architecture du parenchyme hépatique normal chez les rats témoins est marquée par des travées hépatocytaires disposées de façon radiaire autour de la veine centrolobulaire. Les hépatocytes présentent un cytoplasme basophile et volumineux; un ou deux noyaux bien visibles et peu colorés (photo 61).

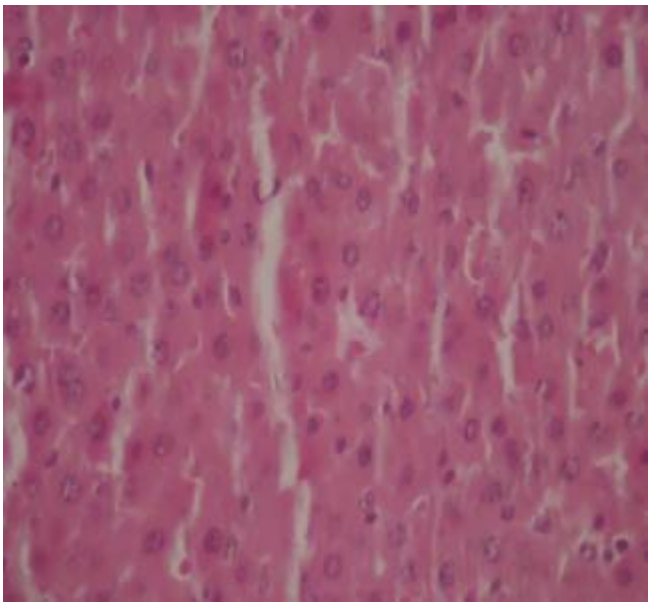


**Photo 61: Morphologie du foie normal de rat Wistar (lot G)**

Chez les rats du lot C, intoxiqués à la faible dose de mercure, il a été remarqué de rares hépatocytes nécrotiques isolés. Parmi ces derniers on distingue des cellules fantômes (flèches) et des noyaux pycnotiques (têtes de flèches) (photo 62). Chez les rats du lot D intoxiqués à une forte dose de mercure, il a été observé une hyperplasie modérée des cellules de kupffer (flèches) (photo 63).

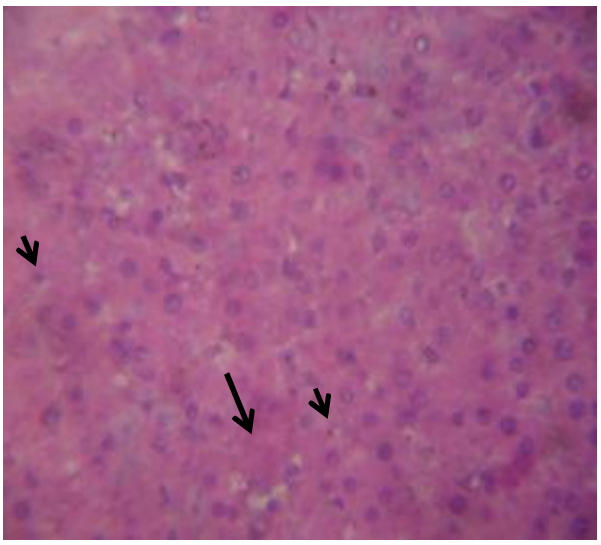


**Photo 62: Hépatocytes nécrotiques: cellules (flèche) et noyaux pycnotiques**

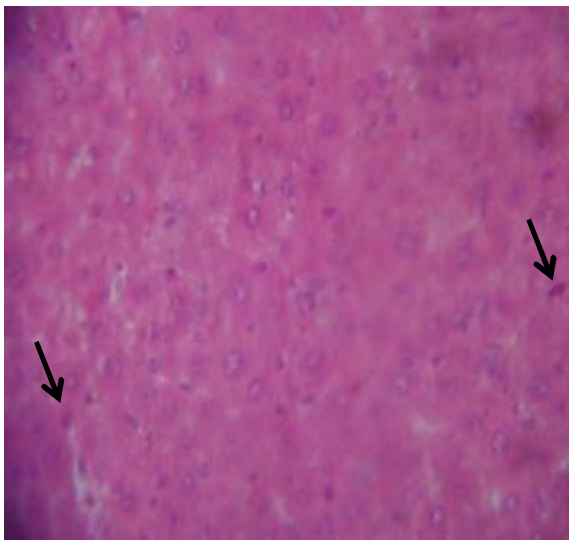


**Photo 63: Hyperplasie des Cellules fantômes de Kupffer (flèches) (têtes de flèche)**

Chez les rats du lot Cc, intoxiqués à faible dose de mercure et traités avec la vitamine C, il a été observé une légère modification vacuolaire des hépatocytes périportaux et les cellules de Kupffer contiennent des quantités variables de pigments noirs dans leur cytoplasme (photo 64). Chez les rats du lot Dc intoxiqués à forte dose de mercure et traités avec la vitamine C, il a été remarqué une congestion modérée des veines hépatiques (photo 65).

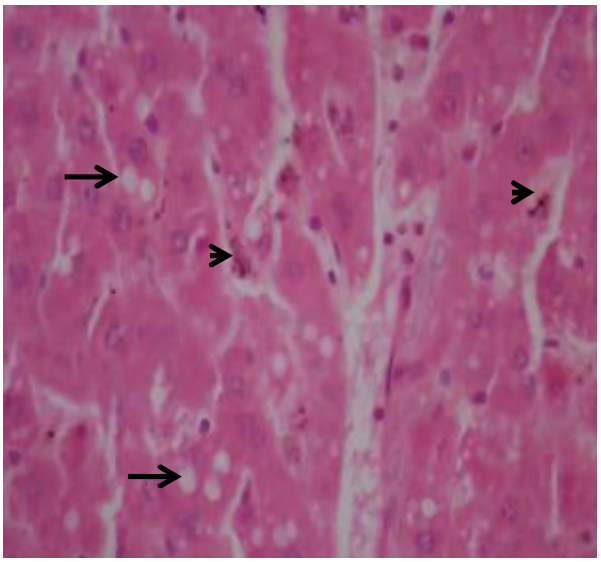


**Photo 64 : Légère modification vacuolaire (flèches) des hépatocytes périportaux. Cellules de Kupffer avec des pigments noirs (têtes de flèche)**

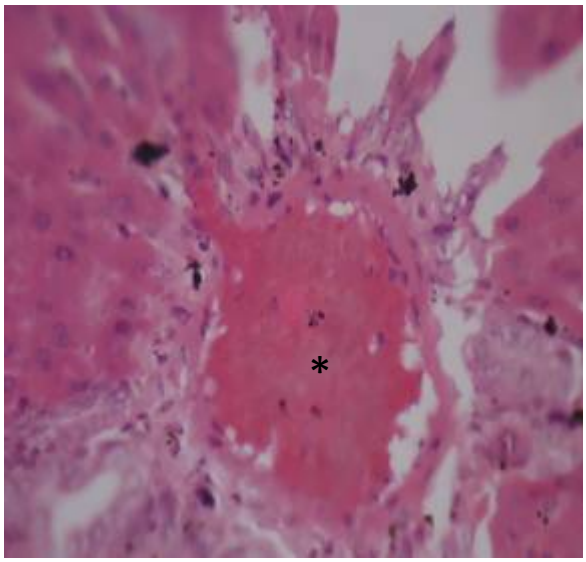


**Photo 65: Légère congestion des veines hépatiques (astérix)**

### 3.2.3 Cerveau

En microscopie photonique, les photos 66, 67, 68, 69, 70 71 et 72 montrent respectivement les photos du cerveau normal de rats témoins (G); du cerveau de rats intoxiqués au chlorure de mercure (0.12mg/kg; 1.2mg/kg) (C; D) et du cerveau de rats intoxiqués et traités avec la vitamine C (150mg/kg) (Cc; Dc).

Chez les rats témoins, on note une absence de lésion visible du cerveau (photo 66).

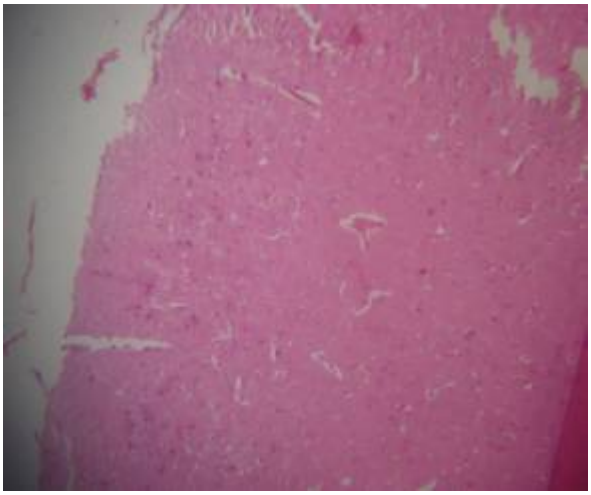
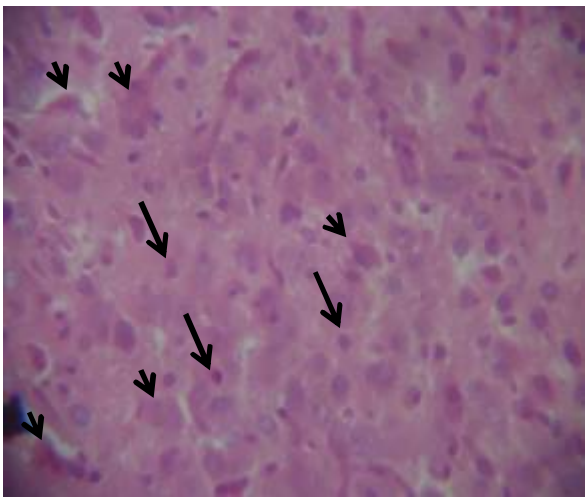


**Photo 66: Morphologie du cerveau normal du rat wistar (lot G)**

Chez les rats du lot C, intoxiqués à la faible dose de chlorure de mercure, il a été observé une nécrose aiguë focale des neurones avec pycnose (flèche), la présence des cellules fantômes (têtes de flèche) et une prolifération des astrocytes. Il a été noté également de multiples petits foyers de gliose (photos 67 et 68).



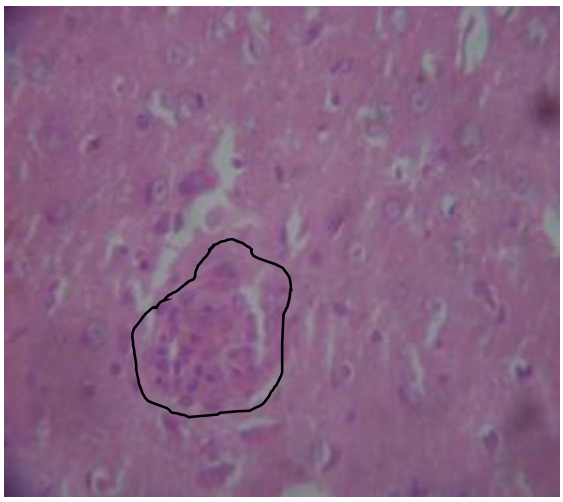


**Photo 67: Nécrose neuronale aiguë focale avec pycnose (flèche), cellules fantômes (tête de flèche)**

**Photo 68 : Foyer de gliose (zone entourée)**

Chez les rats du lot D intoxiqués à forte dose de mercure, il a été observé un centre de gliose astrocytaire modéree (zone entourée) vers la base du cerveau (photo 69).

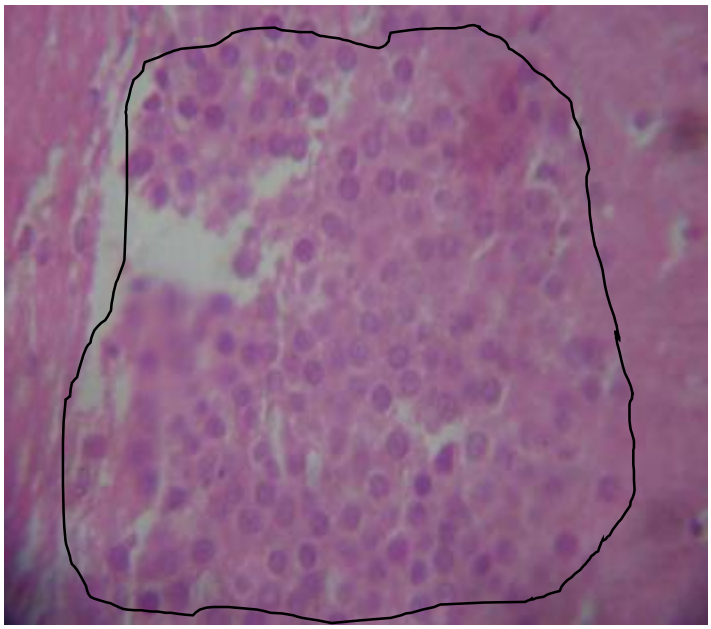
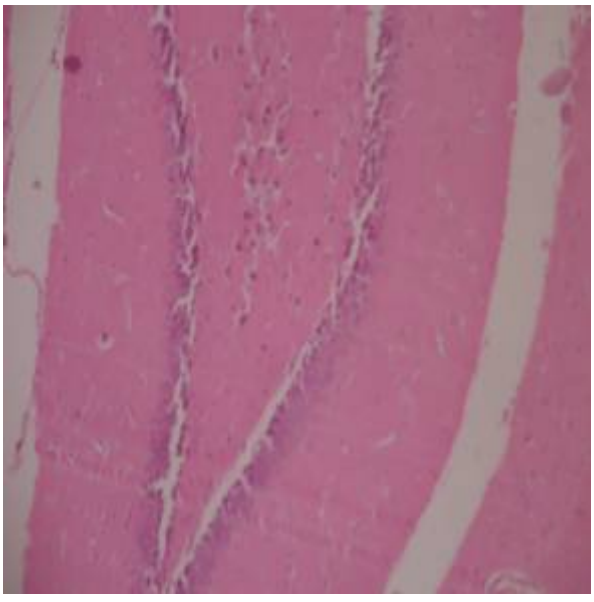


**Photo 69: Centre de gliose astrocytaire (zone entourée)**

Chez les rats du lot Cc intoxiqués à faible dose de mercure et traités avec la vitamine C, il a été noté une absence de lésion visible chez certains rats et une nécrose focale neuronale modérée, une gliose, ainsi qu'une congestion vasculaire marquée chez d'autres (photos 70 et 71).



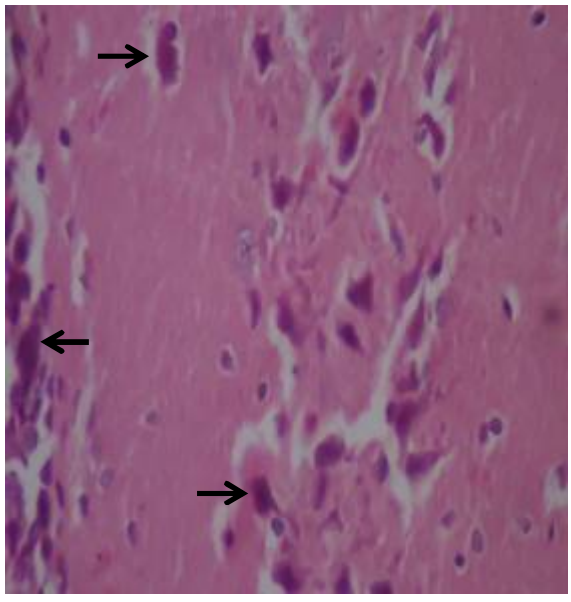


**Photo 70: Absence de lésion visible**

**Photo 71: Nécrose neuronale (flèche),**

**gliose et congestion vasculaire**

Chez les rats du lot Dc intoxiqués à forte dose de mercure et traités avec la vitamine C, il a été constaté une absence de lésion visible chez tous les rats de ce lot (photo 72).

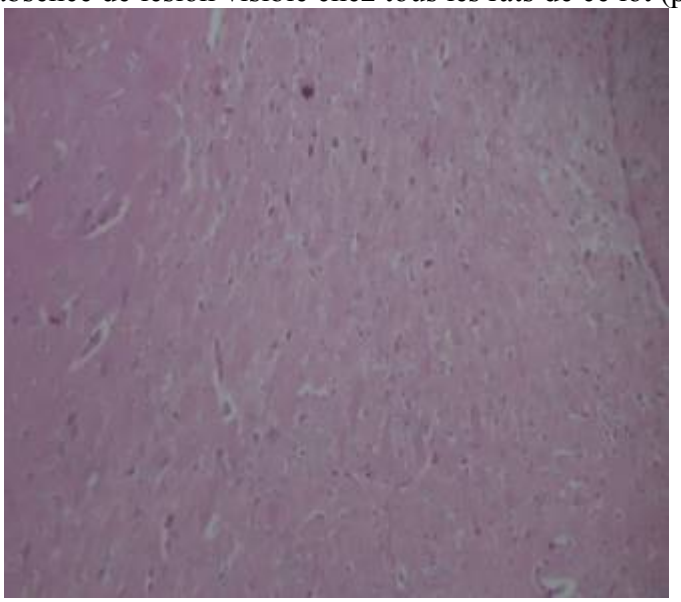


**Photo 72: Absence de lésion visible**

**Tableau XVI : Comparaison des résultats d'histopathologie entre les lots de rats intoxiqués au mercure et ceux intoxiqués au mercure puis traités avec la vitamine C**

| | Lots | organes / Traitement | Foie | Rein | Cerveau |
|---|---|---|---|---|---|
| | **G** | **Eau distillée** | **-** | **-** | **-** |
| **Mercure (Hg)** | **C** | **0.12mg/kg Hg** | **+** | **++** | **++** |
| | **Cc** | **0.12mg/kg Hg + 150 mg/kg Vit.C** | **+ /-** | **-** | **+** |
| | **D** | **1.2mg/kg Hg** | **+** | **++** | **+** |
| | **Dc** | **1.2mg/kg Hg + 150 mg/kg Vit.C** | **+ /-** | **+ /-** | **-** |

\+ : altération histopathologique ;
++ : altération histopathologique accentuée (lésion visible accentuée) ;
+/- : légère altération histopathologique ;
- : absence de lésion visible.

**Discussion**

Cette partie a porté sur l'effet de protection, hépatique, rénale et cérébrale de la vitamine C chez les rats intoxiqués au mercure. La coloration à l'Hématéine-éosine a permis

d'apprécier les lésions provoquées par le mercure sur les reins, le foie et le cerveau puis les réparations obtenues à travers l'utilisation de la vitamine C. Cette technique a été utilisée par Gabe (1968) pour colorier les structures de certains organes cibles.

Les reins sont les premiers organes cibles pour l'accumulation et la toxicité du mercure inorganique (Zalups, 2000). Les résultats histopathologiques obtenus sur le tissu des reins après une intoxication chronique au mercure indiquent, la présence de multiples foyers de tubules amincis avec épithélium pavimenteux (faible dose) et des changements vacuolaires de l'épithélium tubulaire au niveau des papilles rénales et quelques-unes sont pavimenteuses (forte dose). L'interaction du mercure avec les groupes sulfhydryliques de protéine montre le rôle important que joue ces derniers dans la néphrotoxicité induite par le mercure au niveau cellulaire (Zalups, 2000). Les changements de la morphologie et de la fonction mitochondriques sont des événements très tôt réalisés qui suivent l'administration du chlorure de mercure. Ceci suggère que le dysfonctionnement mitochondrique et le stress oxydant ont un rôle important dans la toxicité rénale induite par le mercure. Ces résultats sont semblables à ceux rapportés par Al-Saleh *et al*. (2005), Alam *et al.* (2007), Sharma *et al.* (2007), Augusti *et al.* (2008) et Agarwal *et al.* (2010a; 2010b), Oda-Samah et El-Ashmawy (2012) après une intoxication au chlorure de mercure. Les résultats obtenus chez les rats intoxiqués à faible dose de mercure et traités avec la vitamine C montrent une absence de lésion visible (rein normal) chez les rats du lot Cc. Cependant, il a été observé chez les rats du lot Dc, intoxiqués à une forte dose de mercure et traités avec la vitamine C, une légère perte focale de l'épithélium de quelques tubules dans la médullaire rénale et un léger agrégat de cellules inflammatoires dans l'interstitium rénal. On observe dans la médullaire rénale un changement de l'épithélium tubulaire passant de la forme cubique à la forme cylindrique. Ces résultats comparativement aux premiers montrent que la vitamine C utilisée a réduit la gravité de l'intoxication rénale due au mercure chez les rats wistar. Cet effet favorable de la vitamine C a été aussi prouvé par Omonkhua et Obi, 2008 sur une intoxication rénale au cadmium.

Les changements histopathologiques du foie dues à une intoxication chronique au mercure sont : rares hépatocytes nécrotiques isolés. Parmi ces derniers on distingue des cellules fantômes et des noyaux pycnotiques avec la faible dose de mercure et une hyperplasie modérée des cellules de kupffer avec la forte dose de mercure. Des changements similaires ont été également rapportés par Oda-Samah et El-Ashmawy (2012), Al-Saleh *et al*. (2005), Jadhac *et al. (*2007), Wadaan (2009) et Agarwal *et al. (*2010 a, 2010 b) dans les tissus de foie

après une exposition au mercure. Chez les rats du lot Cc et Dc intoxiqués et traités avec la vitamine C, il a été observé une légère modification vacuolaire des hépatocytes périportaux et une congestion modérée des veines hépatiques. La comparaison de ces résultats montre le rôle protecteur que joue la vitamine C utilisée comme un complément alimentaire. De pareille amélioration hépatique a été obtenue par Dougnon *et al.,* (2006) après une intoxication au paracétamol et corrigée avec du jus d'ananas frais. De même Oda-Samah et El-Ashmawy (2012) ont démontré comme le cas de cette étude, l'effet protecteur du Silymarin sur la nephro-hepatotoxicité aigu du mercure induit chez les rats. Structure très sensible pour le développement, le cerveau est très sensible et est vulnérable aux effets dévastateurs de beaucoup de composantes environnementales, de facteurs biologiques et l'exposition alimentaire aux métaux lourds comme le mercure (Schettler, 2001). Des effets Neurotoxiques du mercure sont montrés dans des études *in vitro* et *in vivo* chez l'humain et les animaux. Des recherches précédentes ont montré les effets de l'intoxication du mercure sur des fonctions comportementales, neurologiques et psychologiques. Les composantes du mercure peuvent induire: dégénération cérébelleuse, perturbations sensorimotrices et dépression (Berlin *et al*., 1969; Hughes et Annau, 1976; Kishi *et al.,* 1994; Yamashita *et al.,* 1997; Myers et Davidson, 1998; Diez, 2009; Nahavadi et Shahbazi, 2010). Les résultats de la présente étude montrent : une nécrose aiguë focale des neurones avec pycnose, la présence des cellules fantômes et une prolifération des astrocytes, la présence de multiples petits foyers de gliose chez les rats intoxiqués à faible dose de mercure. On note aussi un centre de gliose astrocytaire modérée vers la base du cerveau des rats intoxiqués avec une forte dose de mercure. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Eto (1997), qui ont prouvé l'apparition d'un œdème cérébral aigu avec nécrose focale des neurones et leur remplacement par des cellules gliales après une intoxication au mercure.

Chez les rats du lot Cc et Dc intoxiqués au mercure et traités avec la vitamine C, il a été remarqué comme chez le témoin (lot G) une absence de lésion visible chez certains rats et une nécrose focale neuronale modérée, une gliose, ainsi qu'une congestion vasculaire chez d'autres. La comparaison des ces résultats à ceux des groupes intoxiqués montre l'effet protecteur de la vitamine C sur la neurotoxicité du mercure. Comme ces résultats obtenus, d'autres études ont montré que la vitamine C utilisée comme supplément alimentaire a changé les effets induits par des toxiques (Awodele *et al*., 2010; Ddique *et al.,* 2005; Liopiz *et al.*, 2004; Kaya, 2003 ; Aly et Donya, 2002, Netke *et al.,* 1997; Khan et Sinha ,1993). L'acide

ascorbique s'est avéré pour interagir sur plusieurs éléments (toxiques) de façon à les rendre moins disponibles pour des animaux (Hill, 1980). Il a été également démontré l'effet protecteur de la vitamine C sur la toxicité du mercure (Hill, 1980). En cosidérant le stress oxydatif et la toxicité du mercure, il a été démontré que les antioxydants contribuent au traitement de l'intoxication du mercure (Patrick, 2002, Pillai et Gupta 2005). La vitamine C est un puisssant antioxydant capable d'éliminer les radicaux libres, les ROS et elle augmente ainsi le potentiel antioxydant des cellules en améliorant les effets délétères des réactions de radicaux libres (Flora *et al*., 2008). En outre, en tant qu'antioxydant, la vitamine C régularise le contenu intracellulaire du glutathion réduit (GSH) et chélate des ions en métal (Borsari *et al.,* 2001; Flora *et al.,* 2008).

### 3.3 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués avec une combinaison du mercure et du cadmium

#### 3.3.1 Reins

Chez les rats du lot E, intoxiqués avec la combinaison de faible dose des deux métaux, il a été observé une nécrose de coagulation modérée au niveau des tubules rénaux (flèches) et matières éosinophiles intralumiales (tête de flèche) (Photo 73). Chez les rats du lot F, intoxiqués à la combinaison de forte dose de cadmium et de mercure, il a été observé une prolifération de l'épithélium tubulaire au niveau de la papille rénale (photo 74).

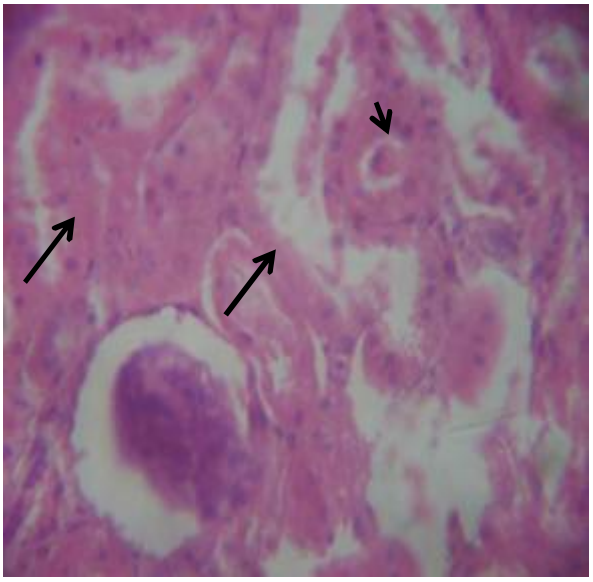


**Photo 73: Nécrose de coagulation (flèches) et matière éosinophile intralumiale (tête de flèche)**

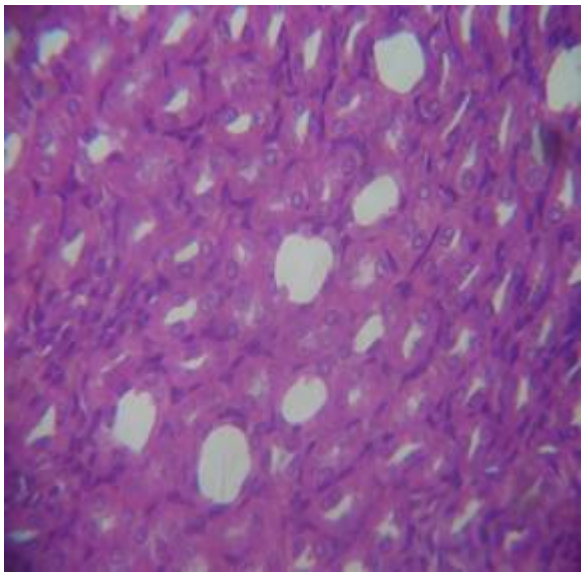


**Photo 74 : Prolifération de l'épithélium au niveau de la papille**

Chez les rats du lot Ec intoxiqués avec une faible dose des deux métaux et traités avec la vitamine C, il a été observé dans la médullaire rénale un gonflement modéré des cellules épithéliales des tubules (flèches). L'épithélium tubulaire présente quelques cellules nécrotiques (très éosinophiles) (têtes de flèche). Il a été aussi constaté une légère congestion des vaisseaux sanguins rénaux (flèche).

Les tubes normaux avec épithélium cubique plat dans la médullaire rénale, sont largement séparés les uns des autres (trait). On y observe également un gonflement marqué de l'épithélium tubulaire (tête de flèche) et les lumières sont moins distinctes (photos 75, 76).

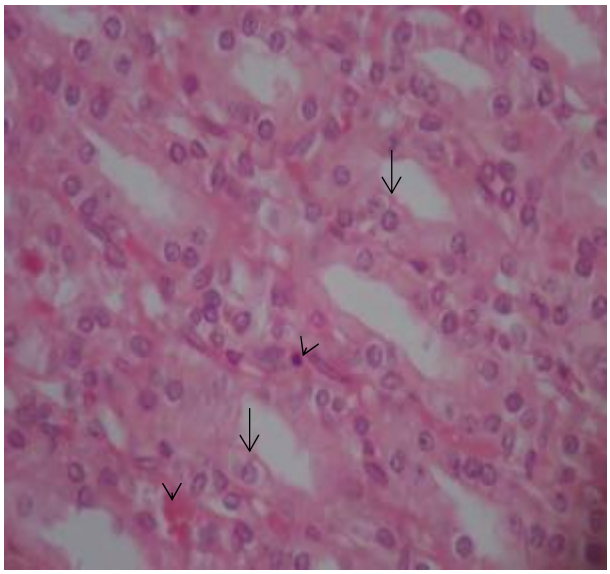


**Photo 75: Léger gonflement dans la médullaire rénale (flèches) et présence de quelques cellules nécrotiques (têtes de flèche)**

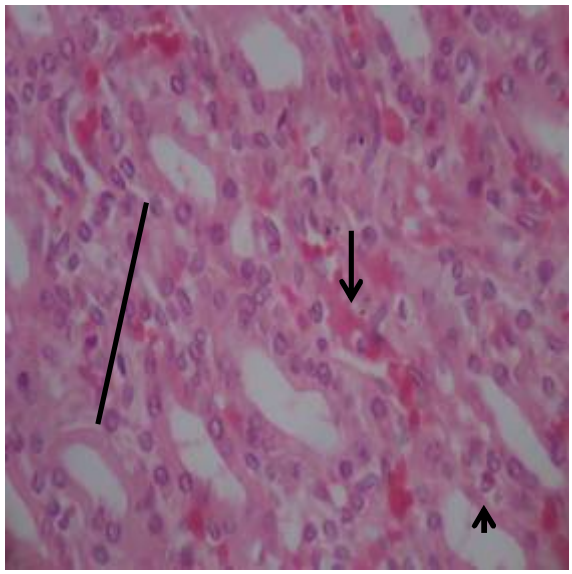


**Photo 76: Légère congestion vasculaire (flèche) ; large séparation entre les tubes rénau**

Chez les rats du lot Fc intoxiqués avec la combinaison de forte dose de cadmium et de mercure ensuite traités avec la vitamine C, il a été remarqué quelques foyers d'anciens tubes avec la membrane basale intacte, mais sans les cellules épithéliales. Les membranes basales sont rétrécies et comprimées. On constate aussi que dans les lumières de quelques tubes rénaux, qu'il y a un matériel éosinophile de forme cylindrique ovoïde, susceptibles d'être des cylindres tubulaires. Les vaisseaux sanguins rénaux sont légèrement congestionnés (photos 77 ; 78).

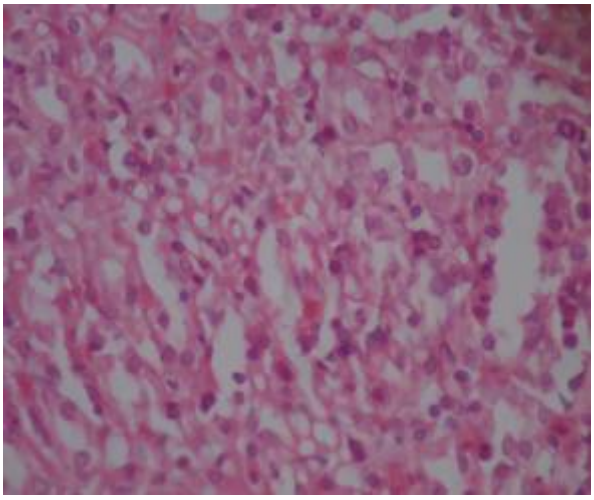


**Photo 77: Foyers d'anciens tubes avec membrane basal intacte, sans cellules épithéliales**

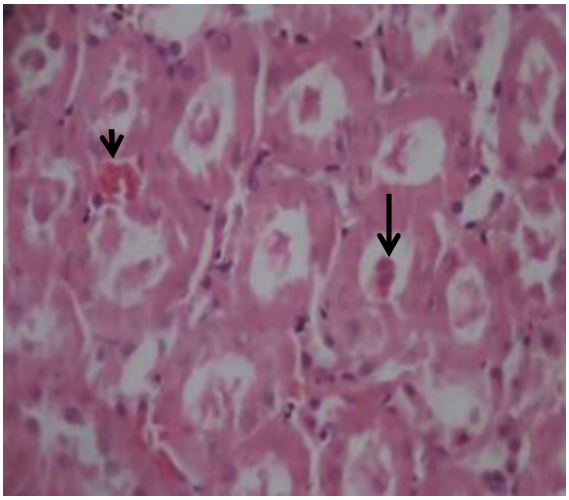


**Photo 78: Cylindres tubulaires (flèches). Les vaisseaux sanguins rénaux sont légèrement congestionnés (tête de flèche)**

### 3.3.2. Foie

Chez les rats du lot E, traités avec la combinaison de faible doses des deux métaux, il a été remarqué une hyperplasie très étendue des cellules de kupffer. Les vaisseaux sanguins sont congestionnés et contiennent un plasma hyper-visqueux (riche en protéines) autour des globules rouges (photos 79, 80).

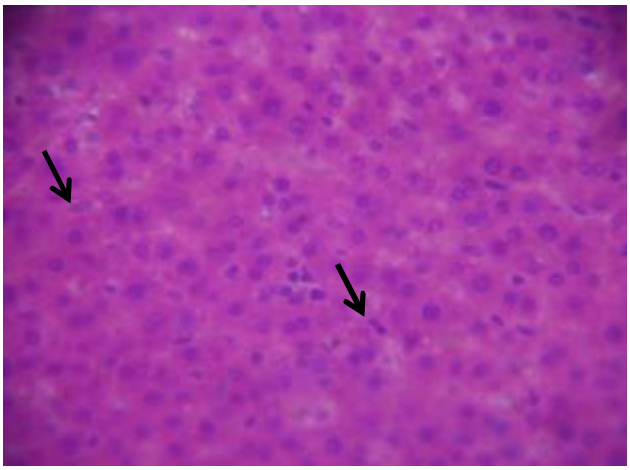


**Photo 79: Hyperplasie étendue des cellules de Kupffer (flèches)**

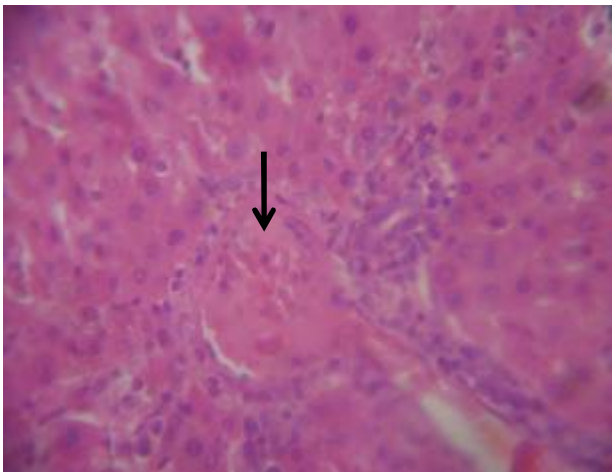


**Photo 80:Vaisseauxsanguins congestionnés avec plasma riche en protéines (flèche)**

Chez les rats du lot F, intoxiqués à la combinaison de forte dose de cadmium et de mercure, il a été noté que le parenchyme hépatique est désorganisé : les espaces entre les travées hépatiques sont larges, les noyaux d'hépatocytes sont picnotiques voire absents ; leur

cytoplasme est moins dense et légèrement acidophile ; les sinusoïdes hépatiques sont presque absents (photo 81).

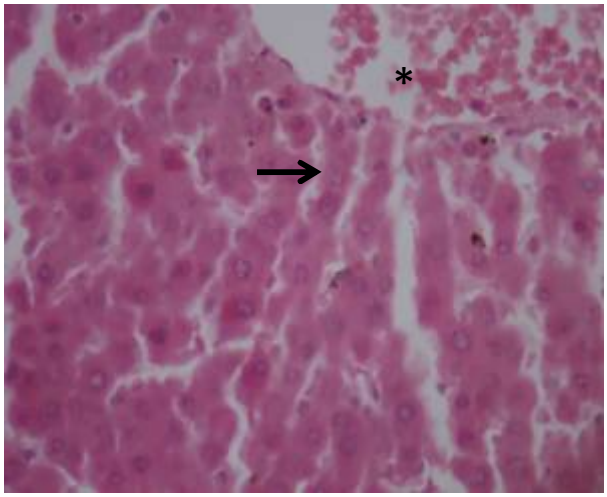



**Photo 81 : Parenchyme hépatique désorganisé, travées hépatiques amincis (flèche) autour des veines centro-lobulaires (astérix)**

Chez les rats du lot Ec, intoxiqués avec la combinaison de faible dose de cadmium et de mercure et traités par la vitamine C, il a été noté un léger changement vacuolaire généralisé des hépatocytes conférant un aspect pumeux à la coupe et une congestion modérée des veines hépatiques (Photos 82, 83).

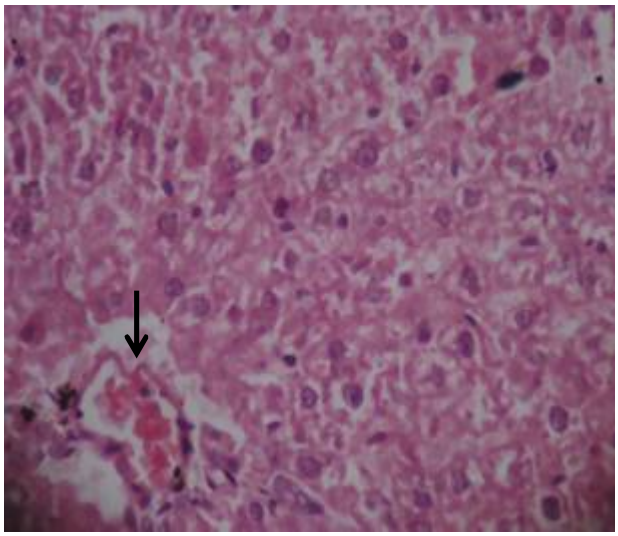


**Photo 82 : Changement vacuolaire des hépatocytes et congestion modérée des veines hépatiques (flèche)**

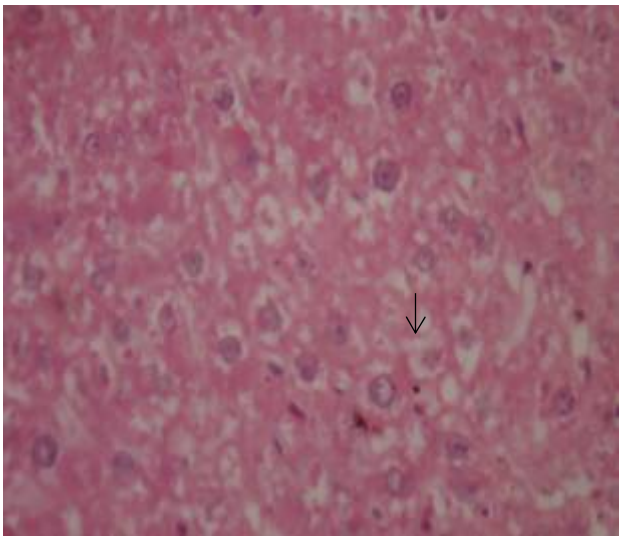


**Photo 83: Léger changement vacuolaire généralisé des hépatocytes (flèche)**

Chez les rats du lot Fc intoxiqués avec la combinaison de forte dose de cadmium, de mercure et traités avec la vitamine C, il a été observé une rare nécrose unicellulaire d'hépatocytes et une légère congestion de sinusoïdes veineuses (photo 84).

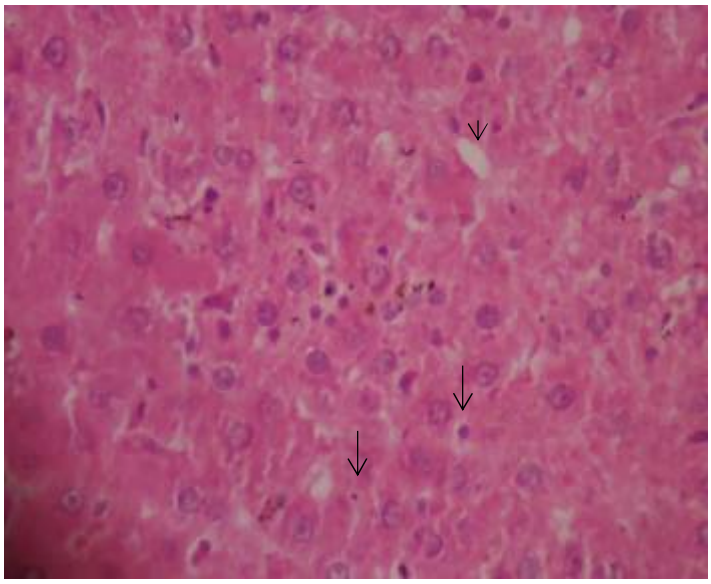


**Photo 84 : Nécrose unicellulaire des hépatocytes (flèches) et une légère congestion des sinusoïdes hépatiques (tête de flèche)**

### 3.3.2 Cerveau

Chez les rats du lot E, traités avec la combinaison de faible doses des deux métaux, il a été observé de multiples foyers de malacie modérée et une gliose (photo 85).

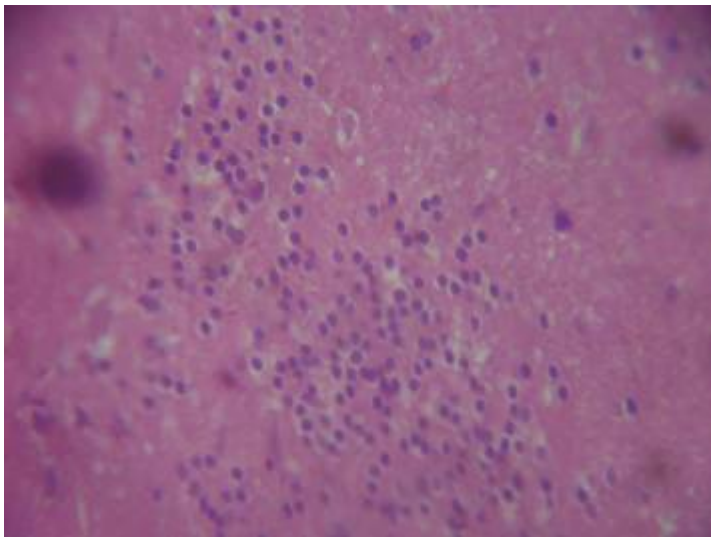


**Photo 85 : Multiple foyers de malacie modérée et gliose**

Chez les rats du lot F, intoxiqués à la combinaison de forte dose de cadmium et de mercure, il a été observé un léger foyer d'encéphalomalacie focale et une satellitose périneuronale modérée (flèches) (photo 86).

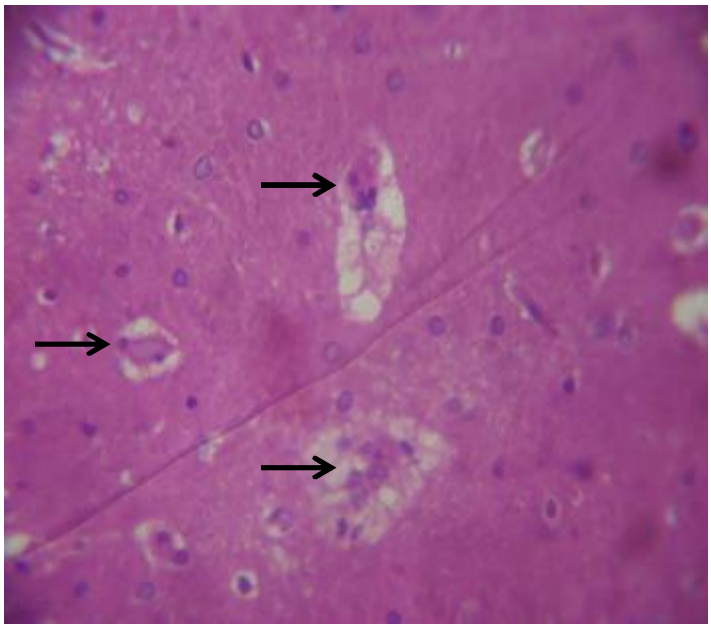


**Photo 86: Satellitose périneuronale (Flèche)**

Chez les rats du lot Ec intoxiqués avec la combinaison de faibles doses des deux métaux et traités avec la vitamine C, il a été observé une gliose multifocale. Les vaisseaux sanguins cérébraux sont légèrement congestionnés (photos 87; 88).

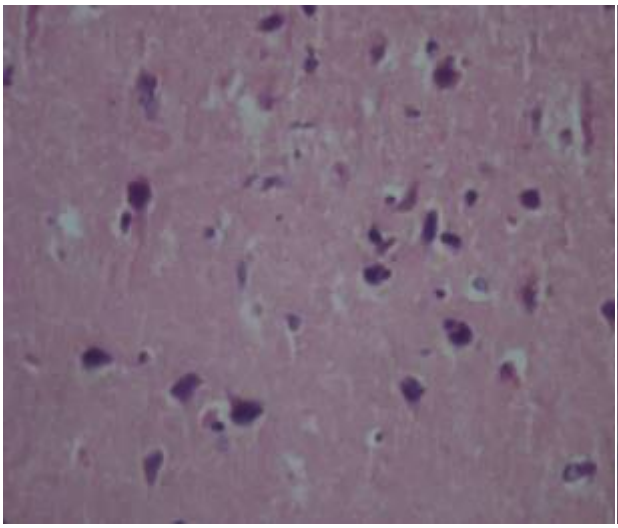


**Photo 87 : Gliose multifocal**

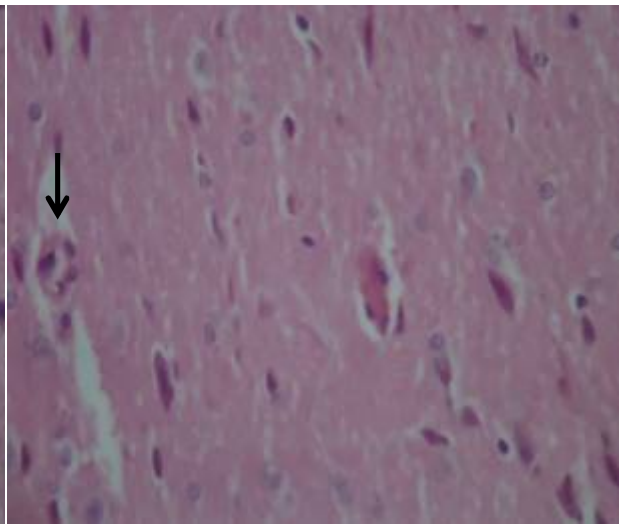


**Photo 88: Légère congestion des vaisseaux sanguins (flèche)**

Chez les rats du lot Fc intoxiqués avec la combinaison de fortes doses des deux métaux et traités avec la vitamine C, il a été observé une absence de lésion visible chez certains et chez d'autres, il y a été noté une gliose focale (zone entourée) et des vaisseaux sanguins légèrement congestionnés (flèches) (photos 89, 90).

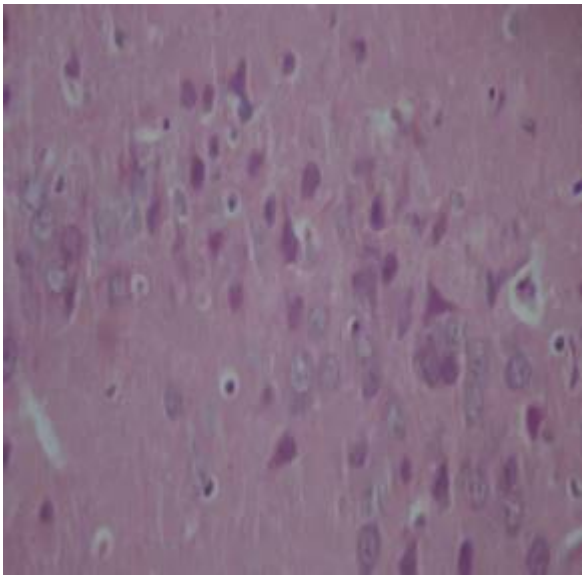


**Photo 89: Absence de lésion visible**



**Photo 90: Gliose focale (partie encerclée) les vaisseaux sanguins légèrement congestionnés (flèches)**

**Tableau XVII: Comparaison des résultats d'histopathologie entre les lots de rats intoxiqués à la combinaison de cadmium et de mercure et ceux intoxiqués et traités avec la vitamine C**

| | Lots | organes / Traitement | Foie | Rein | Cerveau |
|---|---|---|---|---|---|
| | G | Eau distillée | - | - | - |
| Cadmium (Cd) + Mercure (Hg) | E | 0.25mg/kg Cd + 0.12mg/kg Hg | ++ | +++ | +++ |
| | Ec | 0.25mg/kg Cd +0.12mg/kg Hg + 150 mg/kg Vit.C | + | + | ++ |
| | F | 2.5mg/kg Cd +1.2mg/kg Hg | ++ | + | ++ |
| | Fc | 2.5mg/kg Cd+ 1.2mg/kg Hg + 150 mg/kg Vit.C | + | + | +/- |

\+ : altération histopathologique ;
++ : altération histopathologique accentuée (lésion visible accentuée) ;
+++ : altération histopathologique très accentuée ;
+/- : légère altération histopathologique ;
\- : absence de lésion visible.

## Discussion

L'effet de protection, hépatique, rénale et cérébrale de la vitamine C chez les rats intoxiqués par la combinaison de cadmium et de mercure a été évalué. Comme les résultats précédents, il a été noté les changements histopathologiques des organes cibles après intoxication des rats aux différentes doses de la combinaison du cadmium et du mercure. Sur les reins il a été noté un gonflement modéré des cellules épithéliales des tubules, une présence de cellules nécrotiques, une légère congestion des vaisseaux sanguins rénaux, des tubes normaux avec épithélium cubique plat dans la médullaire rénale largement séparés les uns des autres, marqué de l'épithélium tubulaire, une présence de membranes basales comprimées sans cellules épithéliales. Quant au foie, il a été remarqué une hyperplasie très étendue des cellules de kupffer, les vaisseaux sanguins congestionnés, les parenchymes hépatiques désorganisés, les travées hépatiques amincies autour des veines centro-lobulaires. En ce qui concerne le cerveau, il a été observé de multiples foyers de malacie modérée et une gliose léger, le foyer d'encéphalomalacie focale et satellitose périneuronale modérée. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de nombreux auteurs (Kjellström, 1986; World Health Organization, 1992; Nordberg *et al.,* 1994; Sakurama, 1998; Bunout, 1999) qui ont affirmé après des études histopathologiques, qu' une co-exposition au cadmium et au mercure induit une hépato, nephro et neurotoxicité mais ils affectent ces organes de différentes manières. En comparant ces résultats à ceux induits par chaque métal, il a été constaté que la combinaison des deux métaux à faibles doses a induit une intoxication accentuée sur les reins et le cerveau. La combinaison (0.25mg/kg Cd + 0.12mg/kg Hg) s'est donc avérée plus toxique pour ces deux organes tandis que la forte dose de cadmium (2,5mg/kg) s'est révélée plus toxique pour le foie. Ces résultatts nous pemettent de dire que la dose, le type de métal et les différentes combinaisons influent sur la toxicité. L'intoxication aiguë et chronique de la co-exposition au cadmium et au mercure induit une nephropartie avec de divers niveaux de sévérité (Barbier *et al.,* 2005). Le cadmium et le mercure, tous deux se sont avérés pour empêcher l'activité des enzymes principales comme la phosphatase alkaline non seulement dans le sang mais aussi dans plusieurs tissus comme le foie, rein, cerveau. La perte d'activité de phosphate alkaline chez le rat due à ces métaux peut être une conséquence des changements de la perméabilité de la membrane de plasma en plus des changements de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la protéine enzymatique (Rana *et al.,* 1996 ; plavaux, 1997).

Chez les rats des lots Ec et Fc soumis à une co-exposition du cadmium et du mercure et traités avec la vitamine C, il a été noté sur les reins un léger gonflement des cellules épithéliales tubulaires, la présence de quelques cellules nécrotiques, une légère congestion vasculaire, des foyers d'anciens tubes avec la membrane basale intacte sans les cellules épithéliales, des cylindres tubulaires, des vaisseaux sanguins rénaux légèrement congestionnés. Quant au foie, il a été remarqué un léger changement vacuolaire généralisé des hépatocytes conférant un aspect pumeux à la coupe et une congestion modérée des veines hépatiques ; une rare nécrose unicellulaire d'hépatocytes et une légère congestion de sinusoïdes veineuses. En ce qui concerne le cerveau, il a été observé une gliose multifocale, une légère congestion des vaisseaux sanguins cérébraux, une gliose focale et une abscence de lésion visible. La comparaison de ces résultats aux précédents montre l'effet protecteur de la vitamine C sur l'hépato, la nephro et la neurotoxicité de la co-exposition du cadmium et du mercure.

**Conclusion partielle**

La toxicité chronique du cadmium, du mercure et de leur combinaison ont induit de différentes manières des changements histopathologiques sur la structure des reins, du foie et du cerveau chez les rats wistar intoxiqués. La forte dose de chlorure de cadmium (2,5 mg/kg) s'est avèré plus toxique pour le foie. De même la combinaison des faibles dose des deux métaux (0.25mg/kg Cd + 0.12mg/kg Hg) est plus toxique pour les reins et le cerveau. La vitamine C (150mg/kg/J) utilisée comme complément alimentaire a amélioré les effets néphro, hépato, neurotoxique induits par le cadmium, le mercure et leur combinaison sur les rats mâles wistar.

# *CONCLUSION GENERALE ET SUGGESTION*

L'objectif principal de ce travail est d'étudier le risque d'exposition de la population de Ganvié aux ETM (plomb, cadmium, mercure) et d'évaluer *in vivo* l'effet protecteur de la « vitamine C » contre les effets du cadmium et du mercure.

L'étude a confirmé la contamination métallique de l'eau, des sédiments et des espèces halieutiques de la cité lacustre de Ganvié avec une accumulation plus importante dans les sédiments.

Le plomb s'est révélé être le métal fortement accumulé tant par les sédimnents, les poissons et crevettes que par l'eau. Les teneurs enregistrées dans ces différentes composantes dépassent largement les normes.

De même le cadmium s'est aussi accumulé dans les sédiments, les produits halieutiques et l'eau. Les teneurs moyennes de ce métal dépassent aussi les normes fixées lorsqu'on considère ces 3 composantes de l'écosystème de Ganvié.

Le risque d'exposition de la population de Ganvié au plomb et cadmium à travers la consommation des poissons à été ensuite évalué. Les doses journalières d'exposition (DJE) au plomb et au cadmium, via la consommation des espèces de poissons *Liza falcipinnis*, *Sarotherodon melanotheron*, *Chrysichthys auratus* se sont avérées en général plus élevées que les limites autorisées par l'OMS. Les risques potentiels qu'implique ce dépassement particulièrement pour les enfants (plus exposés que les adultes) appellent à une prise de conscience vis-à-vis de l'environnement.

Le mercure, quant à lui, semble être par ses teneurs, le métal qui présente le moins de risque sanitaire aujourd'hui lorsque nous consommons les poissons (*Sarotherodon melanotheron, Chrysichthys auratus* plus utilisés parla population). Cependant, ce métal a été fortement concentré dans les sédiments et dépasse les normes. Il est aussi présent dans les poissons et dans l'eau. Cependant, les teneurs moyennes enregistrées dans les poissons et dans l'eau sont en dessous des normes. Ainsi, il est probable que la forme méthylée (beaucoup plus toxique à faible dose) soit présente dans la biocénose de la cité lacustre de Ganvié.

L'originalité de la présente étude vient du fait que loin de se limiter à constater et à évaluer le risque d'exposition métallique à travers les poissons, il a ensuite évalué *in vivo* l'effet protecteur de la « vitamine C » contre les effets du cadmium et du mercure.

L'expérimentation *in vivo* menée sur les rats intoxiqués au cadmium, au mercure et à leur combinaison a révélé des signes de toxicité clinique, de variation des paramètres hématologiques et d'altération histopathologique des organes (reins, foie et cerveau). Ces différents signes de toxicité ont été plus remarqués chez les lots intoxiqués avec la forte dose de mercure (1.2mg/kg) et la combinaison de la forte dose de cadmium et de mercure (2.5mg/kg Cd + 1.2mg/kg Hg) pour les variations hématologiques et les signes cliniques de toxicité (apparition d'abcès, disparition de poils, blessure sur la queue). Pour les altérations histopathologiques, la forte dose de chlorure de cadmium (2,5mg/kg) s'est révélée plus toxique pour le foie tandis que la combinaison des faibles doses des deux métaux (0.25mg/kg Cd + 0.12mg/kg Hg) s'est avérée plus toxique pour les reins et le cerveau. Il a été constaté suivants les différents paramètres de toxicité évalués, une diminution de la toxicité avec les lots de rats traités par chacun de ces deux métaux et ensuite par leur combinaison et ayant reçu la vitamine C (150mg/Kg/J) comme complément alimentaire.

La vitamine C a ainsi joué le rôle de protection contre l'intoxication induit par le chlorure de cadmium, le chlorure de mercure et de leur combinaison chez les rats. Il est donc recommandé l'utilisation de l'acide accorbic comme puissant antioxydant.

Le nouveau millénaire qui vient d'être amorcé est porteur de plusieurs défis parmi lesquels figurent en bonne place la protection de l'environnement et un développement humain durable en Afrique. Il s'agit alors de santé de l'environnement et de santé publique. C'est dans cette vision que nous suggérons :

- ***A l'adresse du Ministère de l'Environnement et de la Protection de la Nature***
  - Construire les postes de regroupement pour la collecte des ordures ménagères à Ganvié ;
  - Encourager, soutenir, réorganiser le secteur de collecte des ordures avec la création d'une filière de récupération en vue de recyclage pour certains déchets, en particulier ceux qui contiennent les métaux lourds ;
  - Incinérer les déchets pourvoyeurs de métaux et les mettre dans des sarcophages munis d'imperméabilisant ;
  - Construire des centres de collecte et d'épuration des déchets d'eaux usées domestiques et urbain et d'eaux résiduaires industrielles avant leur rejet dans les lacs ;

- Faire des audits pour contrôler les rejets industriels avant leur rejet dans les eaux de surface ;
- Construire des latrines à Ganvié ;
- Dépolluer le lac ;

➢ ***A l'adresse du Ministère de la Santé***

- Vulgariser le code d'hygiène publique en vigueur au Bénin dans les langues locales ;
- Créer des points d'eau potable à la portée de la population;
- Organiser des séances d'IEC pour sensibiliser la population sur la pollution de leur cadre de vie et les risques ;

➢ ***A l'adresse des populations riveraines***

- Eviter le rejet des ordures et déchets pourvoyeurs de métaux dans le lac ;
- Sensibiliser la population sur l'assainissement et le tri à la base des déchets ;
- Limiter l'usage des barques motorisées ;
- Limiter et varier les espèces de poissons consommés afin de réduire le risque d'exposition ;

➢ ***A l'adresse des scientifiques***

- Vérifier si l'essence frelatée utilisée actuellement est effectivement sans plomb ;
- Mener des études pour sélectionner les fruits renfermant une forte teneur en vitamine C afin de les indiquer à la population ;
- Définir le nombre de chaque fruit riche en vitamine C qu'un adulte ou qu'un enfant peut consommer par jour et par repas ;
- Sensibiliser la population à accompagner les repas, des fruits et ceux-ci riches en vitamine C.

# *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

1- ABI-GHANEM C. (2008) Spéciation des trois éléments traces Mercure, Plomb et Cadmium dans les sédiments marins des zones côtières Libanaises. Thèse de Doctorat Agro- Paris - Tech. Laboratoire de chimie analytique F-75231 Paris - Cedex 05 Ifremer, p. 313.

2- ACADEMIE DES SCIENCES (1998) Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. Rapport N° 42, Paris, Lavoisier, Tec. Doc, p.440.

3- ADAM S., EDORH A. P., TOTIN H., AMOUSSOU E., KOUMOLOU L., ADJAHOSSOU B. S., HOUNKPATIN A., BOKO M. (2011**)** Risques d'exposition au plomb via l'eau de boisson dans la ceinture cotonnière de Gogounou, Kandi, Banikoara (Bénin). J. Rech. Sci. Univ. Lomé (Togo), Série A, 13 (2) : 15-21.

4- ADEMOROTI C. A. (1996) Standard methods for water end effluent analysis. Foludex. Press. ldt., ibadan, p.182.

5- AGARWAL A., GOEL S., BEHARIA J. (2010a) Detoxification and antioxidant effects of cur cumin in rats experimentally exposed to mercury. Journal of Applied Toxicology, 30: 457-468.

6- AGARWAL A., GOEL S., CHANDRA R., BEHARIA J. (2010b) Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. Environmental Toxicology and Pharmacology, 29: 70-78.

7- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (2003) Institut de veille sanitaire. Le méthylmercure. Programme "mortalité et morbidité des maladies d'origine alimentaire" – Volet toxicologique - Contaminants chimiques et risque alimentaire en France, document de travail, p.92.

8- AGONKPAHOUN D. E. (2006) *Evaluation* de la pollution des eaux continentales par les métaux toxiques : Cas de la rivière Okpara et du lac Nokoué au Bénin. Thèse de Docteur en Pharmacie. Faculté des Sciences de la Santé, UAC, Bénin, p. 96.

9- AKIN A. (1997) Installation d'un système d'évacuation des excréta dans les cités lacustres du Bénin : Cas de Ganvié. CREPA, Cotonou, p.46.

10- ALAM M.S., KAUR G., JABBAR Z., JAVED K., ATHAR M. (2007) *Eruca sativa* seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. Food and Chemical Toxicology, 45: 910-920.

11- ALIMBA C. G., BAKARE A. A., LATUNJI C. A. (2006) Municipal landfill leachates induced chromosome aberrations in rat bone marrow. African J. Biotech., 5: 2053-2057.

12- ALIMBA C. G., BAKARE A. A., AINA O. O. (2012) Liver and Kidney Dysfunction in Wistar Rats Exposed to Municipal Landfill Leachate. Scientific. Academic. Publish., 2(4): 150-163.

13- AL-SALEH I., EL-DOUSH I., SHINWARI N., AL-BARADEI R. (2005) Does low mercury containing skin lightening cream (Fair and Lovely) affect the kidney, liver and brain of female mice? Cutaneous and Ocular Toxicology, 24: 11-29.

14- ALVES R. E., FILGUEIRAS H. A. C., MOURA C. F. H., ARAUJO N. C. C., ALMEIDA A. S. (2002) Camu-camu (Myrciaria dubia McVaugh): a rich natural source of vitamin C. 48th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Tegucigalpa, Honduras, 7-11 October, 2002. Interamerican Society for Tropical Horticulture.

15- ALY F. A. E., DONYA S. (2002) *In vivo* antimutagenic effect of vitamin C and E against rifampicin induced chromosome aberration in mouse bone marrow. Mutant Research 518: 1-7.

16- AMES B. N., SHIGENAGA K., HAGEN T. M. (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7915-7922.

17- ANDUJAR P., .BENSEFA-COLAS L., DESCATHA D. A. (2010) Intoxication aiguë, acute and chronic cadmium poisoning. Elsevier Masson SAS, Revue de médecine interne 31: 107-115.

18- ARRIGONI O., DE TULLIO M. C. (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. Biochimica et Biophysica Acta, 1569: 1-9.

19- AUDRY S. (2003) Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans la système fluviatil anthropisé Lot-Garonne –Gironde. Thèse de Doctorat à l'Université Bordeaux I, p. 413.

20- AURORE (2003) Abomey-Calavi (Bénin) aurore@africa-web.org.

21- AUGUSTI P. R., CONTERATO G. M. M., SOMACAL S., SOBIESKI R., SPOHR P. R., TORRES J. V., CHARAO M. F., MORO A. M., ROCHA M. P., GARCIA S. C., EMANUELLI T. (2008) Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. Food and Chemical Toxicology, 46: 212-219.

22- AWODELE O., OLAYEMI S.O., ALIMBA C.G., EGBEJOGU C., AKINTONWA. A. (2010) Protective effect of vitamin C and or vitamin E on micronuclei induction by rifampicin in mice. Tanzania. J. Health. Res., 12:2.

23- AZÉHOUN-PAZOU E., BOKO M. (2006a) Contamination of fish by organochlorine pesticide residues in the Eastern Louisiana. Micro. Chem. J., 62: 229-307.

24- AZÉHOUN-PAZOU E., BOKO M. (2006b) Organochlorine and organophosphorous pesticide residues in the Ouémé River catchment in the Republic of Bénin. Environ. Int., 32: 616-621.

25- BAKER H. J., LINDSEY R. J., WEISBROTH S. H., (1980) The laboratory rat. Volume II. Ed. New York, 114-115.

26- BAKER M. A., CERNIGLIA G. J., ZAMAN A. (1990) Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. Anal. Biochem., 190(2): 360-365.

27- BARBIER O., JACQUILLET G., TAUC M., COUGNON M., POUJEOL P. (2005) Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. Nephron Physiol., 99 (4):105-110.

28- BARONE R. (1976) Appareil digestif, Appareil respiratoire, Anatomie des mammifères domestiques. Splanchnologie, Tome III, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 507-561.

29- BASDEVANT A., LAVILLE M., LEREBOURS E. (2001) Traité de nutrition clinique de l'adulte. eds. Médecine-Sciences Flammarion, Paris, p.200.

30- BEAUCHAMP J. (2003) La Pollution littorale. DESS Qualité et Gestion de l'eau, Université de Picardie Jules Verne, France, p.30.

31- BEAUNE P. (1999) Les cytochromes P-450 humains: applications en toxicologie. Med. Ther., 4: 18-38.

32- BEIGLBÖCK C., STEINECK T., TATARUCH F., RUF T. (2002) Environmental cadmium induces histopathological changes in kidneys of roe deer. Environ. Chem. Toxicol., 21: 1811-1816

33- BECKMAN K. B., AMES B. N. (1998) The free radical theory of aging matures. Physiol. Rev., 78: 547-581.

34- BERLIN M., FAZACKERLEY J., NORDBERG G. (1969) The uptake of mercury in the brains of mammals exposed to mercury vapor and to mercuric salts. Arch. Environ. Health., 18:719-729.

35- BERSÉNYI A., FEKETE S. G., SZOCS Z., BERTA E. (2003) Effect of ingested heavy metals (Cd, Pb and Hg) on haematology and serum biochemistry in rabbits. Acta. Vet. Hung., 51 (3):297-304.

36- BHARAT B. P., ATISH R., SOUMIK A., SHELLEY B. (2010) Induction of oxidative stress by non-lethal dose of mercury in rat liver: Possible relationships between apoptosis and necrosis. J. Environ. Boil., 31:413-416.

37- BHATTACHARYYA M. (1991) Cadmium-induced bone loss: increased susceptibility in females. Water, Air, Soil Pollut., 57/58: 665-673.

38- BINEY C. A. (1991) The distribution of trace metals in the Kpong Headpond and Lower Volta River, Ghana. In Perspectives in aquatic ecotoxicology, edit, N. K. Shastree. Delhi, India, Narendra Publ. House.

39- BLAKLEY B. R. 1985 The effect of cadmium chloride on the immune response in mice. Can. J. Comp. Med., 49 (1): 104 -108.

40- BLOOM N. S. (1992) On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 49:1010-1017.

41- BORSARI M., GABBI C., GHELFI F., GRANDI R., SALADINI M., SEVERI S., BORELLA F. (2001) Silybin, a new iron-chelating agent. Journal of Inorganic Biochemistry, 85: 123-129.

42- BOSCOLO M., ANTONUCCI S., VOLPE A.R., CARMIGNANI M., DI-GIOACCHINO M. (2009) Acute mercury intoxication and use of chelating agents. J. Biol. Regul. Homeost. Agents, 23:217-223.

43- BOTTOMLEY S. S., MULLER-EBERHARD V. (1998) Pathophysiology of the heme synthesis. Pemin. Hematol., 25: 282-303.

44- BOUCHET A., CUILLERET J. (1983) Anatomie topographique, descriptive et fonctionnelle. Lyon, France, SIMEP, p. 20.

45- BOUJELBENE M., GORBEL F., MAKNI-AYADI F., GUERMAZI F., KAMMOUN A., GROUTE F., SOLEILHAVOUP J. P., EL EKI ADDELTETT A. H. (2002) Impact d'un traitement chronique au cadmium sur la fonction rénale chez le rat : Determination d'un biomarqueur d'exposition = kidneys deficiency induced by the cadmium. L'Eurobiologiste, 258 (35): 3-17.

46- BOUKERCHE S., AOUACHERI W., SAKA S. (2007) Les effets toxiques des nitrates : étude biologique chez l'homme et chez l'animal. Ann. Biol. Clin. 65(4): 38.

47- BOURTON C. F., PATTERSON C. C. (1986) Lead concentration changes in Antarctic ice during the Wisconsin/Holocence transition. Nature, 323: 222-225.

48- BROADHURST C. L., CUNNANE S. C., CRAWFORD M. A. (1998) Rift Valley lake fish and shellfish provided brain-specific nutrition for early Homo. Br. J. Nutr., 79: 3-21.

49- BRZÓSKA M. M., MONIUSZKO-JAKONIUK J., PIŁAT-MARCINKIEWICZ B., SAWICKI B. (2002) Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. Oxford Journal, Medicine, Alcohol and Alcoholism, 38(1): 2-10.

50- BUCHER H. C., HENGSTLER P., SCHINDLER C., MEIER G. (2002) N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. Am. J. Med., 112(4): 298-304.

51- BUCKLER H. M., SMITH W. D., REES W. D. (1986) Self poisoning with oral cadmium chloride. Br. Med.J., 292:1559-1560.

52- BUNOUT D. (1999) Nutritional and metabolic effects of alcoholism: Their relationship with alcoholic liver disease. Nutrition, 7-8: 583-589.

53- BURREL D. C. (1974) Atomic Spectrometric analysis of heavy metals pollutants in water. Ann Arbor Science Publishers, London, ISBN: 9780250400522, 19-29.

54- BUTCHER S., CHARLSON R., ORIANS G. (1992) Global Biogeochemical Cycles. International Geophysics Series, London, Academic Press. p. 347.

55- CADET J., BERGER M., DOUKI T., RAVANAT J. L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 131: 1-87.

56- CAI Y., AOSHIMA K., KATOH T., TERANISHI H., KASUYA M. (2001) Renal tubular dysfunction in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Toyama, Japanan, eleven-year follow-up study. J. Epidemiol., 11:180-189.

57- CALABRESE E. J. (1981) Pollutants and high risk groups. Environ. Sci. Technol. Serie.Wiley Interscience.

58- ÇALTA M., CANPOLAT Ö., NACAR A. (2000) The détermineti on of some heavy metals in Capoeta trutta (Heckel, 1983) cuaght from Keban Dam Lake (Elazi, Turkkey). IV, Easten Anatolia Fisheries Symposium , Erzurum Turkey, 799-811.

59- CAMPBELL P. G. C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In: Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems (Tessier A., Turner D .R., eds.), Chichester, New-York, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley, Sons 45-102.

60- CANN R. L., WILSON A. C. (1983) Length mutations in human mitochondrial DNA. Genetics, 104: 699-711.

61- CASAS S. (2005) Modélisation de la bioaccumulation de métaux Traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, *mytilus Galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat en Economie, mathématique et économétrie, Brest, Bretagne, p.363.

62- Centre pour l'Environnement et Développement en Afrique (CEDA) (1997) Profil environnemental de la zone côtière, Côte d'Ivoire, p.43.

63- CHEN F., CASTRANOVA V., SHI X. (2000) New insights into the role of Nuclear Factor B in cell growth regulation. American J. Pathol., *159*: 387-397.

64- CHENG J. P., MIN Z., WEI S., XUE-YU L. (2006) Expression of c-fos in rat rrain as a prelude marker of central nervous system injury in response to methylmercury-stimulation. Biomedical and Environmental Sciences, 19: 67-72.

65- CHIFFOLEAU J. C. (2001) La contamination métallique. IFREMER, Région Haute Normandie, Programme scientifique Seine-Aval., 8-39.

66- CHOW R. (1991) Cadmium block of squid calcium currents: Macroscopic data and a kinetic model. J. Gen. Physiol., 98(4):751-770.

67- CIOMS (1985) Ethical code for animal experimentation. International guiding principles for biomedical research involving animals, 39(2):51-6.

68- CLARKSON T. W. (1997) The toxicology of mercury. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 34: 369-403.

69- CLARKSON T. W. (2002) The three modern faces of mercury. Environ. Health. Perspect., 110(1): 11-23.

70- CORTOPASSI G. A., SHIBATA D., SOONG N.W., ARNHEIM N. (1992) A pattern of accumulation of a somatic deletion omitochondrial DNA in aging human tissues. Proc. Natl. Acad. Sci., U S A, 89: 7370-7374.

71- CONKLIN P. L. (2001) Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. Plant. Cell. and Environ., 24: 383-394.

72- CRAWFORD M. A., BLOOM M., BROADHURST C. L., SCHMIDT W. F., CUNNANE S. C., GALLI C., GEHBREMESKEL K., LINSEISEN F., LLOYD-SMITH J., PARKINGTON J. (1999) Evidence for the unique function of docosahexaenoic acid during the evolution of the modern hominid brain. Lipids Suppl., (34) : 39-47.

73- CRINNION W. (2000) Environmental medicine, part three: long-term effects of chronic low-dose mercury. Altern. Med. Rev., 5: 209-223.

74- DARMONO K. (1995) Logam dalam system biologi mahluk hidup. Universitias Indonesia Press, Jakarta, Indonesia, pp: 95-101.

75- DAVEY M.W., MONTAGU M.V., INZE D., SANMARTIN M., KANELLIS A., SMIRNOFF N., BENZIE I. J. J., STRAIN J. J., FAVELL D., FLETCHER J. (2000) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80: 825-860.

76- DDIQUE S., HASAN Y., TANVEER T., AFZAL M. (2005) Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megesterol acetate-induced genotoxicity in mice. Human and Experimental Toxicology, 24: 121-127, *Research* 518, 1-7.

77- DEGILA H. W. (2011) Risque d'intoxication aux métaux lourds (Pb, Cd, Cu, Hg) lié à la consommation de quelques produits halieutiques du lac Nokoué : Cas des crevettes *Peneides* et du *salotherodon melanotheron.* DESS en Management de l'Environnement et Qualité des eaux à l'université d'Abomey Calavi, p.75.

78- DE HAAN F. A. M., VAN RIEMSDIJ K. W. H., VAN DER ZEE M. (1993) General concepts of soil quality. Soil and Sediment Research, basis for Proper Protection, 155-170.

79- DELATTRE J., BEAUDEUX J. L., BONNEFONT-ROUSSELOT D. (2005) Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier, Paris, p. 549.

80- DESCAT F. (2002) Hématologie du rat : hémogramme et myélogramme. Thèse de Doctorat TOU 3- 4011, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, p. 109.

81- DHANAPAKIAM P., RAMASAMY V. K. (2001) Toxic effects of copper and zinc mixture on some haematological and biochemical parameters in common crap, *Cyprnus carpio* (Linn). J. Environ. Biol., 22:105-111.

82- DICKINSON D. A., LEVONEN A. L., MOELLERING D. R., ARNOLD E. K., ZHANG H., DARLEY-USMAR V. M., FORMAN H. J. (2004) Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. Free. Radic. Biol. Med., 37:1152-1159.

83- DIEZ S. (2009) Human health effects of methylmercury exposure. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 198:111-132.

84- D' ITRI F. M. (1972) The environmental mercury problem. CRC Press, Cleveland, Ohio. p.124.

85- DJOSSOU M. J. (2009) Evaluation de la pollution chimique des écosystèmes lacustres : cas du lac Azili. DEES en Environnement, Santé et Développement, CIFRED, UAC, Bénin, p.95.

86- DOUGNON T. J. (2009) Efficacité de détoxication hépatique et rénale de l'ananas (*Ananas comosus (L.) Merr.* (BROMELIACEA), variété « pain de sucre *»*) chez des rats Wistar intoxiqués au Doliprane. Thèse de Doctorat en Biologie animale, UAC, Bénin, p.240.

87- DOUGNON T. J., KPODEKON T. M., LALEYE A., ADJAGBA M., DARBOUX B. R. (2006). Effets de *Ananas Comus,* (Variété « Pain de sucre ») sur les lésions hépatiques dues à l'intoxication au paracétamol chez les rats Wistar. Journal de la Société de Biologie Clinique, 10: 47-50 .

88- DOVONOU F. E. (2009) Pollution des plans d'eau du Sud Bénin et risques écotoxicologiques: Cas du lac Nokoué. DEA en Environnement, Santé et développement, CIFRED, UAC, Bénin, p.68.

89- DRÖGE W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev., 82:47-95.

90- ECHTAY K. S., ESTEVES T. C., PAKAY J. L., JEKABSONS M. B., LAMBERT A. J., PORTERO-OTIN M., PAMPLONA R., VIDAL-PUIG A. J., WANG S., ROEBUCK S. J., BRAND M. D. (2003) A signaling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. Embo. J., 22: 4103-4110.

91- EDORH A. P., AGONKPAHOUN E., GNANDI K., GUÉDÉNON P., KOUMOLOU L., AMOUSSOU C., AYEDOUN A., BOKO M., GBEASSOR M., RIHN H., CREPPY E. (2009) An assessment of the contamination of *Achatina achatina* by toxic metals in Okpara village. Int. J. Biol. Chem. Sci., 3(6): 1428 -1436.

92- EDORH A. P., GNANDI K., AYEDOUN M. A., AGONKPAHOUN E., KOUMOLOU L., AMOUSSOU C., BOKO M., GBEASSOR M., RIHN H. B., CREPPY E. E. (2010) Etude comparative de la bioaccumulation de métaux lourds dans les sédiments du lac Nokoué et de la rivière Okpara (Bénin). Rev. CAMES, Série A, 10: 95-100.

93- EDORH A. P., MONTCHO E., GNANDI K., GUEDENON P., KOUMOLOU L., BOKO M., BIGOT A., RIHN B., CREPPY E. E. (2011) Preliminary assessment of the contamination of the marine water and fish by trace metals in Cotonou (Benin). Annales des Sciences Agronomiques, 15(1): 37-49.

94- EJA M. E., OGRI O. R. A., ATIKPO G. E. (2003) Bioconcentration of heavy metals in surface sediments from the Great Kwa riers Estuary, Calabar, South Eastern Nigeria. J. Nig. Environ. Soc., 2: 247-256.

95- EPA (1973) Compilation of air pollutant emission factors. USEPA publication No. Ap-42, 2nd edt.

96- ESSIG D. A., NOSEK T. M. (1997) Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? Can. J. Appl. Physiol., 22: 409-428.

97- ETO K. (1997) Pathology of Minamata disease. Toxicol. Pathol., 25: 614-623.

98- EVANS W. J. (2000) Vitamin E, vitamin C, and exercise. Am. J. Clin. Nutr., 72: 647-652.

99- FARKAS A., SALANKI J., VARANKA L. (2000) Heavy metals concentration in fish of lake balaton, lakes and reservoirs. Res. and Manage., 5 : 271-279.

100- Fiche Toxicologique (1997) Mercure et composés minéraux. Note établie par les services techniques et médicaux de l'INRS, N° 55.

101- FLORA S. J. S., MEGHA M., ASHISH M. (2008) Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. Indian J. Med. Res., 128: 501-523.

102- FLORES-RODRIGUEZ J. (1992) Les métaux toxiques dans les eaux pluviales en milieu urbain: Caractéristiques physico-chimiques. Thèse de Doctorat en Sciences et Techniques de l'Environnement, Université Paris XII, p. 229.

103- FOLAL H., GONOU S. (2001) La pollution des eaux liée à l'évacuation des excreta en milieu lacustre: Cas du village de Ganvié sur le lac Nokoué, Bénin. DIT en Aménagement et Protection de l'Environnement, EPAC, UAC, Bénin, p.86.

104- FOULKES E. C. (1986) Absorption of cadmium. In: Foulkes, E.C., ed. Handbook of experimental pharmacology, Springer-Verlag, Berlin, 80:75-100.

105- FOYER C. H., HALLIWELL B. (1976) Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical. Biochem. J., 155: 697-700.

106- FOYER C. H. (1993) Ascorbic acid in antioxidants in higher plants (ALSCHER R. G., HESS J. L.), 31-58, CRC Press. Boca Raton, F. L. 63: 28-4.

107- FOYER C. H., DEASCOUVERIES P., KUNERT K. J. (1994) Protection against oxygen radicals: important defense mechanisms studied in transgenic plants. Plant. Cell. Environ., 17:507-523.

108- FOYER C. H., NOCTOR G. (2009**)** Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. Antioxid. Red. Signal., 11: 861-905.

109- FOX M. R. S., FRY B. E. J. R., HARLAND B. F., SCHERTEL M. E., WEEKS C. E. (1971) Effect of ascorbic acid on cadmium toxicity in the young coturnix. J. Nutr., United States, 101: 1295-1305.

110- FRIBERG L., NORDBERG G. F., VOUK V. B. (1979) Cadmium. In : Handbook on the toxicology of metals, Elsevier-North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 355-381.

111- FRIEDBERG E. C. (2003) DNA damage and repair. Nature, 421: 436-440.

112- FRIOT D., Calvet I. I. (1973) Biochimie et élevage au Sénégal. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 20: 75-98.

113- GABE M. (1968). Techniques histologiques. Editions Masson et Cie., Paris, France, p.435.

114- GALAF F., GHANNAM S. (2003) Pollution du milieu marin. Institut Agronomique Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc, p.115.

115- GANESH C. J., SATISH K. A. (1994) Cadmium chloride induces dose dependent increases in the frequency of micronuclei in mouse bone marrow. Res., 306:85-90.

116- GARAIT B. (2006) Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®, doctorat de l'universite joseph fourier discipline : biologie cellulaire, universite joseph fourier - grenoble sciences-technologie-sante.p320.

117- GBETOH H. M., EDORH P. A. GOUISSI M. F., HOUNKPATIN A. S., AZONDEKON R., GUEDENON P., KOUMONLOU L., LOKO F. S., BOKO M. (2012) Dosage du plomb et du cadmium dans le sperme des sujets consultant pour infertilité masculine dans la ville de Cotonou. Int. J. Biol. Chem. Sci., 6(2): 582-591.

118- GERALD L. (1996) Ma santé, mon environnement: Polluants Vedettes (Arsenic, Cadmium et Mercure). Régie régionale de la santé et des services sociaux de l'Abitibi Témiscaminque (Canada). Publication du Québec, p.8.

119- GOYER R. A., CHERIAN M. G. (1995) Renal effects of metals. In Metal Toxicology (R. A. Goyer, C. D. Klaassen, and M. P. Waalkes, Eds.), Academic. Press. San. Diego, 389-412.

120- GOUZY A., DUCOS G. (2008) La connaissance des éléments traces métalliques. Air Pur N° 75, 6-10.

121- GRAM L., HUSS H. H. (2000). Fresh and processed fish and shell fish. In: Lund, B.M., T.C. Baird-Parker and G.W. Gould (eds.) The Microbiological Safety and Quality of Foods, Aspen Publishers Inc., Gaitherburg, Maryland, USA, 472-506.

122- GRIEB T. M., DRISCOLL C. T., GLOSS S. P., SCHOfiELD C. L., BOWIE G. L., PORCELLA D. B. (1990). Factors affecting mercury accumulation in fish in the upper Michigan peninsula. Environmental Toxicology and Chemistry, 9: 919-930.

123- GRIFFITH O. W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. Free Radic. Biol. Med., 27: 922-935.

124- GROSICKI A. (2004) Influence of vitamin C on cadmium absorption and distribution in rats. J. Trace. Elem. Med. Biol., 18(2): 183-187.

125- GROSMAN M., MELET J. J. (2000) Le mercure des amalgames dentaires : Quels risques pour la santé et l'environnement ? Quels enjeux financiers ? Thèse de Doctorat en Médecine. Montpellier, p.245.

126- Group of Experts on Scientific Aspects of Marine Pollution GESAMP (1997) Report of the thirty-third session, working group on the evaluation of the hazards of

harmful substances carried by ships, EHS, International Maritime Organization, London, IMO/FAO/Unesco/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP.

127- GUEDENON P. (2009) Pollution des écosystèmes par les métaux lourds (Cd, Pb, Cu) : Cas du fleuve Ouémé et du lac Nokoué, DEA en Environnement, Santé et Développement, EDP, FLASH, UAC, Bénin, p.96.

128- GUEDENON P., EDORH P. A., KAKI C., YEHOUENOU E. P.A., GNANDI K., MONTCHO S., HOUNKPATIN A., KOUMOLOU L., BOKO M. (2012a) Arsenic, Cadmium, Copper and Lead Accumulation in Water, Sediments and Fish Species of Oueme River in Bonou. British J. Pharm. Toxicol., 4(1): 13-20.

129- GUEDENON P., EDORH P. A., HOUNKPATIN A. S. Y., ALIMBA C. G., OGUNKANMI A., NWOKEJIEGBE E. G., DEGUENON Y., GBEASSOR M., CREPPY E. E. (2012b). Haematological study of *Clarias gariepinus* exposed to chronic and subchronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury. Sci. Nat., 4(2): 2-19.

130- GUTTERIDGE M. C. (1993) Free radicals in disease processes a compilation of cause and consequence. Free Rad. Res. Comms., 19: 141-158.

131- HABEEBU S. S., LIU J., LIU Y., KLAASSEN C. D. (1998) Succeptibility of MT-null mice to chronic CdCl2- induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. Toxicol. Sci., 46: 197-203.

132- HALL B. D., BODALY R. A., FUDGE R. J. P., RUDD J. W. M., ROSENBERG D. M. (1997) Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish. Water, Air, and Soil Pollution, 100:13-24.

133- HAYES J. D., FLANAGAN J. U., JOWSEY I. R. (2005) Glutathione transferases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 45: 51-88.

134- HILL C. H. (1980) Interactions of vitamin C with lead and mercury. Ann. N.Y. Acad. Sci., 355: 262-266.

135- HIRSHORN S. (1989) Trop de plomb? Protégez-vous, 16 (5) : 49-55.

136- HOEIJMAKERS J. H. J. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature, 411: 366-374.

137- HONG J. H., KIM M. J., PARK M. R., KWAG O. G., LEE I. S., BYUN B. H., LEE S. C., LEE K. B., RHEE S. J. (2004) Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. Clin. Chim. Acta., 340: 107-115.

138- HOREMANS N., FOYER C. H., ASARD H. (2000) Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. Trends in Plant. Sci., 5: 263-267.

139- HORIGUCHI H. (2007) Anemia induced by cadmium intoxication, Nihon Eiseigaku Zasshi. Japanese J. of Hygien., 62(3): 888-904.

140- HORVAT M. (1999) Current status and future needs for biological and environmental reference materials certified for methylmercury compounds. Chemosphere, 39(7): 1167-1179.

141- HULBERT A. J. (2005) On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. J Theor. Biol., 234: 277-288.

142- HULTBERG B., ANDERSSON A., ISALSSON A. (1998) Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury, of cadmium ions. Toxicol., 126: 203-212.

143- HUGHES J. A., ANNAU Z. (1976). Postnatal behavioral effects in mice after prenatal exposure to methylmercury. Pharmacol. Biochem. Behav., 4: 385-391

144- INERIS (2005) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Cadmium et ses dérivés. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. URL : http://www.ineris.fr, consulté le 12 janvier 2012.

145- Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) (1997) cadmium et composés minéraux : Fiche toxicologique n°60. URL : http://www.inrs.fr, consultée le 8 mai 2007.

146- INSAE (2004) Cahiers des villages et quartiers de ville, département de l'Atlantique Cotonou, Bénin p.34.

147- JADHAC S. H., SARKAR S. N., PATIL R. D., TRIPATHI H. C. (2007) Effect of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 53: 667-677.

148- JARUP L., BERGLUND M., ELINDER C. G., NORDBERG G., VAHTER M. (1998) Health effects of cadmium exposure -a review of the literature and a risk estimate. Scand. J. Work. Environ. Health., 24(1):1-51.

149- JARUP L., HELLSTROM L., ALFVEN T., CARLSSON M. D., GRUBB A., PERSSON B. (2000) Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study. Occup. Environ. Med., 57: 668-672.

150- JARUP L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. Br. Med. Bull., 68:167-82.

151- JUMARIE C., FORTIN C., HOUDE M., CAMPBELL P. G. C., DENIZEAU F. (2001) Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. Toxicol. Appl. Pharmacol., 170: 29-38.

152- KAKPO L. G. A. (2008) Evaluation de la pollution du lac Nokoué par les métaux toxiques : Pb, Cd, Hg. DESS Sciences de l'Environnement et Développement Durable, CIFRED, UAC, Bénin, p.77.

153- KANHIYA M., PRABHU N. S. (2009) Assessment of haematotoxic potential of mercuric chloride in rat. J. Environ. Biol., 30 (5): 927-928.

154- KARADEDE H., ÜNLÜ E. (1998) Investigation of heavy metals accumilation in Cyprionion macrostomus Heckel, 1 843, (Cyprinidea) from the AtatOrk Dam Lake (Euphrates), Turkey, XIV, National Biology Congress, 181-190.

155- KARDONG K. V. (2002) Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution. 3rd ed, Mc Graw-hill, New York, p.762.

156- KAWABATA T. T., CHAPMAN M. Y., KIM D. H., STEVENS W. D., HOLSAPPLE M. P. (1990) Mechanisms of in vitro immune suppression by hepatocyte-generated cyclophosphamide metabolites and 4-hydroxycyclophosphamide. Biochem. Pharmacol., 40 (5): 927.

157- KAYA B. (2003) Antigenotoxic effect of Ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. Turkish. J. Biology., 27: 241-246.

158- KAZOU N., YASUO S., AKIKO Y., HIROKO N. (1975) Effects of dietary cadmium on rabbits; I. Early signs of cadmium intoxication. Toxicol. and Applied. Pharmacol., 3(1): 4-12.

159- KHAN P. K., SINHA, S. P. (1993) Antimutagenic efficacy of higher doses of vitamin C. Mutant Res., 298: 157-161.

160- KISHI R., DOI R., FUKUCHI Y., SATOH H., SATOH T., ONO A., MORIWAKA F., TASHIRO K., TAKAHATA N., SASATANI H. (1994) Residual neurobehavioural effects associated with chronic exposure to mercury vapour. Occup. Environ. Med., 51: 35-41.

161- KJELLSTRÖM T. (1986) Itai-itai disease. In: Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal. Vol II. Effects and Response. (Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, Nordberg G, eds). Boca Raton, FLCRC Press, 257-290.

162- KJELLSTRÖM T., KENNEDY P., WALLIS S., STEWART A., FRIBERG L., LIND B., WUTHERSPOON T., MANTELL C. (1989) Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage II. Interviews ans psychological tests at age 6, Solna. Nat. Swedish. Environ. Protect. Board. Report., 3642.

163- KLAASSEN C. D., SLITT A. L. (2005) Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors. Curr. Drug. Metab., 6: 309-328.

164- KORI-SIAKPERE O., OGBE M. G., IKOMI R. B. (2009) Haematological response of the African cat fish *clarias gariepinus* (Burchell,1822) to sub-lethal concentrations of potassium permanganate. Sci. Res. Essay. Academic J., 4(5): 457-466.

165- KOSTIĆ M. M., OGNJANOVIĆ B., DIMITRIJEVIĆ S., ZIKIĆ R. V., ZSCTAJN A., ROSIĆ G. L., ZIVKOVIĆ R. V. (1993) Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: *in vivo* effects. European J. of Haematol., 51(2): 86–92.

166- KOUMOLOU B. (2009) Bioaccumulation comparée de métaux lourds dans quelques produits maraîchers et champignons comestibles de Cotonou et d'Aplahoué (Bénin). DEA en Toxicologie de l'Environnement, Lomé, Togo, p.141.

167- KPERA A. (2006) Pollution marine par le plomb, l'aluminium et le cadmium : Etude comparative entre le Bénin et le Togo. Thèse de Docteur en Pharmacie, FSS, UAC, Bénin, p.84.

168- KRIZEK M., VACHA F., VORLOVA L., LUKASOVA J. (2004) Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum- packed flesh of carp (*Cyrinus carpio*) stored at different temperatures. Food Chemistry., 88: 185-191.

169- LAFUENTE A., MARQUEZ N., PEREZ-LORENZO M., PAZO D., ESQUIFINO A. I. (2000) Pubertal and post pubertal cadmium exposure differentially affects the hypothalamic-pituitary-testicular axis function in the rat. Food. Chem. Toxicol., 38: 913-923.

170- LAHOUEL M., BOULKOUR S., SEGUENI N., FILLASTRE J. P. (2004) Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. J. pat. Bio., 10: 314-322.

171- LALEYE A. P. (1995) Ecologie comparée de deux espèces de *Chrysichthys*, poissons siluriformes (*Claroteidae*) du complexe lagunaire lac Nokoué, Bénin, West Africa. African Journal of Aquatic Sci., 28 (2): 151-161.

172- LANGE T. R., ROYALS H. E., CONNOR L. L. (1994) Mercury accumulation in largemouth bass (*Micropterus Salmoides*) in a Florida lake. Archives of Environmental Contamination and Toxicology., 27: 466–471.

173- LARRAT R., PAGOT J., VANDENBUSSCHE J. (1971) Manuel vétérinaire des agents techniques de l'élevage tropical. Institut d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 5 ème Edition. Maisons-Alfort. Paris, France, p.517.

174- LAU S., MURTEDZA A. M., TANCHI Y. A., SU'UT S. (1998) Accumulation of heavy metals in freshwater mollusks. Sci. of the Total. Environ., 214: 113-121.

175- LAVICOLI I., CARELLI G., STANEK E. J., CASTELLINO N., CALABRESE E. J. (2003) Effects of low doses of dietary lead on red blood cell production in male and female mice. Toxicol. Lett., 137: 193-199.

176- LEE W. M. (2004) Acetaminophen and the US acute liver failure study group: Lowering the risks of hepatic failure. Hepatol., 40: 6-9.

177- LE GOFF X. (2000) Pollution marine. p.1-5.

178- LEOCOANET H. (2000) Retombées métalliques sur les sols de la région Fos-Berre (Sud de la France) : Approche magnétique et géochimique appliquée à la discrimination des sources d'émission. Thèse de Doctorat, Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille III. p.327.

179- LEVINE R. L. (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free Radic. Biol. Med., 32: 790-796.

180- LEYRAL G., VIERLING E. (1997) Microbiologie et Toxicologie des aliments : Hygiène et Sécurité Alimentaires. 2è Edition : Biosciences et Techniques, France, p.271.

181- LINDQVIST O., JOHANSSON K., AASTRUP M., ANDERSSON A., BRINGMARK L., GUNNAR-HOVSENIUS G. (1991) Mercury in the swedish environment recent research on causes, consequences and corrective methods. Water, Air, Soil Pollut., 55: 261.

182- LIOPIZ N., FRANCESC P., ELA C., LLUIS A., ANNA A., CINTA B., SALVADO J. M. (2004) Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. Journal of .Agriculture and Food Chemistry., 52: 1083-1087.

183- LLOBET J. M., GRANERO S., TORRES A., SCHUHMACHER M., DOMINGO J. L. (1998) Biological monitoring of environmental pollution and human exposure to metals in Tarragona, Spain III. Blood levels. Trace. Elem. Electr., 15: 76-80.

184- LODIA S., KANSALA L. (2012) Antioxidant activity of rubia cordifolia against lead toxicity. Int. J. Pharmacol., Sci. Res. 3(7): 2224-2232.

185- LUND B. O., MILLER D. M., WODS J. S. (1993) Studies on Hg (II)-induced $H_2O_2$ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol*., 45: 2017-2024.

186- MACHIWA J. F. (2004) Total mercury concentration in common fish species of lake Victoria, Tanzania. Tanz. J. Sci., 30(2).

187- MAGOS L. (1991) Epidemiological and experimental aspects of metal carcinogenesis: physicochemical properties, kinetics, and the active species. Environ. Health. Perspect., 95: 157–189.

188- MAHBOOB M., SHIREEN K. F., ATKINSON A., KHAN A. T. (2001) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity indifferent organs of mice exposed to low level of mercury. Journal of Environmental Science and Health B., 36: 687-697.

189- MAHOUR K., SAXENA P. N. (2009) Assessment of haematotoxic potential of mercuric chloride in rat. J. Environ. Biol., 30: 927-928.

190- MAIAA P. D. (2008) Le rôle des échanges entre le fleuve Amazone et la plaine d'inondation dans les processus de transport, de spéciation et de piégeage du mercure. Thèse de Doctorat en Géochimie des Eaux Continentales, l'Université de Toulouse III, Paul Sabatier, p.246.

191- MANABU K., TAKASHI M. (1986) Density increment and decreased survival of rat red blood cells induced by cadmium. Environ. Res., 39(1) : 86–95.

192- MARNETT L. J. (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat. Res., 424 : 83-95.

193- MARUSCZAK N. (2010) Etude du transfert du mercure et du méthylmercure dans les écosystèmes lacustres alpins. Thèse de Doctorat en Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement, Université de Grenoble, p.206.

194- MASON R. P., HEYES D., SVEINSDOTTIR A. (2006) Methylmercury concentrations in fish from tidal waters of the Chesapeake Bay. Archives of Environmental Contamination and Toxicology., 51: 425-437.

195- MATE J. (2000) Principaux rejets industriels en France Bilan de l'année. p.54.

196- MATE J. M., PEREZ-GOMEZ C., NUNEZ DE CASTRO I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem., 32 : 595-603.

197- MCGEOWN J. G. (2003) Physiologie, l'Essentiel. Editions Maloine, Paris, France, p.189.

198- MCLEAY D. J., GORDEN M. R. (1977) Leucocrit: A simple hematological technique for measuring acute stress in Salmonid fish including stressful concentrations of pulp mill effluent. J. Fish. Res., 34: 2164-2175.

199- MERGLER D., ANDERSON H. A., CHAN L. H. M., MAHAFFEY K. R., MURRAY M., SAKAMOTO M., STERN A. H. (2007) Methylmercury exposure and health effects in humans. Worldwide Concern. Ambio., 36(1): 3-11.

200- MIQUEL G. (2001) Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport : Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Sénat (261) : Assemblée Nationale (1979), Paris, France, p.365.

201- MOEIN F., SAEED K., FARNAZ I. (2011) The influence of two different doses of vitamin c on sperm parameters of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). Agricultural J., 6: 294-298.

202- MONROE R. K., HALVORSEN S. W. (2006) Mercury abolishes neurotrophic factor-stimulated Jak-STAT signaling in nerve cells by oxidative stress. Toxicol. Sci., 94: 129-138.

203- MONTCHO E. (2005) Métaux toxiques dans l'environnement marin au Bénin : Evaluation préliminaire de la pollution. Thèse de Doctorat en Pharmacie, FSS, UAC, Bénin, p.65.

204- MOUSTAID K., NASSER B., BAUDRIMONT I., ANANE R., EL IDRISSI M., BOUZIDI A., CREPPY E. E. (2005) Comparative evaluation of the toxicity induced by mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from two sites of the Moroccan Atlantic coast in mice. C. R. Biol., 328(3): 281-289.

205- MURAI T., DEGBEY J., HOUNKPE C. (2003) Atlas des poissons et crustacés du Bénin : eaux douces et saumâtres. Imprimerie Afrique Gestion, Cotonou, Bénin, p.209.

206- MÜLLER S., GILLERT K. E., KRAUSE C., JAUTZKE G., GROSS U., DIAMANTSTEIN T. (1979) Effects of cadmium on the immune system of mice. Experientia., 35(7): 909-910.

207- MUNTHE J., BODALY R. A., BRANFIREUN B. A., DRISCOLL C. T., GILMOUR C. C., HARRIS R., HORVAT M., LUCOTTE M., MALM O. (2007) Recovery of mercury-contaminated Fisheries. Ambio., 36 (1): 33-44.

208- MUROZUMI N., CHOW T. J., PATTERSON C. C. (1969) Chemical concentrations of pollutant lead aerosols, terrestrial dusts and sea salts in Greenland and Antarctic snow strata. Geochim. Cosmochim. Acta., 33: 1247-1294.

209- MYERS G. J., DAVIDSON P. W. (1998) Prenatal methylmercury exposure and children: neurologic, developmental, and behavioral research. Environ. Health. Perspect., 106, 3: 841-847.

210- NAHAVADI A., SHAHBAZI A. (2010) Nitric Oxide is Protective Against Mercury Induced Depression. Basic. Clin. Neurosc., 1: 56-60.

211- NANDI M., SLONE D., JICK H., SHAPIRO S., LEWIS G. P. (1969) Cadmium content of cigarettes. Lancet., 2: 1329 –1330.

212- NATH K. A., CROATT A. J., LIKELY S., BERHRENS T. W., WARDEN D. (1996) Renal oxidant injury and oxidant reponse induced by mercury. J. Kidney. Int., 50: 1032-1043.

213- NETKE S. P., ROOMI M. W., TSAO C., NIEDZWIECKI A. (1997) Ascorbic acid protects guinea pigs from acute aflatoxin toxicity. Toxicol. Appl. Pharm., 143: 429-435.

214- NEWMAN M., JAGOE C. (1994) Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. In: Bioavailability-Physical, Chemical, and biological interactions, Hamelin J. L. L., Bergman P. F., Benson H. L., W. H. *Ed.* USA, Lewis Pub. Inc., 39-61.

215- NICOLAS R. M., BRANCHFLOWER R., PIERCE D. (1987) Chemical contaminants in bottom fish. J. Environ. Health., 49: 342-347.

216- NOCTOR G., FOYER C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology., 49: 249-279.

217- NORDBERG G. F. (1974) Health hazards of environmental cadmium pollution. Ambio., 3: 55.

218- NORDBERG G. F., JIN T., NORDBERG M. (1994) Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or

without protective metallothionein synthesis. Environ. Health. Perspect., 102 (3): 191-194.

219- NRIAGU J. O. A. (1989) Global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. Nat., 338: 47-49.

220- OBIANIME A. W., ROBERTS I. I. (2009) Antioxidants, cadmium-induced toxicity, serum biochemical and the histological abnormalities of the kidney and testes of the male wistar rats. Nig. J. Physiol. Sci., 24 (2): 177 -185.

221- ODA-SAMAH S., EL-ASHMAWY I. M. (2012) Protective effect of silymarin on mercury-induced acute nephro-hepatotoxicity in rats. Global Veterinaria*.*, 9(4): 376-383.

222- O'DONNEL J., KAPLAN B., ALLEN H. (1985). Bioavailability of trace metals in natural waters. 7th Symposium: Aquatic Toxicology and Hazard assessment, Philadelphia, ASTM, p.20.

223- OGNJANOVIĆ B. I., PAVLOVIĆ S. Z., MALETIĆ S. D., ZIKIĆ R. V., STAJN A. S., RADOJICIĆ R. M., SAICIĆ Z. S., PETROVIĆ V. M. (2003) Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. Physiol. Res., 52(5): 563-570.

224- OLIVIERI G., BRACK C., MULLER-SPAHN F., STAHELIN H. B., HERRMANN M., RENARD P., BROCKHAUS M., HOCK C. (2000) Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. J. Neurochem., 74: 231-236.

225- OMONKHUA AKHERE A. F. O., OBI P. (2008) Biochemical evaluation of the effects of vitamin C in rats exposed to sub-chronic low doses of cadmium. Int. J. Toxicol., 1559-3916.

226- OMS (1998) Directives de qualité pour l'eau de boisson. Deuxième édition, Additif au Volume 1, ISBN 9242545147, Recommandations.

227- OMS-IPCS (1998) Environmental Health Criteria n°200: copper, World Health Organisation, International Progamme on chemical safety, URL: http://www.inchem.org/fullist.htm.

228- OSAME M., TAKIZAWA Y. (2001) Methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan, Tokyo. Japan Public. Health. Associat., 27-32.

229- OTERO P. (1997) Free Radical. Res., 27: 619-626.

230- OTHUMPANGAT S., KASHON M., JOSEPH P. (2005) Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. J. Biol. Chem., 280: 162-169.

231- PACKER L., TRITSCHLER H. J., WESSEL K. (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. Free Radic. Biol. Med., 22: 359-378.

232- PACYNA J. M., SEMB A., HANSSEN J. E. (1984) Emission and long-range transport of trace elements in Europe. Tellus., 36: 163-178.

233- PADH H. (1990) Cellular functions of ascorbic acid. Biochemistry and Cell Biology, 68: 1166-1173.

234- PAMPLONA R., PORTERO-OTIN M., RIBA D., REQUENA J. R., THORPE S. R., LOPEZ-TORRES M., BARJA G. (2000) Low fatty acid unsaturation: a mechanismfor lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. J. Gerontol., 55: 286-291.

235- PAPRIKAR M. V., SHARMA B. B. (2003) Cell and Tissue. Res., 31:12-17.

236- PASTORE A., FEDERICI G., BERTINI E., PIEMONTE F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. Clin. Chim. Acta., 333: 19-39.

237- PATRICK L. (2006) Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. Altern. Med. Rev., 11: 114-127.

238- PATRICK L. (2002) Mercury toxicity and antioxidants. Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. Alternative Medicine Review., 7: 456-471.

239- PAULSSON K., LUNDBERGH K. (1991) Treatment of mercury contaminated fish by selenium addition. Water, Air and Soil Pollut., 56: 833-841.

240- PENG J., JONES G. L., WATSON K. (2000) Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. Free Radic. Biol. Med., 28 : 1598-1606.

241- PERRODON B. (2000) Les paramètres de la qualité des eaux. Ministère de l'Environnement et du cadre de vie, p.249.

242- PICKETT E. E. (1987). Atmospheric pollution. Arab school on science and technology, Edt PICKETT E. E., University of Toronto, p.285.

243- PICOT A. (2003) Rapport sur les effets des métaux sur l'environnement et la santé.

244- PICOT A., PROUST N. (1998) Mercury and its compounds: from speciation to toxicity. Actualit. Chim., 4: 16-24.

245- PILLAI A., GUPTA S. (2005) Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: effect of vitamin E and $Mn2^{+}$. Free Radic. Res., 39: 707-712.

246- PLAVAUX A. (1997) Effect of cadmium on alkaline phosphateses actvity in different tissue of Lepomis gibbosus L. (*Pices; Centrachidae*). Hydrobiologia., 55 (3): 251-256.

247- PNUE (2002) Evaluation mondiale du mercure. Substances chimiques Genève, Suisse,

248- POTTERS G., GARA L. D., ASARD H., HOREMANS N. (2002) Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? Plant Physiol. and Biochem., 40: 537-548.

249- POWERS S. K., LENNON S. L. (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. Proc. Nutr. Soc. 58: 1025-1033.

250- PRIGGE E., BAUMERT H. P., MUHLE H. (1977) Effects of dietary and inhalative cadmium on hemoglobin and hematocrit in rats. Bulletin of Environ. Contaminat. and Toxicol., 17(5): 585-590.

251- RAMADE F. (1992) Précis d'écotoxicologie. Paris, Masson, p.224.

252- RANA S. V. S., SINGH R., VERMA S. (1996) Protective effect of few antioxydants on liver function in rat treated with cadmium and mercury. Ind. J. Exp. Biol., 34: 177-179.

253- RAPPAPORT A. M. (1963) Acinar units and the pathophysiology of the liver In: Rouiller C. H. ed. The liver, morphology, biochemistry, physiology, New York, Academic. Press., 265-328.

254- RASTEGAR T., NOBAKHT M., MEHDIZADEH M., SHAHBAZI A. (2010) Mercuric Chloride Induced Cell Death in Spinal Cord of Embryo in Rat. Basic. Clin. Neurosc., 1: 47-51.

255- RAUTENKRANZ A., LI L., MACHLER F., MARTINOIA E., OERTLI J. J. (1994) Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (Hordeum vulgare L. cv Gerbel) Leaves. Plant. Physiol., 106:187-193.

256- REGLEMENT FRANÇAIS 466 (2001) Fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Règlement CE n° 466/2001 8/3/01UE.

257- REUS I. S., BANDO I., ANDRES D., CASCALES M. (2003) Relationship between expression of HSP70 and metallothionein and oxidative stress during mercury chloride induced acute liver injury in rats. J. Biochem. Mol. Toxicol., 17: 161-168.

258- RICHMAN P. G. et MEISTER A. (1975) Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. J. Biol. Chem**.** 250:1422-1426**.**

259- RICHTER C., PARK J. W., AMES B. N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. USA, Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 6465-6467.

260- RICOUX C. et GASZTOWTT B. (2005) Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition de forts consommateurs produits de la pêche de rivière contaminés par des toxiques de l'environnement. Conseil supérieur de la pêche, protection des milieux aquatiques, France, InVS, p.124.

261- ROLLIN C., QUIOT F. (2006) Eléments traces métalliques: Guide méthodologique, Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Rapport INERIS-DRC-06-66246/DESP-R01a, p.119.

262- ROSENZWEIG M. R., LEIMAN A. L., BREEDLOVE S. M. (1999) Biological Psychology, an introduction to behavioral, cognitive, and Clinical Neuroscience. 2nd edition, Saunderland, MA: Sinauer Associates Inc.

263- ROULET M., LUCOTTE M., GUIMARÃES J. R. D., RHEAULT I. (2000) Methylmercury in water, seston, and epiphyton of an amazonian river and its floodplain, Tapajos River, Brazil. Sci. Total. Environ., 261: 43-59.

264- Royal Commission on Aboriginal Peoples RCAP (1996) Gathering Strength. Ottawa, Canada Communications Group., 3:185.

265- RUSTAGI N., SINGH R. (2010) Mercury and health care. Indian J. Occup. Environ. Med., 14: 45-48.

266- SADIQ M. (1992) Toxic metal chemistry in marine environments. In Environmental science and pollution series, M. Dekker Inc. Ed, vol. 1, 2éme ed., New York, p.390.

267- SAIKI M. K., .MARTIN B. A., MAY T. W., ALPERS C. N. (2010) Mercury concentrations in fish from a Sierra Nevada Foothill reservoir located downstream from historic gold-mining operations. Environ. Monit. Assess., 163:313-326.

268- SAKAMOTO M., KUBOTA M., LIU X. J., MURATA K., NAKAI K., SATOH H. (2004) Maternal and fetal mercury and n-3 polyunsaturated fatty acids as a risk and benefit of fish consumption to fetus. Environ. Sci. Technol., 38: 3860-3863.

269- SAKURAMA K. (1998). Effects of long-term ethanol administration on the kidneys, bones and muscles of mice. Nippon ArukoruYakubutsu Igakkai Zusshi., 33: 703-717.

270- SANBORN M. D., ABELSOHN A., CAMPBELL M., WEIR E. (2002) Identifying and managing adverse environmental health effects: Lead exposure. C. M. A. J., 14, 166(10): 1287-92.

271- SARKAR S., YADAV P., TRIVEDI R., BANSAL A. K., BHATNAGAR D. (1995) Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues. Journal of trace elements and electrolytes in health and disease., 9 (3): 144-149.

272- SATARUG S., HASWELL-ELKINS M. R., MOORE M. R. (2000) Safe levels of cadmium in take to prevent renal toxicity inhuman subjects. Br. J Nutr., 84: 791-802.

273- SATARUG S., NISHIJO M., LASKERJ M., EDWARD S. R.J., MOORE M. R. (2006) Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and hemeoxygenases? Tohoku. J. Exp. Med., 208:179-202.

274- SATOH H., SUZUKI T. (1983) Embryonic and fetal death after in utero methylmercury exposure and resultant organ mercury concentrations in mice. Ind. Health., 21:19-24.

275- SCHETTLER T. (2001) Toxic threats to neurologic development of children. Environ. Health. Perspect., 109(6): 813-816.

276- SCHROEDER H. A., VINTON W. H. (1962) Hypertension induced in rats by small doses of cadmium. Am. J. Physiol., 202: 515-518.

277- SEN C. K., PACKER L. (2000) Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. Am. J. Clin. Nutr., 72: 653-669.

278- SENER G., SEHIRLI A. O., AYANOGLU-DULGER G. (2003) Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. Pharmacol. and Toxicol., 93: 290-296.

279- SHALU M. (1998) Biochimica et Biophysica. Acta., 1380: 389-395.

280- SHAO H. B., CHU L. Y., SHAO M. A., JALEEL C. A., HONG-MEI M. (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. Comptes Rendus Biologies., 331: 433-441.

281- SHARMA M. K., SHARMA A., KUMAR A., KUMAR M. (2007) Evaluation of protective efficacy of Spirulina fusiformis against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. Food and Chemical Toxicol., 45: 879-887.

282- SHERWOOD L. (2008) Human Physiology: From Cells to Systems. Cengage Learning, 7ème ed, p.928.

283- SHIRAISHI S., IMAI T., OTAGIRI M. (1993) Controlled release of in do methacin by chitos an polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation. J. Control Rel., 25: 217-225.

284- SHUKLA A., SHUKLA G. S., SRIMAL R. C. (1996) Cadmium-induced alterations in blood–brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. Hum. Exp. Toxicol., 15, 400-405.

285- SIESS M. H., LE BON A. M., CANIVENC-LAVIER M. C., SUSCH M. (2000) Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. Biofactors., 12(4): 193-9.

286- SIMOPOULOS A. P. (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed. Pharmacother., 56: 365-379.

287- SINGH V., JOSHI D., SHRIVASTAVA S., SHUKLA S. (2007) Effect of monothiol along with antioxidant against mercury-induced oxidative stress in rat. Ind. J Exp. Biol., 45: 1037-1044.

288- SINHA M., MANNA P., SIL P. C. (2008) Taurine protects the antioxidant defense system in the erythrocytes of cadmium treated mice. B. M. B. report., 41(9): 657-663.

289- SMAOUI M., YHORBEL F., BOUJELBENE M., MAKNI-AYADI F., EL FÉKI A. (2000) Impact de l'exposition chronique au gaz d'échappement d'origine automobile sur certains biomarqueurs touchant la fonction hormonale sexuelle mâle, la fonction rénale et l'hémogramme chez le rat. Pollut. Atmosph., 167(2): 439-449.

290- SMIRNOFF N. (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. Plant. Biol., 3:229-235.

291- SMITH S. V. (2003) Application d'un capteur bactérien luminescent à l'analyse d'échantillons environnementaux contaminés par les métaux. DEA en Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, France, p.40.

292- SOUTHWORTH G. R., TURNER R. R., PETERSON M. J., BOGLE M. A. (1995) Form of mercury in stream fish exposed to high concentrations of dissolved inorganic mercury. Chemospher., 30(4): 779-787.

293- SPIN (1997) Les métaux lourds. Ecole Nationale des mines de Saint-Etienne, Dossier SAM., 4: 249-252.

294- STEIN E. D., COHEN Y., WINER A. M. (1996) Environmental distribution and transformation of mercury compounds. Cri. Rev. Environ. Sci. Technol., 26:1-43.

295- STUMM W., MORGAN J. (1996) Aquatic chemistry - chemical equilibria and rates. In Natural Waters, Third Ed., New York, John Wiley and Sons, p.1022.

296- SUBASINGHE R. P., BUENO P., PHILLIPS M. J., HOUGH C., MCGLADDERY S. E., ARTHUR J. E. (2000) Aquaculture in the third millennium. Conference on Aquaculture in the third millennium, Bangkok, Thailand. NACA, Bangkok and FAO, Rome, p.471.

297- SUZUKI T., YOSHIDA A. (1979) Effect of dietary supplementation of iron and ascorbic acid on lead toxicity in rats. J. Nutr., 109(6): 983-988.

298- SUZUKI T., YONEMOTO J., SATOH H., NAGANUMA A., IMURA N., KIGAWA T. (1984) Normal organic and inorganic mercury levels in the human feto-placental system. J. Appl. Toxicol., 4: 249-252.

299- SUZY L. W., ELLEN J., LYE D. (2008) Statistique Canada n° 82-000 XPF au catalogue. Rapport sur la santé, 19(4): 31-37.

300- SZETO Y. T., TOMLINSON B., BENZIE I. F. (2001) Total antioxydant and ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables: implications for dietary planning and food preservation. J. Nutr., 87: 55-59.

301- TADJINE A., DJERAR H., COURTOIS A. (2008) Toxicité des poussières rejetées par le complexe sidérurgique d'Annaba sur quelques paramètres hématologiques du lapin *Europeus*. Environ. Risq. Sant.,7:3.

302- TAKIZAWA Y. (1979) Epidemiology of mercury poisoning. In The Biogeochemistry of Mercury in the Environment (ed. J.O. Nriagu), Elsevier, North-Holland, Amsterdam, Biomedical. Prass., 325-366.

303- TESSIER D. R., TUNER N. (1995) Speciation and Bioavalability in Aquatic Systems.Wiley Chichester. p.679.

304- TESTUD F. (2005) Pathologie toxique professionnelle et environnementale. 3ème éd, Paris, Eska., p.672.

305- THEOCHARIS S., MARGELI A., FASITSAS C., LOIZIDOU M., DELICONSTANTINOS G. (1991) Acute exposure to cadmium causes time-dependent liver injury in rats. Comp. Biochem. Physiol., 99 (1-2): 127-130.

306- THOMAS P., BALLY M., NEFF J. M. (1982) Ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus Linn*, exposed to cadmium. J. Fish. Biol., 20: 183-196.

307- TONNEAU J. (2003) Printemps des Sciences : D'un bout à l'autre de la chaîne. Haute Ecole Mosane d'Enseignement Supérieur St-Laurent., 1-10.

308- TROTTIER J., MILKIEWICZ P., KAEDING J., VERREAULT M., BARBIER O. (2005) Coordinate regulation of hepatic bile acid oxidation and conjugation by nuclear receptors. Mol. Pharm., 3: 212-22.

309- VAN HERCK H., BAUMANS V., VAN DER CRAATS N. R. (1992) Histological changes in the orbital region after orbital puncture. Lab. Anim., 26: 53-58.

310- VANACKER H., CARVER T. L. W., FOYER C. H. (1998) Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. Plant. Physiol., 117: 1103-1114.

311- VAN THIELEN R., HOUNKPE C., DAGBA L., AGON G. (1993) Guide de détermination des poisons et des crustacés des lagunes et lacs du bas Bénin. Rapport du projet lagunaire. p.167.

312- VEENA S., LEENA K., ARTI S., SHWETA. L., SHARMA S. H. (2011) Ameliorating effect of *Coriandrum Sativum* extracts on hematological and immunological variables in an animal model of lead intoxication. J. Pharm. Allied. Health. Sci., 1: 16-29.

313- VINODHINI R., NARAYANAN M. (2008) Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common Carp). Int. J. Environ. Sci. Tech., 5(2): 179-182.

314- WADAAM A., MOHAMMAD M. (2009) Effects of mercury exposure on blood chemistry and liver histopathology of male rats. J. Pharmacol. Toxicol., 4(3): 126-131.

315- WEBSTER W. S., VALOIS A. A. (1981) The toxic effects of cadmium on the neonatal mouse CNS. J. Neuropathol. Exp. Neuro., l40: 247-257.

316- WELCH W. J. (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. Physiol. Rev., 72: 1063-1081.

317- WIENER J. G., KRABBENHOFT D. P., HEINZ, G. H., SCHEUHAMMER A. M. (2003) Ecotoxicology of mercury. In Hoffman D. J., Rattner B. A., Burton G. Cairns A. J. (Eds.), Boca Raton, CRC, Handbook of Ecotoxicology, 2nded., 409-463.

318- WIENER J. G., SPRY D. J. (1996) Toxicological significance of mercury in freshwater fish. In Beyer W. N., Heinz G. H., Redmon A. W. (Eds.), Environmental contaminant sinwildlife-interpreting tissue concentrations, Boca Raton, Lewis, 297-339.

319- WISNIEWSKA K. NYPL J. M., JABLONSKA J., MYSLAK Z. (1971) Binding of cadmium on metallothionein in man: Ananalysis of afatal poisoning by cadmium iodide. Arch. Toxicol., 28: 46–55.

320- WONG A., CORTOPASSI G. (1997) DNA mutations confer cellular sensitivity to oxidant stress that is partially rescued by calcium depletion and cyclosporin A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 239: 139-145.

321- WONG K. L., KLAASSEN C. D. (1982) Neurotoxic effects of cadmium in young rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 63(3): 330-337.

322- WHO (World Health Organization) (1989) Evolution of certain food additives and contaminants. Geneve, 33 Th Report Of The Joint Fao, Who Expert Committee On Food Additives, Who Techinical Report Series 776, p.144.

323- WHO (World Health Organization) (1992) Environmental Health Criteria, Cadmium. IPCS, Geneva, vol. 134.

324- WHO (World Health Organization) (2004) Guidelines for drinking- water quality. Geneva, Third Ed., vol. 1.

325- XU J., LIAN L., WU C., WANG X. F., FU W. Y., XU L. H. (2008) Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. Food and Chem. Toxicol., 46: 1488-1494.

326- YAMASHITA T. (1997) Role of nitric oxide in the cerebella degeneration during methylmercury intoxication. Biochimica. Biophysica. Acta., 303-311.

327- YEHOUENOU E. (2005) Les résidus de pesticides chimiques de synthèse dans les eaux, les sédiments et les espèces aquatiques du bassin versant du fleuve Ouémé et du Lac Nokoué. Thèse de Doctorat en Gestion de l'Environnement, UAC, Bénin, p.217.

328- YOSHIDA M. (2002) Placental to fetal transfer of mercury and fetotoxicity. Tohoku, J. Exp. Med., 196: 79-88.

329- ZALUPS R. K. (2000) Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacologic. Review.*, 52: 113-143.

# *ANNEXES*

# *ANNEXES I: PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES*

**Publication 1: Pollution of aquatic ecosystems by heavy metals at Ganvié's lacustrine city (Benin)**

International Research Journal of Biotechnology (ISSN: 2141-5153) Vol. 3(6) pp. 81-87, June 2012
Available online http://www.interesjournals.org/IRJOB
Copyright © 2012 International Research Journals

*Full Length Research Paper*

# Pollution of aquatic ecosystems by heavy metals at Ganvié's lacustrine city (Benin)

**Hounkpatin[1*] A.S, Edorh[1,2] A.P, Sèzonlin[3] M, Guédénon[1] P, Elégbédé[4] B, Boni[1] G, Dougnon[1] V, Montcho[1] S, Kéké E, Boko[1] M.**

[1]Interfaculty Centre of Formation and Research in Environment for the Sustainable Development (CIFRED), Laboratory of Toxicology and Environmental Health, University of Abomey-Calavi (UAC), 03 BP 1463, Jéricho, Cotonou, Benin
[2]Department of Biochemistry and Cellular Biology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 Cotonou, Benin
[3]Genetic's Laboratory, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 Cotonou, Benin
[4]Direction Départementale de l'Hydraulique, Ouémé-Plateau, 04 BP 1412, Bénin

Accepted 26 March, 2012

**The lake city of Ganvié is facing environmental problems. Indeed, the deposition of all kinds of domestic and solid wastes, the fraudulent traffic of leaded gasoline through pirogues, the runoff waters from Cotonou city, and the effluents from Ouémé River are source of heavy metals contamination of the ecosystem. These toxic metals constitute a risk for this aquatic ecosystem through the chronic effects they are known to cause. The aim of this study is to assess the level of contamination of this ecosystem by heavy metals (lead and cadmium). Therefore, samples of water, sediment, and fish were collected and mineralized before their heavy metals (lead, cadmium) content were analysed using an atomic absorption spectrophotometer (Thermo Orion assisted by Solar S2 software) at the laboratory of Management, Valorisation and Treatment of wastes, Lomé University (Togo). The results revealed high concentrations in lead and cadmium above the safety norms in most of the samples. The different values expressed in mg/kg (fish, sediments) or mg/L for water) are: 0.56 and 0.03 (water), 54.04 and 0.74 (sediment), 26.85 and 2.01 (fish) for lead and cadmium, respectively. These results have shown the pollution of Ganvié aquatic ecosystem by lead and cadmium.**

**Keywords:** Heavy metals, Lead, Cadmium, Pollution.

## INTRODUCTION

Environment is contaminated by many chemicals of which the heavy metals, rejected by industries, agriculture and urban communities (Miquel, 2001). And Benin is not free from this plague (ABE/MEHU, 1998). The marine ecosystems, under strong anthropic influence, are very touched by this contamination. The pollution of the environment by heavy metals constitutes a significant source of concern for the international community. In the natural marine ecosystems, metals are with weak concentrations, generally of the order of the nanograms or micrograms per liter (Calamarie *et al.*, 1994). Nowadays, the presence of heavy metals is noted with concentrations higher than the natural loads. Several research tasks carried out revealed the presence with strong amounts of contaminants, in particular heavy metals in the moulds (Moustaid *et al.*, 2005); the snails (Agonkpahoun *et al., 2009)*; the water fishes (Hounkpatin *et al.*, 2012) (Gnandi *et al.*, 2007); (Adam *et al.*, 2010), the sediments (Edorh *et al.*, 2009). The marine ecosystems are vulnerable to metals, because these

*Corresponding author E-mail: harmelle2007@yahoo.fr; harmelle2011@gmail.com Tel: 00 (229) 93 91 64 64 / 95 49 35 77




Fig. 1: Geographical situation of the lacustrine city of Ganvié in the township of Sô-Ava.

Insoluble metal's compounds can accumulate in the sediments, then to be released in pore water and to thus increase consumption of soluble metals or in suspension. This situation presents a real danger to marine fauna and the flora like for the man of made phenomena of bio-accumulation in the food chain (CEDA, 1997).

The human and industrial activities added to the demographic growth in the African countries particularly at Benin generated enormous environmental problems. They especially entrainé a fast increase in various pollutants (heavy metals) in the receiving urban water masses such as the lagoons, the rivers, the seas and the lakes (Salvad *et al.*, 2006); (Edorh *et al.*, 2011). This situation has adverse effects on the various components of the watery environment such as water, the sediments and the products halieutics (Saad *et al.*, 1985) and by rebound on human health. Indeed, lead, toxic element (Le Roux et al., Shotyk, 2005), can cause disorders neurological, hematologic, gastro-intestinal, reproductive's, immunological and apoptotic (Patrick, 2006); (Xu *et al.*, 2008). Recent studies, showed that lead inhibits the activity of the enzymes implied in the oxidative stress (Ercal *et al.*, 2001); (Bolin *et al.*, 2006). Other *in vitro studies* showed the increase in the production of the free radicals after treatment with inorganic Lead (Chen *et al.*, 2003). As for cadmium, it is toxic for the man because an excessive exposure could caused death (Othumpangat, *et al.*, 2005). It is introduced into the cells and accumulates in great concentration in cytoplasmic and nuclear space (Satoh *et al.*, 2003). It has a strong affinity for the liver and the kidneys (Cai *et al.*, 2001). At the Man, the phenomenon of acute toxicity is known since 1950 under the name of syndrome of Itai-Itai defined by the association of a renal insufficiency with osteoporosis and osteomalacia. It is carcinogenic (Satoh *et al.*, 2002); (Banerjee *et al.*, 2005) and teratogenic (Hovland *et al.*, 2000). The effect genotoxic and apoptotic was observed in several types of cells (Kim *et al.*, 2005); (Mondal *et al.*, 2005)

In addition, the population of Ganvié always estimated that water of the lake, their immediate environment constitute an ideal receptacle for the waste produced during their various natural, domestic or professional activities (Folal and Gonou, 2001). Indeed, the rejection of the household refuse and solid residues of any kind, the traffic of the petroleum products by dugout, discharges of petroleum products in the lake, pollution by excessive use of the motorized boats, the rejections of

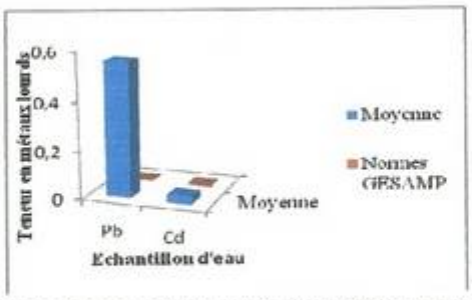



**Fig. 2:** Average content (mg/L) of Pb and Cd in the water samples

the drain pipes of rain water coming from the town of Cotonou, the contributions of the river, cause contamination potential of this ecosystem by heavy metals (Elégbédé, 2011).

About the risks of contamination of this watery system, even of the human organism via the consumption of halieutics products also contaminated by toxic metals, the evaluation of the pollution of the lake city of Ganvié is a need. The general objective of this study is to contribute to a better knowledge of the contamination degree of Ganvié by toxic metals (lead and cadmium) through the toxicological characterization of water, the sediments and some fish taken in the lake. The finality is to consider an evaluation and a prevention of the possible medical risks to which the population would be exposed.

## MATERIALS AND METHODS

### Setting of survey

The lacustrine city of Ganvié is situated on the Northwest of the lake Nokoué at Cotonou, to the West outlet of the Sô-Ava strand in the lake and on 11 kilometers of the Abomey-Calavi pier. It is limited: to the North by Sô-Ava, to the Northeast by the lacustrine village of Vekky, to the Northwest by the waters of the lake, to the East by the lacustrine village of Aguégué. At Benin, the Nokoué, situated in middle of the Cotonou city, sudden inevitably a telluric contribution importing but especially of dismissal of worn-out water, of fecal matters, of garbage of all ways. It represents the biggest plan of continental water of Benin and present two particularities to know: a production in fishes very elevated (18.046.22 tons on average from 1987 to 1997) (Folal and Gonou, 2001) and a strong lacustrine population organized in several villages with dwellings constructed on stilt directly implanted in water. Ganvié, one of villages most important of this lacustrine dwelling system has been kept for this survey. It has a population of 20568 inhabitants (INSAE, 2004) and represent a tourist place visited by many tourists what generates numerous anthropic activities.

### Sampling and dosage

Ten samples of water and sediments; 6 samples of 5 different species of fishes have been taken at various points of the lacustrine city of Ganvié with a dugout. After the country samples of fishes collected have been cut up and been dried to the electric oven in a first time to 50°C during 12 hours past to 120°C during 24 hours. The level of contamination of sediments, water and fishes in lead and in cadmium has been determined by dosage to the atomic absorption spectrophotometer according to the method of Moustaid *et al.*, (2005). These works have been achieved to the Laboratory of Management, Treatment, and Valorization of Garbage (GTVD) at the University of Lomé (Togo).

### Analysis and treatment of results

All data underwent some statistical treatments. The used software is SPSS, version 17.0. Averages, standard deviations have been calculated as statistical descriptive. Tests of conformity have been achieved with the test of Student to the doorstep of mistake of 5%.

After that, the gotten averages have been compared to norms fixed by GESAMP for water and sediments and to the norm CE 466/2001 for fishes.

## RESULTS AND DISCUSSION

It is evident from the analysis of the fig. 2, the lead

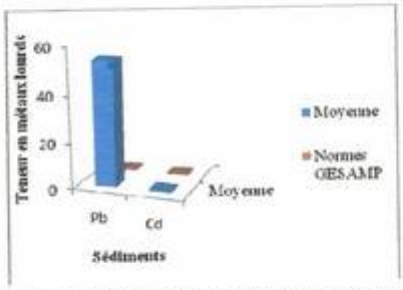



**Figure 3:** Average content (mg/L) of Pb and Cd in the Sediments

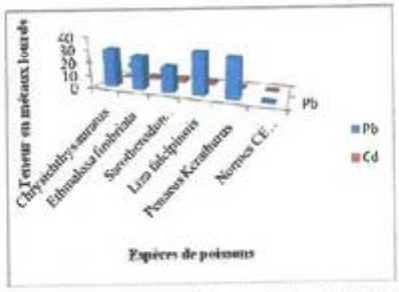



**Figure 4:** Comparison of rates (mg/kg) out of heavy metals in the various studied fish species

content (0.56mg/L) on the different sites of withdrawal are very raised in relation to the norm fixed by GESAMP (0,0004mg/L). On the same way, the content of cadmium (0.03mg/L) is more raised than the norm fixed by GESAMP (0,00021mg/L). These results showed that the water of Ganvié is very polluted by lead and cadmium.

The fig. 3 indicates that the content of lead (54.04 mg/kg) in sediments of the different sites of withdrawal is very raised and systematically superior to the norm fixed by GESAMP (0.019 mg/g). On the same way, the content of cadmium (0.74mg/kg) is more raised that the norm fixed by GESAMP (0.00011mg/g). It is evident from these analyses that the water of Ganvié is strongly polluted by lead and in cadmium.

The comparison of heavy metals contents (mg/kg) (fig. 4) showed that all species have accumulated exaggerated lead. *Liza falcipinnis* has accumulated it the most (31,7mg/kg) against *Chrysichthys auratus* (29.52 mg/kg), *Penaeus kerathurus* (29.52 mg/kg), *Ethmalosa fimbriata* (25.46 mg/kg) and *Sarotherodon melanotheron* (19.18mg/kg). All these values recorded for the lead passed the norm fixed by the French Regulation CE 466/2001(0.2 to 0.4mg/kg).

It is evident from the analysis of the fig. 4 that cadmium has also been accumulated by fishes. *Sarotherodon melanotheron* (2.193 mg/kg), *Ethmalosa fimbriata* (2.12mg/kg) and *Liza falcipinnis* (2.11mg/kg), *Chrysichthys auratus* (0.3mg/kg) and *Penaeus Kerathurus* (0.3mg/kg) present contents values above of the norm CE 466/2001 (0.01 to 0.05mg/kg).

The Factor of contamination (F = middle concentration / concentration of norms) reveals the degree of contamination of water, sediments and fishes by the lead and the cadmium. These factors of contamination recorded at the lacustrine city of Ganvié are: Water (FPb: 1400; FCd: 143); Sediment (FPb: 2844; FCd: 6727) fish (FPb: 67; FCd: 40).

From the analysis of fig. 5, sediments have more accumulated lead, follow-up by fishes and water. While considering the fig. 6, fishes accumulated more cadmium than sediments and water.

The contents of lead (0.56mg/L) and cadmium (0.03mg/L) recorded in the water of Ganvié are meaningfully more elevated than norms fixed by GESAMP (mixed Group of experts assigned to study the Scientific Aspects of the Protection of the Marine

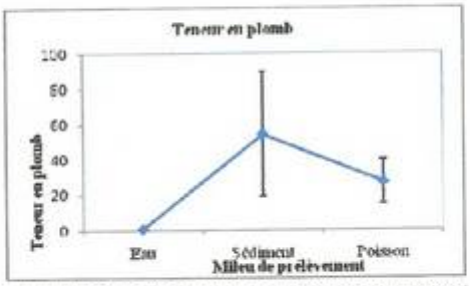



**Fig. 5:** Variation of the Pb content in water, the sediments and fish.

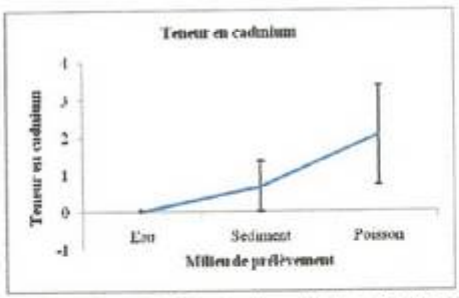



**Fig. 6:** Variation of the Cd content in water, the sediments and fish.

environment) (Pb: 0.0004mg/L and Cd: 0.00021mg/L). In comparison with results gotten in different works at Benin, our results defer those found by Agonkpahoun (2006) (Pb: 0.043; Cd: 0.0043), Edorh *et al.*, 2011) (Pb: 0.000379; Cd: 0.000073), respectively in the Okpara river and in the Nokoué lake. The middle contents in lead (54.04 mg/kgs) and in cadmium (0.74 mg/kgs) recorded in sediments to Ganvié are meaningfully more elevated than those gotten in water (Pb: 0.56; Cd: 0.03) of the same lake. These observations have been approved by other authors as (Lau *et al.*; 2005) and (Eja *et al.*, 2003) that demonstrated that sediments accumulate more poisonous metals than water. It could been explained by the fact that these metals accumulated in sediments, contaminate the aqueous environment. In sediments, the middle concentrations in cadmium gotten by Guédénon (2011) (3.309 mg/kgs; 3.112 mg/kgs) respectively in the Ouémé stream and in the Nokoué lake, Edorh *et al.*, (2009) (0.93 mg/kgs) in the Nokoué lake, Agonkpahoun (2006) (0.93mg/kg) in the Nokoué lake are superior to those found at the time of the present survey (0.74 mg/kgs). On the other hand, those gotten by (Djossou, 2009) (0.39 mg/kgs) in the Azili lake, Edorh *et al.*, 2008) (0.17 mg/kgs) in the Nokoué lake are lower. These variations of results could be owed at seasons, to the period of sampling, to sites of withdrawals and also in relation with the different anthropic activities. In fishes, the studied metal contents (Pb: 26.80mg/kg; Cd: 2.03 mg/kgs) are superior to the norm CE 466/2001 (Pb: 0.2mg/kg; Cd: 0.01mg/kg). These contents are considerably more elevated than those in water (Pb: 0.56; Cd: 0.02). It indicates the phenomenon of bioaccumulation [(Ademoroti, 1996); (Karadede and ÜnlÜ, 1998); (Çalta *et al.*, 2000); (Farkas *et al.*, 2005).

The stake in parallel of a relation between contaminations of fishes and an environmental pollution in sediments is not an obvious priority. In certain cases, sediments contain more poisonous metals than fishes. It is the case of the lead in this survey where the content in sediments are 54.04mg/kg and 26.80mg/kg with regard to fishes. In other cases, as the one of the cadmium, fishes accumulated more (2.04 mg/kgs) than sediments (1.32mg/kg). The species *Penaeus kerathurus* accumulated the same content in lead (29.52mg/kg) than

*Chysichthys auratus*; but *Liza falcipinnis* with its strong content (31.7 mg/kgs) have revealed to be the more accumulator species of lead. This large capacity of heavy metal accumulation observed in particular at certain species of bottom has been brought back by Nicolas *et al.*, 1987)

About the consumption of this water polluted and these contaminated fishes, the contents present risks for the health of populations. Otherwise, the lead can cause neurological, hematological, gastro-intestinal, reproductive, immunological unrests [14]; [15]. An excessive exhibition to the cadmium would be able to kill [19].

## CONCLUSION

Water, sediments of Ganvié are polluted by lead and cadmium. All the various fish species accumulated strong cadmium and lead contents. An evaluation followed by a prevention of the risks and a regular monitoring of the state of pollution proves to be necessary in order to reconcile environmental protection and sustainable human development.

## REFERENCES


ABE/MEHU (1998) *Normes et standards environnementaux: principales sources de pollution de l'air et de l'eau au Bénin*, Volume 1, Bénin.

Adam S, Edorh P, Totin H, Koumolou L, Amoussou E, Aklikokou K, Boko M (2010). *Pesticides et métaux lourds dans l'eau de boisson, les sols et les sédiments de la ceinture cotonnière de Gogounou, Kandi et Banikoara (Bénin)*, Int. J. Biol. Chem. Sci., 3(5) : 1141-1150.

Ademoroti CA (1996). *Standard Methods for Water and effluent Analysis*, Foludex Press Ldt, Ibadan, p.182

Agonkpahoun DE (2006). *Evaluation de la pollution des eaux continentales par les métaux toxiques : Cas de la rivière Okpara et du lac Nokoué au Bénin*, Thèse de diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie, Faculté des Sciences de la Santé, UAC, Bénin, p.96

Banerjee S, Flores-Rozas H (2005). *Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex*, Nucleic. Acids. Res., 33: 1410-1419.

Bolin CM, Basha R, Cox D, Zawia NH, Maloney B, Lahiri DK, Cardozo-Pelaez F (2006). *Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain*, Faseb. J., 20 : 788-790.

Cai Y, Aoshima K, Katoh T, Teranishi H, Kasuya M (2001). *Renal tubular dysfunction in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Toyama, Japanan, eleven-year follow-up study*, J. Epidemiol.11:180-189.

Calamarie D, Naeve H (1994). *Revue de la pollution dans l'Environnement aquatique africain*, Document technique du CPCA, 25, Rome, FAD, p.129

Çalta M, Canpolat Ö, Nacar A (2000). *The déterminetion of some heavy metals in Capoeta trutta (Heckel,1983) cuaght from Keban Dam Lake (Elazi, Turkkey). IV*, Easten Anatolia Fisheries Symposium, Erzurum Turkey, 799-811.

CEDA (1997). Centre pour l'Environnement et Développement en Afrique, *Profil environnemental de la zone côtière*, Côte d'Ivoire, p.43

Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B (2003). *Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells*, Chem. Res. Toxicol. 16:1155-1161.

Djossou MJ (2009). *Evaluation de la pollution chimique des écosystèmes lacustres : cas du lac Azili*, Mémoire de DEES en Environnement, Santé et Développement, CIFRED, UAC, Bénin, p.95

Edorh AP, Agonkpahoun E, Gnandi K, Guédénon P, Koumolou L, Amoussou C, Ayedoun AM, Boko M, Gbeassor M, Rihn B, Creppy EE (2009). *An assessment of the contamination of Achatina achatina by toxic metals in Okpara village (Benin)*, Int. J. Biol. Chem. Sci..3(6): 1428-1436.

Edorh AP, Gnandi K, Ayedoun A, Agonkpahoun E, Koumolou L, Amoussou C, Boko M, Gbeassor M, Rihn H, Creppy EE (2010). *Etude comparative de la bioaccumulation des métaux lourds dans les sediments du lac Nokoué et de la rivière Okpara*, Rev. CAMES, Série A, 10:95-100.

Edorh AP, Montcho E, Gnandi K, Guédénon P, Koumolou L, Boko M, Bigot A, Rihn B, Creppy EE (2011). *Preliminary assessment of the contamination of the marine water and fish by trace metals in Cotonou (Bénin)*, Rev. Annales des Sciences Agronomiques, 15(1):37-49.

Eja ME, Ogri ORA, Atikpo GE (2003). *Bioconcentration of heavy metals in surface sediments from the Great Kwa riars Estuary, Calabar, South Eastern Nig*, J. Nig. Environ. Soc., 2:247-256.

Elégbédé B, Edorh AP, Koumolou L, Hounkpatin SA, Rihn B, Boko M, Vasseur P (2011). Health risk assessment through the consumption of water contaminated by the lead in the cotton zone of kérou (benin), south Asian J. Exp. Biol. ISSN: 2230–9799.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001). *Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage*, Curr. Top. Med. Chem. 1:529-539.

Farkas A, Salanki J, Varanka I (2000). *Heavy metals concentration in fish of lake Balaton*, Lakes and Reservoirs: Res. and Manage. 5:271-279.

Folal H, Gonou S (2001). *La pollution des eaux liée à l'évacuation des excreta en milieu lacustre : Cas du village de Ganvié sur le lac Nokoué / Bénin*, Mémoire du Diplôme d'Ingénieur des Travaux, Collège Polytechnique Universitaire, UAC, Bénin, p.86

Gnandi K, Tomety-Mensah F, Amey-Apoh Y, Edorh P (2007). *Distribution, biodisponibilité et bioaccumulation des métaux lourds dans le système lagunaire de Lomé*, J. Rech. Sci. Univ. Lomé, Togo, Série A, 9(1):67-81.

Guédénon P, Edorh AP,Yehouenou APE, Gnandi K, Adjahossou AB, Dossou N, Boko M (2011). Contamination of the Ouémé river in Bénin by the toxic metals Cadmium, Leadand Copper, Continental J. Water, Air and soil pollution 2(2):32–41.

Hounkpatin ASY, Edorh AP, Salifou S, Gnandi K, Koumolou L, Agbandji L, Aïssi A, Gouissi M, Boko M (2012). Assessment of exposure risk to lead and cadmium via fish consumption in the lacustrian village of Ganvié in Benin republic. J. Environ. Chem. Ecotoxicol. Vol. 4(1)pp.1-10.

Hovland DN, Cantor RM, Lee GS, Machado AF, Collins MD (2000). *Identification of a murine locus conveying susceptibility to cadmium-induced forelimb malformations*, Genom, 63:193-201.

INSAE (2004). *Cahiers des villages et quartiers de ville*, département de l'Atlantique, Cotonou, p.34

Karadede H, Ünlü E (1998). *Investigation of heavy metals accumulation in Cyprionion macrostomus Heckel, 1843, (Cyprinidea) from the AtatÜrk Dam Lake (Euphrates), Turkey. XIV*, National Biology Congress,181-190.

Kim SD, Moon CK, Eun SY, Ryu PD, Jo SA (2005). *Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signalling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis*, Biochem. Biophy. Res. Commun. 328:326-334.

Lau S, Murtedzaa M, Tanchi YA, Su'ut S (1998). *Accumulation of heavy metals in freshwater mollusks*, The Science of the Total Environnement, 214: 113-121.

Le Roux G, Shotyk W (2005). *Biogeochemistry and cycling of lead*, Met. Ions. Biol. Syst. 43:239-275.

Miquel G (2001). *Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la*

*santé*, Rapport d'Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Sénat (261), Assemblée Nationale (1979), Paris, France, p.360

Mondal TK, Li D, Swami K, Dean JK, Hauer C, Lawrence DA (2005). *Mercury impairment of mouse thymocyte survival in vitro: involvement of cellular thiols*, J. Toxicol. Environ. Health. A. 68:535-556.

Moustaid K, Nasser B, Baudrimont I, Anane R, El Idrissi M, Bouzidi A, Creppy EE (2005). *Comparative evaluation of the toxicity induced by mussels (Mytilus galloprovincialis) from two sites of the Moroccan Atlantic coast in mice*, C R Biol. 328(3):281-289.

Nicola RM, Branchflower R, Pierce D (1987). *Chemical contaminants in bottomfish*. J. Environ. Health. 49:342-347.

Othumpangat S, Kashon M, Joseph P (2005). *Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride*. J. Biol. Chem., 280:162-169.

Patrick L (2006). *Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity*, Altern. Med. Rev., 11:114-127.

Saad MAH, Amuzu AT, Biney C, Calamar D, Imerbore AM, Naeve O, Chumba PBO (1985). *Influence of pollution on lake Mariout*, Heavy metals, Rapp PV, Réun, Egypt III. 29:154-147.

Salvad V, Quitana XD, Hidalgo M (2006). *Monitoring of Nutrients, Pesticides, and Metals in Waters, Sediments, and Fish of a Wetland*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 5:377-386.

Satoh M, Kaji T, Tohyama C (2003). *Lowdose exposure to cadmium and its health effects, Part 3, Toxicity in laboratory animals and cultured cells*, Nippon Eiseigaku Zasshi, 57:615-623.

Satoh M, Koyama H, Kaji T, Kito H, Tohyama C (2002). *Perspectives on cadmium toxicity research*, Tohoku J. Exp. Med.,196:23-32.

Xu J, Lian L, Wu C, Wang XF, Fu WY, Xu LH (2008). *Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice*, Food and Chem. Toxicol., 46:1488-1494.

**Publication 2: Assessment of exposure risk to lead and cadmium via fish consumption in the lacusrian village of Ganvié in Benin Republic**

Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology Vol. 4(1), pp. 1-10, 2 January, 2012
Available online at http://www.academicjournals.org/JECE
DOI: 10.5897/JECE11.063
ISSN-2141-226X ©2012 Academic Journals

*Full Length Research Paper*

# Assessment of exposure risk to lead and cadmium via fish consumption in the lacusrian village of Ganvié in Benin republic

**HOUNKPATIN Armelle S. Y.[1]*, EDORH A. Patrick[1,2], SALIFOU Sahidou[3], GNANDI Kissao[4], KOUMOLOU Luc[1,5], AGBANDJI Lucien[1], AISSI K. Alain[1], GOUISSI Modest[1] and BOKO Michel[1]**

[1]Laboratoire de Toxicologie et de Santé Environnementale, Centre Interfacultaire de Formation et de Recherche en Environnement pour le Développement Durable (CIFRED), Université d'Abomey-Calavi (UAC), 03 BP 1463, Jéricho, Cotonou/Bénin.
[2]Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire, Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526 Cotonou/Bénin.
[3]Ecole Polytechnique d'Abomey Calavi (EAPC), Université d'Abomey-Calavi (UAC) 01 BP 2009, Cotonou/Bénin.
[4]Laboratoire GTVD (Gestion, Traitement et Valorisation des Déchets), Université de Lomé, Faculté des Sciences, BP 1515 Lomé/Togo.
[5]Département de Physiologie/Pharmacologie, Faculté des Sciences, Université de Lomé (UL), BP 1515 Lomé/Togo.

Accepted 29 November, 2011

**The assessment of exposure risk related to lead and cadmium via fish consumption was conducted consecutively to the extent of the high level of pollution of the aquatic system of lacustrian village of Ganvié by recent studies. The evaluation was performed in adults and children by computing daily dose of exposure (DDE) by crossing the average levels of contamination of fish with lead and cadmium with the levels of food consumption. Therefore, thirty six (36) samples of three fish species were collected from Lake Nokoué in the surroundings of lacustrial village of Ganvié and assayed for lead and cadmium by atomic absorption spectrophotometer. The average concentration of cadmium and lead was higher than the allowed limits: 26.80 ± 0.57 ppm (against 0.4 ppm) for Pb and 1.79 ± 0.29 ppm (against 0.05 ppm) for Cd. The values of DDE obtained without systemic exposure were 111.22 and 7.42 mg / kg / day for Pb and Cd in child, respectively, against 2.28 and 34.22 mg / kg / day in adults compared to the limits permitted by WHO which are 3.6 mg / kg / day and 1 µg/kg/day, respectively. These high concentrations of Cd and Pb which imply potential risks especially for children much more exposed than adults appeal to environmental consciousness.**

**Key words:** Lead, cadmium, fish, exposed children, lacustrial city of Ganvié, daily dose of exposure (DDE).

## INTRODUCTION

The activities of industrial production generate waste of various kinds which, once discharged into the environment, are likely to adversely affect the ecosystem. They have mostly led to a rapid increase of various pollutants (heavy metals) in urban receiving water bodies such as lagoons, lakes, rivers and seas (Chester, 1982; Ajao et al., 1987; Salvadé et al., 2006). This has adverse effects on the various components of the aquatic environment such as water and fishery products (Skulberg et al., 1984; Saad et al., 1994). Several research works conducted have revealed high doses of contaminants, particularly heavy metals in mussels (Traoré et al., 1999; Moustaid et al., 2005), water (Gnandi et al., 2007; Adam et al., 2010), snails (Edorh et al., 2009) and fish (Gnandi et al., 2007; Hounkpatin, 2010).

This study proposes to assay lead and cadmium in fish from the lacustrial city of Ganvié and to assess the risks

*Corresponding author. E-mail: harmelle2007@yahoo.fr. Tel: 0022995493577.

of the population health. Apart from the lack of information on the subject, a number of reasons warrant this option. The rapid demographic growth, increased urbanization, industrialization and uncontrolled exploitation of natural resources in Benin have resulted in the increase of food-producing crops in the vicinity of streams and market gardens along the beach.

This generates a source of pollution to the sea, rivers and lakes by heavy metals contained in fertilizers and pesticides used. The results of work conducted by Edorh (2009) and Hounkpatin (2010) respectively showed that the sediments of the River Okpara, and Lake Nokoué are polluted by lead and cadmium. Lake Noukoué, the largest inland lake of Benin (150 km² at minimum flow), presents two characteristics: a very high fish production (18046.22 tons on average from 1987 to 1997) (Folai and Gonou, 2001) and a large lacustrian population organized into several villages with houses built on stilts directly implanted into the water. Ganvié is one of the most important villages of the lacustrian housing system with 20,568 inhabitants (INSAE, 2004).

It represents a touristic place visited by many tourists which creates many human-induced activities. Ganvié population has always believed that the lake, their immediate surroundings are an ideal receptacle for waste products in their various natural, domestic and professional activities (Folai Gonou, 2001). The dumping of garbage and solid waste of any kinds, the traffic of petroleum products by dugout canoe, the spillage of petroleum products in the lake, pollution from excessive use of motorized boats, pluvial water disposal from the Cotonou city, the River Ouémé flows, are sources of potential contamination of this ecosystem by heavy metals (Dovonou, 2009). All these wastes, therefore, containing several pollutants, including heavy metals (lead and cadmium), are found directly or indirectly in this lake. They pose a potential risk to this aquatic ecosystem, particularly with their content. These toxic components, very persistent over time, penetrate more or less quickly and directly the food chain, exposing the man slowly but surely to poisoning. In addition, throughout the food chain, some toxic metals (Pb, Cd) are concentrated in living organisms. They can reach very high levels in some species (such as fish) consumed by humans. This presents a real danger to humans because of the phenomena of bioaccumulation in the food chain (CEDA, 1997).

The importance of fish to ensure food security of populations in need was announced in the Bangkok Declaration (Subasinghe et al., 2000). From the standpoint of human nutrition, fish are a source of high biological-value proteins, which currently covers nearly 20% of protein intake. The fish are also excellent sources of micronutrients (trace elements, vitamins or provitamins) and long poly-unsaturated fatty acids (LPUFAs). The LPUFAs promote the improvement of membrane fluidity, decreased blood platelet aggregation and consequently less cardiovascular disease, increased immune resistance and resistance to carcinogenesis (Simopoulos, 2001). These fatty acids are also important for vision and brain development; even they have been played a vital role from the beginning of humanity (Broadhurst et al., 1998; Crawford et al., 1999). Though very essential for man, the sanitary quality of these fish is deteriorating because of pollution of aquatic ecosystems.

The aim of the present study was to determine the concentration of lead and cadmium in fish most consumed in the lacustrian city of Ganvié and to assess the risks associated with its use on the health of populations through the calculation of Daily dose of exposure (DDE).

## MATERIALS AND METHODS

### Study site

Lacustrian city of Ganvié is located on the north-west bank of Lake Nokoué in Cotonou, at the outlet in the West of Sô Bank in the lake and at 11 km from the landing Whorf of Abomey - Calavi. It is bordered in the north by Sô-Ava, north-east by the lacustrian village of Vekky; north-west by Lake (village near Akassato), in the east by the lacustrian village of Aguégués (Figure 1).

### Sampling

All samples were collected in the morning on February 24, 2010, frozen at -20°C and kept cold at 4°C until forwarding to the laboratory of Management, Treatment, and Recovery of Waste (MTRW) called "laboratoire de Gestion, Traitement, et Valorisation des Déchets (GTVD)" of University of Lome (Togo).

The collection of fish was carried out on in the catches from the artisanal fishery made of nets, fish holes (houédos) and acadjas. The fish species most consumed by local people and having an average weight of 70 g ± 5 and an average size of 10 cm ± 2 were selected.

Hence the species:

i. *Sarotherodon melanotheron*, Cichlidae (Omnivore)
ii. *Chrysichthys auratus*, Claroteidae (Carnivore)
iii. *Liza falcipinnis*, Mulgilidae (Omnivore)

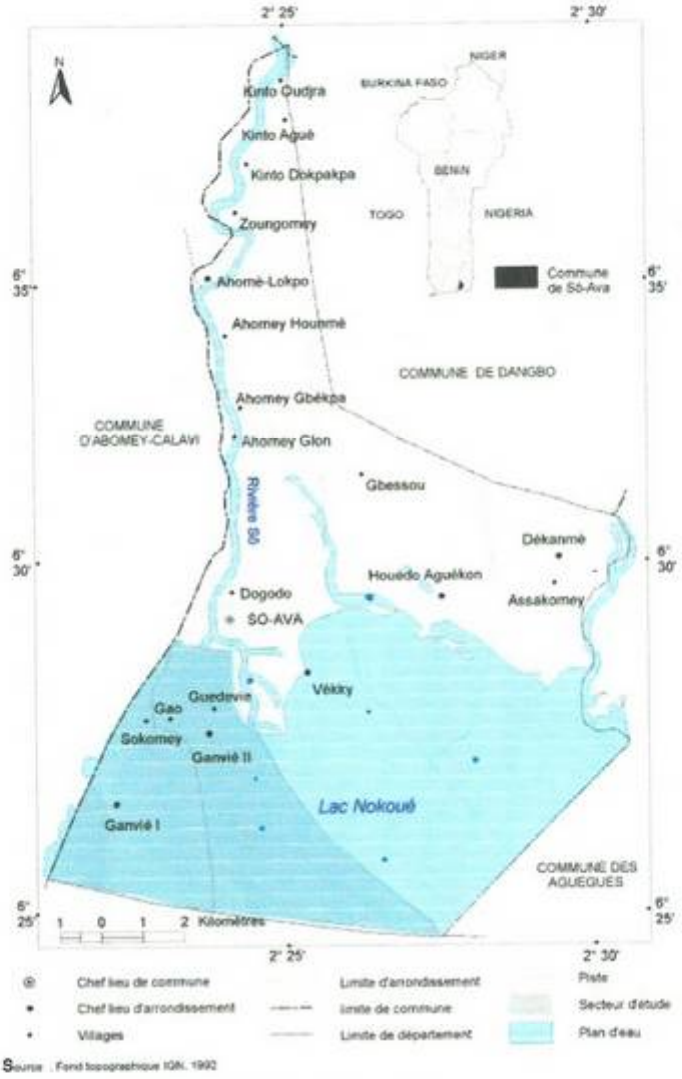
Twelve samples of each of these three species of fish chosen were collected (a total of 36 fish). They were placed in labeled polypropylene Falcon tubes, stored in ice and immediately transported to the laboratory.

To assess the risk of population exposure, the whole fish were used but by taking into account the conditions of consumption.

All fish samples were cut and dried in entirety (except viscera) in an electric furnace (oven): initially at 50°C for 12 h and then increased to 120°C for 24 h.

### Dosages of heavy metals in samples

All tests were performed in the good laboratory practice, distilled water and pure acids suitable for trace element analysis were used. All samples, after maceration in nitric acid ($HNO_3$), were digested in a digester (electronic sand bath at 125°C for 1 h) for the extraction of all heavy metals. But only Lead and cadmium were measured by atomic absorption spectrophotometer (AAS).




Source : Fond topographique IGN, 1992

**Figure 1.** Geographical position of lacustrial city of Ganvié.

**Principle of method** aphical position of lacustrial city of Ganvié

The atomic absorption spectrophotometer is defined as the absorption of radiation energy by atoms. This absorption is related to the concentration of metal ions present. Which is a metal atom at the fundamental energy state (Eo), this atom receives energy from a radiation (Io), a peripheral electron passes its normal orbit (Eo) to an outer orbit of energy E with

$E = Eo + h\mu$

The absorption of a photon intensity Io = hμ is based on spectrophotometry of atomic absorption. After absorption, the incident energy Io becomes I <Io, it is the decrease of energy that is

measured in the atomic absorption spectrophotometer. The decrease in the intensity of transmitted radiation can be represented by the law of Beerlambert:

I = Io expo - (KCL);

I = intensity of transmitted radiation; Io = intensity of incident radiation
K = absorption coefficient; C = concentration in atom; L = length of the path traveled by the radiation through the sample; Absorbance = A = log (Io / I) = Kcl

There was reduction in the number of atoms in the fundamental state which was proportional to the concentration of the absorbing medium. The absorbance was proportional to the number of atoms at any temperature and wavelength.

**Instrumentation and reagents**

1. Atomic absorption spectrophotometer (AAS) Thermo Orion assisted with software Solaar S2, includes:

i. A light source: which emits radiation of resonance of the considered element, the line emitted should be fine and radiation must be stable, specific and intense enough.
ii. Hollow cathode lamps. Which consist of:

a. A cathode made of metal element to be assayed
b. An anode consisting of a wire or a tungsten disc. Both electrodes are covered with a glass envelope containing an inert gas under low pressure.
c. A noble gas of filling at low pressure.

The mechanism of formation of atoms is as follows: a potential difference was generated between the electrodes. The atoms of noble gas were transformed into ions at the anode and were pulled at high speed toward the cathode. The bombardment of the cathode by these ions released metal atoms. They collided with ions of noble gas and undergo various states of excitation emitting proper radiation of metals of cathode.

2. A generator of atomic vapor (flameless)
3. A flame;
4. Monochromator: it must separate the resonance line of the other lines in the spectrum. The width of the bandwidth is about 0.1 to 0, 2 nm. If the bandwidth is fine top, the energy was insufficient and the measure was indefinite.
5. Detector;
6. Computer recorder connected to a printer;
7. Sand bath; 50 mL volumetric flasks;
8. Set of atomic pipettes or micropipettes (100 to 1000 uL);
9. Pipette with adjustable volume, from 1 to 5 mL with a rubber vacuum;
10. Electrical Balance SCHIMADZU type BX 3200 D;
11. Mortar and pestle with silica;
12. Automatic pipette Calculator or micropipettes for the preparation of analytical standards;
13. Digester;
14. Teflon tube;
15. Storage Bottles of 125 mL and disposable tips;
16. Reference Standards for Cd and Pb;
17. Stopwatch;
18. Laboratory rags; Nitric acid ($HNO_3$) pure, concentrated (65%) for analysis;
19. Hydrochloric acid (HCl) pure, concentrated (37%) for analysis;
20. Distilled water

**Preparation of standard solutions**

Calibration standards were prepared from aqueous standard of the same metals, and acid concentration as the samples in order to minimize the matrix effect. The concentration of all commercial stock solutions (reference standard) is 1000 ppm in order to ensure stability.

The standards were prepared: Pb and Cd: 1, 2 and 4 ppm. The Appendix summarizes the results of the preparation of standards.

We performed a calibration according to the standards required by Directive 2001/22/EC of the Commission on March 8, 2001. The concentration of the standards covered the range of sample concentrations that were measured, and the number of standards was related to the number of metals to be determined. A pure white (control) were also prepared to check the quality of the samples. It consists of distilled water and 2 mL of nitric acid for the fish.

**Preparation of samples for assaying through ASA**

It is essentially about grinding and acid digestion. The grinding technique does not necessarily produce a uniform sample, but it facilitates the digestion step and increases the level of reproducibility. And cross-contamination between samples is negligible. After grinding, weigh 1 g of ground material in a mortar with silica in the electronic balance SCHIMADZU type BX 3200 D. Spilled in the Teflon tubes previously labeled, and then add 5 ml of distilled water. Then add 2 mL2 of nitric acid ($HNO_3$) concentrated on fish samples.

After these steps, the acid digestion followed, which involves placing the Teflon tubes containing each mixture in a sand bath for 1 hour. Once digestion is complete, Teflon tubes were removed from the bath sand and were placed at room temperature. The mineralized product (digest) was collected in a flask of 50 mL and supplemented with distilled water to the reference line. It is then filtered and stored at 4°C in a 125 mL flask until assay.

Flame atomic absorption spectrophotometer flame was used. The assay was performed by interpolation on standard curves prepared from standard solutions. That was how Pb, and Cd found in fish samples were assayed.

**Calculations**

The results displayed by the software Solaar S2 on the computer screen associated with the spectrophotometer, is for a solution (AA S reduces interference) and are expressed in ppm. To get the corrected concentration this value was multiplied by the dilution factor of the sample and divided by the initial weight of the sample before digestion.
This is:

$$\text{Final Concentration (ppm)} = \frac{\text{Indicated Concentration} \times 50\ \text{mL}}{1\text{g}}$$

Limit of detection (analysis by flame) = (2.0 × 3 × s) / A

**Vital tools and reagents**

Hollow cathode lamp (Pb, Cd); Sample used to test the limit of detection (blank solution or standard solution with a concentration 3-5 times higher than the concentration of the expected detection

**Table 1.** Results of the survey on the amount of fish consumption.

| Frequency of consumption | Quantity (g) | Children (%) |
|---|---|---|
| At least once a day | 25 | 15 |
| | 50 | 34 |
| | 75 | 20 |
| | 100 | 11 |
| | 150 | 9 |
| | 175 | 7 |
| | 200 | 2 |
| | 250 | 1 |
| | 300 | 1 |
| Average/child | 83.25 | 100 |

M = ((25 × 15) + (34 x 50) + (75 × 20) + (100 x 11) + (150 x 9) + (175 ×7) + (200 × 2) + (250 x 1) + (300 × 1))/100 = 83.25g.

limit);
Distilled water. Stability (analysis by flame): Use the air-acetylene flame to continuously record the absorbance of the standard solution of metal (for an integration time of 30 s) and measure the range of maximum absorbance values. Consider the ratio between the maximum range (W) and the measured value (B) for the absorbance recorded as changes in reading.

Stability = W / B

### Evaluation method of exposure risks

The approach for the assessment was standardized (Ricoux and Gasztowtt, 2005) and conducted in four stages:

i. The selection of the heavy metals and the identification of the risks;
ii. The selection of the reference toxicity values;
iii. The estimation of exposure which will cross the levels of contamination of fish in Pb and Cd to the quantities consumed by a sampled population. Data on the habits, the amount and frequency of fish consumption were collected through group interviews;
iv. The characterization of the risks

### Statistical analyses

The calculations were carried out in EXCEL. The software used for descriptive statistics was SPSS 17.0 for the averages and standard deviations. The Student test at a probability of 5% using the section « compare means, one way ANOVA » as well as the Pearson correlation test were used.

## RESULTS

### The identification of risks

The main toxic effects resulting from consumption of food contaminated with cadmium affect the renal system. These nephrotoxic effects are characterized by proximal tubules' damage and a rise in urinary excretion of low molecular weight proteins associated with bone lesions. The exposure to cadmium may lead to lower mobility and density of sperm in men and the decrease in the newborn weight at birth in women.

When 95% of lead is set in red blood cells, anemia is the biological manifestation of toxicity whose prevalence and severity are directly correlated with blood lead concentrations. Several epidemiological studies strongly suggest a relationship between lead exposure and hypertension, even at very low exposure levels comparable to those which a very large fraction of the population is exposed. But the saturnine nephropathy is associated with exposure to high levels of lead for many years. More worrying are still the consequences of exposure to low doses of lead on the occurrence of congenital abnormalities and neurobehavioral development in the early childhood.

### Reference toxicological values

The AFSSA (France) has recommended 1 mg / kg and 3.6 mg / kg of body weight for cadmium and lead values respectively as acceptable daily dose (AFSSA, 2003). According to European Regulation EC No 466/2001, the permitted maximum concentration of Cd in fish is 0.05 mg / kg and 0.4 mg / kg for lead.

### Report of fish consumption data

The quantities were estimated according to the images of fish presented on props by parents who gave at least fish to their children a day (Table 1). The minimum average amount of fish consumed per child a day was the median M:

$M = \sum (\text{Quantity (g)} \times \% \text{ Children}) / 100$

M: Median (The minimum average Amount of Fish Consumed per child a day) Quantity (g): minimum amount of fish consumed by children in a day (g) % Children: percentage of children corresponding to different amounts
100: Number of children surveyed

M = ((25 × 15) + (34 x 50) + (75 × 20) + (100 x 11) + (150 x 9) + (175 × 7) + (200 × 2) + (250 x 1) + (300 × 1))/100 = 83.25 g

### Measurement of lead and cadmium in fish samples

There was a significant difference ($p < 0.05$) for lead concentration between *S. melanotheron* and *L. falcipinnis* (Table 2). For other means, there was no significant difference ($p > 0.05$). However, since this is an exposure, the average amount of Pb that a child may ingest through

Table 2. Concentrations of lead in fish.

| Heavy metal | Sample | Levels of fish contamination by heavy metal (mg/kg) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *Chrysichthys auratus* | *Sarotherodon melanotheron* | *Liza falcipinnis* |
| Pb | 1 | 23.12 | 13.12 | 35.21 |
| | 2 | 28.42 | 21.02 | 30.17 |
| | 3 | 31.49 | 19.48 | 32.69 |
| | 4 | 29.59 | 17.13 | 34.01 |
| | 5 | 27.44 | 20.18 | 32.54 |
| | 6 | 29.12 | 18.59 | 32.02 |
| | 7 | 32.56 | 21.01 | 29.87 |
| | 8 | 32.57 | 19.44 | 30.12 |
| | 9 | 30.34 | 16.98 | 31.65 |
| | 10 | 28.22 | 20.12 | 29.87 |
| | 11 | 27.93 | 22.06 | 31.78 |
| | 12 | 33.44 | 21.03 | 30.47 |
| | Average ± standard deviation | 29.52 ± 2.84 | 19.18± 2.46 | 31.70± 1.71 |
| | Overall average ± standard deviation | | 26.80 ± 0.57 | |

the consumption of these three species of fish was calculated and was 26.8 ± 0.57 mg/kg.

There was no significant difference for cadmium concentration between the three averages taken in pairs ($p > 0.05$). The average amount of Cd that a child may ingest through the consumption of these three species of fish was calculated and was 1.798 ± 0.29 mg/kg.

**The characterization of the risks: calculation of DDE**

The daily dose of exposure (DDE)

$DDE_x = (Q \times C_x)/BW$

$DDE_x$ is the daily dose of exposure for the metalin µg /kg/day; Q is the average quantity of fish consumed by a child per kg; $C_x$ is the average concentration of métal measured in the three fish species in µg /kg; BW is the body weight of consumer (child) in kg ; x Pb , Cd.

$DDE_{child} = DDE_e + DDE_{al}$;

Where: $DDE_{child}$ = total daily dose of exposure to a toxic in µg / kg / day; $DDE_e$ = daily dose of exposure provided by the consumption of fish contaminated with a toxic in µg / kg / day and $DDE_{al}$ = daily dose of exposure to a toxic food provided by the line feed in µg / kg / day.

$DDE_{adult} = (DDE_{child} \times AW_{child}) AW_{adult}$

Where: $DDE_{child}$ = daily dose of exposure in child in µg / Where: $DDE_{child}$ = daily dose of exposure in child in µg / kg / day; $DDE_{adult}$ = daily dose of exposure in adult in µg / kg / day and $AW_{adult}$ = average weight in adult of 65 kg.

**Calculation of risk quotient**

The risk quotient is defined as the ratio between the observed average of DDE and corresponding tolerable daily dose (TDD) using the following formula:

$RQ = DDE_{total}/TDD$.

Where, RQ is the risk quotient, $DDE_{total}$ is the total daily dose of exposure in µg / kg / day, and TDD the tolerable daily dose in µg / kg / day.

**DISCUSSION**

The assessment of exposure of the target population to lead and cadmium in the lacustrian city of Ganvié required the use of two sources of data according to Ricoux and Gasztowtt (2005): The information provided by questionnaire on consumption (Table 1) and the results of the measurements of lead and cadmium in fish samples (Tables 2 and 3). Only the average concentration of lead between *S. melanotheron* and *L. falcipinnis* were significantly different ($p < 0.05$). For other results, there was no significant difference both for the lead and for cadmium ($p > 0.05$) in all the different fish species used. The WHO standards (1998) for the limit concentrations were 0.4 and 0.05 ppm respectively. The values of DDE obtained in the present study were higher than the limits permitted by WHO (1998) which were 3.6 and 1 mg / kg and were more alarming than those obtained with adults of 65 kg which were 34.22 and 2.28 mg / kg,

Table 3. Concentrations of cadmium in fish.

| Heavy metal | Sample | Levels of fish contamination by heavy metal (ppm) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *Chrysichthys auratus* | *Sarotherodon melanotheron* | *Liza falcipinnis* |
| Cd | 1 | 0.23 | 2.22 | 2.18 |
| | 2 | 0.26 | 2.56 | 3.31 |
| | 3 | 0.41 | 3.32 | 2.12 |
| | 4 | 0.27 | 2.55 | 2.54 |
| | 5 | 0.32 | 4.02 | 1.98 |
| | 6 | 0.13 | 1.88 | 1.65 |
| | 7 | 0.57 | 3.12 | 3.04 |
| | 8 | 0.47 | 2.74 | 2.02 |
| | 9 | 0.33 | 3.42 | 1.13 |
| | 10 | 0.18 | 3.91 | 1.34 |
| | 11 | 0.22 | 2.86 | 2.22 |
| | 12 | 0.21 | 2.92 | 1.79 |
| | Average ± standard deviation | 0.3± 0.12 | 2.96± 0.64 | 2.11± 0.63 |
| | Overall average ± standard deviation | | 1.79 ± 0.29 | |

Table 4. Average daily supply and daily dose of exposure to lead and cadmium.

| Variable | Lead | Cadmium |
|---|---|---|
| ADF child 3 to 8 years | 52 µg/jour | 7.6 µg/day |
| DDE al child (20 kg) | 2.60 µg/kg/jour | 0.38 µg/kg/day |
| DDE al adult (≥65 kg) | 0.68 µg/kg/jour | 0.16 µg/kg/day |

respectively. However, the DDE obtained in children must be added to the daily dose provided by the line feed (DDEal), inasmuch as children were exposed to the same heavy metals through other foods in the same way as the general population (Ricoux and Gasztowtt, 2005). The average daily food (ADF) and daily doses of exposure (DDEal) provided by the line feed for lead only (Table 4) imply that other foods were contaminated in the same way as fish. The total daily dose of exposure to lead and cadmium (Table 5) was lower in adults (35.01 and 2.40 mg / kg / d) than in children (113.80 and 7.80 mg / kg / d). The risk quotient was very much greater than 1 for children (31.60 and 7.80) and closer to 1 for adults (9.72 and 2.40). Therefore, children pay a double tribute to this pollution because they are not only more exposed to the heavy metal but their bodies are more fragile. Children are more exposed since they consume, with relation to their weight, at least twice as much food as adults and that the contaminants are more easily absorbed in their bodies (RCAP, 1996). Ingested contaminants such as metals can be even more harmful to children. The body of the child absorbs potentially more contaminants and cannot eliminate them as easily as adults since their scavenging system is less developed. Children spend more time playing outdoors and are more exposed to airborne contaminants (RCAP, 1996) which are also in one way or the other in the overall exposure. In addition, there is more risk to an average consumption of 83 g / d of contaminated fish in the village of Ganvié, which is not the case in adults where the risk is theoretically lower. Adults are the main victims of contamination or poisoning with lead and cadmium, but when young children are affected, their health is at risk. Lead and cadmium are the metals most toxic to humans (Testud, 2005). Very small amounts of metals can interfere with cognitive development and cause serious problems. In addition, a significant proportion of pollutants in particular lead inserted into their bodies, about 25%, remains in their blood and causes neurotoxic effects. By contrast, in adults, only 5 to 10% of absorbed lead remains in their blood. The rest is fixed in the bones and teeth (Sanborn et al., 2002). Daily doses of exposure to lead via consumption of fish species *Liza falcipinnis, Sarotherodon melanotheron, Chrysichthys auratus* were found generally higher compared to DDE provided by the line feed (111.22 mg / kg / j> 2.60 mg / kg / day for Pb and 7.42 mg / kg / d> 0.68 g / kg / d for Cd), which implies that lead exposure is more important through consumption of fish than other food sources.

Moreover, lead, toxic element (Le Roux et al., 2005) can cause neurological, hematological, gastrointestinal, reproductive, immunological and apoptotic disorders

Table 5. The results of the assessment of exposure to Pb and Cd.

| Metal | Q (kg/d) | Ce (mg/kg) | BW (kg) | | DDE (µg /kg/d) | | DDE total (µg/kg/d) | | RQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Child | Adult | Child | Adult | Child | Adult | Child | Adult |
| Lead | 0.083 | 26.80 | 20 | 65 | 111.22 | 34.22 | 113.80 | 35.01 | 31.60 | 9.72 |
| Cadmium | | 1.79 | | | 7.42 | 2.28 | 7.80 | 2.40 | 7.80 | 2.40 |

(Patrick, 2006; Xu et al., 2008). Recent studies have shown that lead inhibits the activity of enzymes involved in oxidative stress (glutathione peroxidase, catalase and dismutase desuperoxide) (Ercal et al., 2001; Bolin et al., 2006). Other studies carried out in vitro have shown the increase in the production of free radicals after treatment with inorganic lead (Chen et al., 2003; Aykin-Burns et al., 2005). Clinical manifestations of lead are associated with blood lead concentration. However, the threshold of blood lead concentration which shields against clinical signs is related to the acceptable daily dose (ADD) that is achieved with a blood lead level of 20 mg / L in children, corresponding to an acceptable daily dose of 3.6 mg / kg (OMS, 1986). The consumption per individual of food contaminated with lead, which can cause blood levels of 10 mg / dL, may cause the inhibition of enzymes responsible for the synthesis of heme. This inhibition is total for 90 mg / dL (Landrigan and Tod, 1997). On the other hand lead slows the transfer of iron necessary for the development of heme from 15 mg / dL in children and 25-30 mg / dL in adults. It follows a damage of digestive tract, blood (anemia), kidneys and nervous system (Beauchamp, 2003) which are the symptoms of lead poisoning. The signs of chronic intoxication appear with constipation or diarrhea with paroxysmal abdominal pain (Dreisbach, 1983; Beauchamp, 2003). Excessive exposure of human to cadmium can cause his death because of its toxicity (Othumpangat et al., 2005). It enters cells and accumulates in high concentrations in cytoplasmic and nuclear space (Beyersmann and Hechtenberg, 1997; Satoh et al., 2003). It has a high affinity for the liver and kidneys (Cai et al., 2001). The phenomenon of acute toxicity in humans has been known since 1950 as Itai-Itai syndrome defined by the association a renal failure with osteoporosis (demineralization and weakening of bones) and osteomalacia (demineralization and deformation of bones). It is carcinogenic (Satoh et al., 2002; Banerjee and Flores-Rozas 2005) and teratogenic (Hovland et al., 2000). The genotoxic and apoptosis effect was observed in several types of cells (Fahmy and Aly, 2000; Kim et al., 2005; Mondal et al., 2005). WHO recommends that a tolerable weekly dose (TWD) of 7 micrograms of cadmium per kilogram of body weight per week in humans (Regulation CE No. 1881/2006) or 1 mg / kg / day. This element is not virtually eliminated by the body and its half-life in humans ranges from 17 to 30 years (Miquel, 2001).

Moreover, the results obtained in the area of study can be extrapolated to all children in the region due to the relative homogeneity of the average levels of lead and cadmium in fish (Ricoux and Gasztowtt, 2005) apart from the significant difference that exists between *S. melanotheron* and *L. falcipinnis*.

## Conclusion

The effects of lead and cadmium on health in terms of risk identification are well known; the concentrations of Cd and Pb were higher than that recommended by WHO which imply potential health risks in the regions. Therefore it is imperative to tackle the problem of the pollution in the Lake Nokoué so as to reduce health risk. Henceforth, the use of chemical fertilizers and pesticides in the plantations in the surroundings of the Lake, the discharge of garbage and solid waste of any kind into the lake, and the spillage of petroleum products in the lake must be prohibited.

## REFERENCES


Adam S, Edorh P, Totin H, Kournolou L, Amoussou E, Adékokou K, Boko M (2010). Pesticides et métaux lourds dans l'eau de boisson, les sols et les sédiments de la ceinture cotonnière de Gogounou, Kandi et Banikoara (Bénin). Int. J. Biol. Chem. Sci., 2009, 3(5): 1141-1150.

Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) (2003). Institut de veille sanitaire. Le méthylmercure. Programme "mortalité et morbidité des maladies d'origine alimentaire" – Volet toxicologique - Contaminants chimiques et risque alimentaire en France, document de travail.

Ajao EA., Okoye BCO, Adékanbi EO (1987). Physical and chemical oceanography division, Nigeria Institute for Oceanography and Marine Research, Lagos

Aykin-Burns N, Franklin EA, Ercal N (2005). Effects of N-acetylcysteine on lead-exposed PC-12 cells. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: 119-123.

Banerjee S, Flores-Rozas H (2005). Cadmium inhibits mismatch repair by blocking the ATPase activity of the MSH2-MSH6 complex. Nucleic. Acids Res., 33: 1410-1419.

Beauchamp J (2003). La Pollution littorale. DESS Qualité et Gestion de l'eau, Université de Picardie Jules Verne (France), 30p.

Beyersmann D, Hechtenberg S (1997). Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. Toxicol. Appl. Pharmacol., 144: 247-61.

Bolin CM, Basha R, Cox D, Zawia NH, Maloney B, Lahiri DK, Cardozo-Pelaez F (2006). Exposure to lead and the developmental origin of oxidative DNA damage in the aging brain. Faseb. J., 20: 788-790.

Cai Y, Aoshima K, Katoh T, Teranishi H, Kasuya M (2001). Renal tubular dysfunction in male inhabitants of a cadmium- polluted area in Toyama, Japanan, eleven-year follow-up study. J. Epidemiol., 11: 180-189.

CEDA (1997). Centre pour l'Environnement et Développement en Afrique. Profil environnemental de la zone côtière, Côte d'Ivoire, 43p.

Chen L, Yang X, Jiao H, Zhao B (2003). Tea catechins protect against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium dysregulation in PC12 cells. Chem. Res. Toxicol., 16 : 1155- 1161.
Chester R (1982). Regional trends in the distribution and resources of luminosilicates and trace metals in recent North Atlantic deep sea sediments. Bull. Inst. Geol. Basin d'Aquitaine Bordeaux, 13: 325 - 335.
Dovonou FE (2009). Pollution des plans d'eau du Sud Bénin et risques écotoxicologiques : Cas du lac Nokoué. Mémoire de DEA en Environnement, Santé et développement, CIFRED, UAC, 88p.
Dreisbach RH (1983). Handbook of poisoning: Prevention, Diagnostic and Treatment, California: Lange Medicamental Publishers; 11: 632p.
Edorh AP, Agonkpahoun E, Gnandi K, Guédénon P, Koumolou L, Amoussou C, Ayedoun A, Boko M, Gbeassor M, Rihn H, Creppy E (2009). An assessment of the contamination of Achatina achatina by toxic metals in Okpara village, Int. J. Biol. Chem. Sci., 2009, 3(6): 1428 -1436.
Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. Curr. Top. Med. Chem., 1: 529-539.
Fahmy MA, Aly FA (2000). *In vivo* and *in vitro* studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice. J. Appl. Toxicol., 20: 231 - 238.
Gnandi K, Tomêty-Mensah F, Amey Apoh Y, Edorh P (2007). Distribution, biodisponibilité et bioaccumulation des métaux lourds dans le système lagunaire de Lomé, J. Rech. Sci. Univ., Lomé (Togo), Série A, 9(1): 67-81.
Hounkpatin A (2010). Pollution des écosystèmes aquatiques par les métaux toxiques (Pb et Cd) : cas de la cité lacustre de Ganvié. Mémoire de DESS Sciences de l'environnement et développement durable, CIFRED, UAC, 72 p.
Hovland DN Cantor RM, Lee GS, Machado AF, Collins MD (2000). Identification of a murine locus conveying susceptibility to cadmium-induced forelimb malformations. Genom., 63: 193-201.
INSAE (2004). Cahiers des villages et quartiers de ville, département de l'Atlantique. Cotonou, 34p.
Kim SD, Moon CK, Eun SY, Ryu PD, Jo SA (2005). Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. Biochem. Biophy. Res. Commun., 328: 326-334.
Landrigan PJ, Todd AC (1997). Lead poisoning. West J. Med., 161(2): 153-159.
Mondal TK, Li D, Swami K, Dean JK, Hauer C, Lawrence DA (2005). Mercury impairment of mouse thymocyte survival in vitro: involvement of cellular thiols. J. Toxicol. Environ. Health, 68: 535-556.
Moustaid K, Nasser B, Baudrimont I, Anane R, El Idrissi M, Bouzidi A, Creppy EE (2005). Comparative evaluation of the toxicity induced by mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from two sites of the Moroccan Atlantic coast in mice. C. R. Biol., 328(3): 281-289.
OMS/FAO. Joint FAO/WHO (1986). Expert comittee on food additives. Sixty-first meeting. Summary and conclusions.
Othumpangat S, Kashon M, Joseph P (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. J. Biol. Chem., 280: 162-169.
Patrick L (2006). Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. Altern. Med. Rev., 11: 114-127.
Ricoux C, Gasztowtt B (2005). Evaluation des risques sanitaires liés à l'exposition de forts consommateurs produits de la pêche de rivière contaminés par des toxiques de l'environnement. 65p.
Royal Commission on Aboriginal Peoples (RCAP). (1996). Gathering Strength. Ottawa, Canada Communications Group. 3: 185.
Saad M, Amuzu AT, Biney C, Calamari D, Imevbore AM, Naeve H, Ochumba PBO (1994). Charges organiques d'origine domestique et industrielle. Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain. Document technique du CPCA. N°25. Rome, FAO, 129p.
Salvad V, Quintana XD, Hidalgo M (2006). Monitoring of nutrients, Pesticides, and metals in waters, Sédiments, and fish of a Wetland. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 377-386.
Sanborn MD, Abelsohn A, Campbell M, Weir E (2002). Identifying and managing adverse environmental health effects: Lead exposure. CMA J., 14; 166 (10): 1287-92.
Satoh M, Kaji T, Tohyama C (2003). Lowdose exposure to cadmium and its health effects. Part 3. Toxicity in laboratory animals and cultured cells. Nippon Eiseigaku Zasshi, 57: 615-623.
Satoh M, Koyama H, Kaji T, Kito H, Tohyama C (2002). Perspectives on cadmium toxicity research. Tohoku J. Exp. Med., 196: 23-32.
Skulberg OM, Codd GA, Carmichael WW (1984). Toxic blue-green algi blooms in Europe: A growing problem. Ambio, 13: 244-247.
Testud F (2005). Pathologie toxique professionnelle et environnementale. 3ème éd, Eska, Paris, 672p.

Appendix. Concentrations of standards.

| S/N | Standards of reference (ppm) | Final volume (mL) | Volume measured (mL) and final standard(ppm) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pb | | Cd | |
| | | | V. measured | Final C. | V. measured | Final C |
| 1 | 1000 | 50 | 0.05 | 1 | 0.05 | 1 |
| 2 | 1000 | 50 | 0.1 | 2 | 0.1 | 2 |
| 3 | 1000 | 50 | 0.2 | 4 | 0.2 | 4 |

**Publication 3 : Haematological evaluation of Wistar rats exposed to chronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury**

academicJournals

Vol. 12(23), pp. 3731-3737, 5 June, 2013
DOI: 10.5897/AJB12.2669
ISSN 1684-5315 ©2013 Academic Journals
http://www.academicjournals.org/AJB

African Journal of Biotechnology

*Full Length Research Paper*

# Haematological evaluation of Wistar rats exposed to chronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury

**Hounkpatin, A. S. Y.[1*], Edorh, P. A.[1,2], Guédénon, P.[1], Alimba, C. G.[3], Ogunkanmi, A.[3], Dougnon, T. V.[1], Boni, G.[1], Aissi, K. A.[1], Montcho, S.[1], Loko, F.[4], Ouazzani, N.[5], Mandi, L.[5], Boko, M.[1] and Creppy, E. E.[6]**

[1]Interfaculty Centre of Training and Research in Environment for Sustainable Development (CIFRED), University of Abomey-Calavi, 03 BP 1463, Cotonou, Benin.
[2]Departement of Biochemistry and Cellular Biology, University of Abomey-Calavi, 01BP 526 Cotonou, Benin.
[3]Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, University of Lagos, Nigeria
[4]Polytechnic School of Abomey-Calavi, Research Laboratory in Applied Biology, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Benin.
[5]Laboratory of Hydrobiology, Ecotoxicology and Cleansing, Department of Biology, Faculty of Science Semlalia, University Cadi Ayyad, BP 2390, Marrakech, Morocco.
[6]Laboratory of Toxicology and Applied Hygiene/UFR of Pharmaceutical Sciences, 146, Road Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

Accepted 10 May, 2013

**Cadmium and mercury present in the environment, cause blood disorders. This study was conducted to evaluate the influence of cadmium, mercury and their combination on hematological parameters of Wistar rats. For this purpose, two different doses of each metal and their combination were administered orally for 28 days to six groups of five rats each. Two groups (A and B) were respectively exposed to $CdCl_2$ (0.25 and 2.5 mg/kg), two other groups (C and D) respectively received $HgCl_2$ (0.12 and 1.2 mg/kg) and the last two groups (E and F) were respectively treated with the combination of these two metals: (0.25 mg/kg Cd + 0.12 mg/kg Hg) and (2.5 mg/kg Cd + 1.2 mg/kg Hg). The control group (G) received the same volume of distilled water. At the end of exposure, bodies of rats were weighed and the whole blood was collected by retro-orbital sinus method for analysis of hematological parameters. The results of this study show a significant decrease ($p<0.05$) in white blood cells (WBC) in the lot treated with the combination (0.25 mg/kg Cd + 012 mg/kg Hg) and also indicate a significant decrease ($p<0.05$) in WBC, red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HGB) and the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) with high levels of mercury (2.5 mg/kg) and the combination (2.5 mg/kg Cd + 1.2 mg/kg Hg). An increase in the number of platelet count (PLT) in all intoxicated lots was observed.**

**Key words:** Cadmium, mercury, hematology, blood parameters, rats.

## INTRODUCTION

Heavy metals are hazardous substances that cause serious health risk to ecosystems and organisms due to their high toxicity conferred by nature of their environmental persistence (Abbas, 2002). Mercury ecosystem by

mercury and people consuming seafood are major concerns of health organizations since the Minamata disaster (Takizawa and Osame, 2001). Estimates made in populations deriving their livelihoods from fishing have shown that between 1.5 and 17 children in 1000 showed cognitive impacts due to consumption of fish containing mercury (OMS, 2010). Contamination of fish with methyl-mercury has been shown by research (Lindqvist et al., 1991). Research works also revealed the presence of high doses of other contaminants, particularly cadmium, in fish, shrimp (Guédénon et al., 2012a; Hounkpatin et al., 2012a, b) and other staple food such as drinking water (Adam et al., 2010), vegetables (Dougnon et al., 2012), seafood and giant snails (Edorh et al., 2009). Studies by Guédénon et al. (2012b) showed that fish contamination by cadmium and mercury is directly linked to the presence of these two metals in the environment. Cadmium and mercury have no known biological function (Seymore, 1994), and cause many diseases when accumulated in the body from food. Cadmium is toxic to humans, excessive exposure can cause death (Othumpangat et al., 2005). It enters cells and accumulates in high concentrations in cytoplasmic and nuclear space (Andujar et al., 2010). It has been observed to have a high affinity for the liver and kidneys (Cai et al., 2001). The classic symptoms of mercury contamination are carcinogenicity and/or damage to kidney function, visual, metabolic, reproductive, neurological and immunological (OMS, 2010; Mergler et al., 2007). The toxicity of mercury is directly assimilated by living organisms and bioaccumulate in the food chain (Mergler et al., 2007; Guimarães et al., 2000). After ingestion of contaminated food, over 90% of mercury is absorbed through the gastrointestinal wall, and then transferred into the body through the bloodstream and after 4 days, diffused throughout the human body. The brain has the special focus of this element especially in lipid molecules, with mercury (Hg) concentrations being up to 6 times higher than those measured in the blood (Kjellstrom et al., 1989). The methyl-mercury is a very active neurotoxin that can pass into the blood and across cell membranes. These properties provide a stable period with a relatively long half-life: 70 days in the blood (Picot and Proust, 1998). The alterations in haematological changes serve as the earliest indicators of toxic effects on tissue (Paprikar, 2003). Blood is the most important tissue, in which changes in metabolic processes are reflected, therefore, abnormal alteration in blood parameters are the reliable indicator of toxic effects of drugs, chemicals and diseases (Lodia and Kansala, 2012)

Mercury and cadmium has been recognized as a biological toxicant. They are widely dispersed in the environment and are, with excessive levels, toxic to humans (Jarup, 2003). Absorbed cadmium and mercury following oral ingestion is carried via blood to soft tissues. In this respect, the present study was designed to evaluate the toxic effects of cadmium, mercury and their combination on the disruption of hematology in Wistar rats.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

The animal material was composed of 35 male albino Wistar rats weighing about 108±25 g. These rats were obtained at the Animal Breeding Unit of the University of Lagos, Nigeria and were acclimated for two weeks before the experiments. They were placed in designed sterile polypropylene cagesin at room temperature (25 to 30°C) with relative humidity of 60°C±5%. The cages were illuminated with a sequence of 12 h light and 12 h darkness. Animals had free access to water and standard rodent laboratory chow (Ladokun feed Nigeria®) *ad libitum*, in the animal "Botanical and Zoological Garden" in the University of Lagos.

### Chemicals and preparation of different solutions

The chemicals tests used for the experiment were cadmium chloride and chloride anhydrous of mercury. The powdered mercuric chloride ($HgCl_2$ = 271.50; minimum assay: 98%) and cadmium chloride ($cdcl_2$ = 183.32; minimum assay: 99%) were purchased from "General Purpose Reagent BDH Chemicals Ltd. Poolo England". Concentrations were prepared for the experiment: 0.25 and 2.5 mg/kg for cadmium chloride and 0.12 and 1.2 mg/kg for mercuric chloride. The different solution concentrations were based on different daily doses, the average weight of each lot and the daily volume administered to rats (1 ml).

### Distribution of rats and tests

After two weeks of acclimatization, 35 animals were randomly divided into six groups of five rats each and one control group. Cadmium, mercury and their combination were administered by gavage (via stomach tube) for 28 consecutive days following the method of Awodele et al. (2010). The six groups of rats received daily doses of cadmium, mercury and their combination in a final volume of 1 mL of water. The first two groups (A and B) respectively received cadmium chloride (0.25 and 2.5 mg/kg), both groups (C and D) that followed received mercuric chloride (0.12 and 1.2 mg/kg) and the last two groups (E and F) received the combination of these two metals: (0.25 mg/kg Cd + 0.12 mg/kg Hg) and (2.5 mg/kg Cd +1.2 mg/kg Hg), respectively. The control group (G) received only the same volume of distilled water (Table 1). These different doses of cadmium respectively correspond to a dose producing significant results: 0.25 mg/kg (Ganesh and Satish,

*Corresponding author. E-mail: harmelle2007@yahoo.fr. Tel. 00 (229) 95 49 35 77 / 93 91 64 64.

**Abbreviations: WBC,** White blood cell count; **RBC,** red blood cells; **HGB,** hemoglobin concentration; **HCT,** haematocrit; **MCH,** mean corpuscular hemoglobin, **MCV,** volume of mean corpuscular erythrocyte; **MCHC,** mean corpuscular hemoglobin concentration; **PLT,** platelet count; **LYM,** number of lymphocytes; **ROS,** reactive oxygen species.

**Table 1.** Distribution of rats.

| Group | Number | Cadmium (Cd) (mg/Kg) | | Mercury (Hg) (mg/Kg) | | Distilled water (mg/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.25 | 2.5 | 0.12 | 1.2 | - |
| A | 5 | x | | | | |
| B | 5 | | x | | | |
| C | 5 | | | x | | |
| D | 5 | | | | x | |
| E | 5 | x | | x | | |
| F | 5 | | x | | x | |
| G | 5 | | | | | x |

1994) and 10 times this concentration (2.5 mg/kg). As for mercury, 1/10 (1.2 mg/kg) and 1/100 (0.12 mg/kg) of the $LD_{50}$ (Bharat et al., 2010) were used.

### Clinical observations

During the experimental period, the animals were subjected to a clinical examination on a daily basis. Signs such as loss of appetite, refusal to drink, the characteristics of feces (diarrhea or not), occurrence of abscesses, wounds and loss of hair were taken into account.

### Blood collection and haematological analysis

After 28 days of exposure, rats were fasted overnight. They were weighed before the collection of blood and sacrifice. All samples were taken between 7 and 9 am to avoid variations due to circadian rhythm. Whole blood was obtained from a puncture of the retro-orbital sinus by the conventional method (Van Herck et al., 1992). Blood samples collected in ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) anticoagulant tubes (8.5%) was quickly returned by mixing with anticoagulant in the tube. All blood samples were labeled and immediately conveyed to the laboratory for analysis. Hematological parameters were analyzed: white blood cell count (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HGB), haematocrit (HCT), the mean corpuscular hemoglobin (MCH), volume a mean corpuscular erythrocyte (MCV), the mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet count (PLT) and the number of lymphocytes (LYM). All hematological parameters were analyzed in the "Haematology Unit, Lagos state University Teaching Hospital (ULTH)" using the automated method with the automatic analyzer "Haematology auto analyzer Sysmex KX-21N".

### Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM of n experiments (where n represents the number of animals used). The differences between the treated and control rats were evaluated using the Students t-test p (T> t) = 0.05. The software used was Microsoft Excel 2010 and XL Stat 2011. The differences were statistically significant if the value of p <0.05 and not significant if the value of p >0.05.

## RESULTS AND DISCUSSION

During the exposure period, the rats showed clinical signs of toxicity. Group of rats (D) treated with the high concentration of mercury, showed an appearance of abscesses on the cheek (Figure 1) and loss of hair on the arm (Figure 2). For the group of rats (F) treated with the combination of the high concentration of cadmium and mercury, loss of hair on the back (Figure 3) and a wound on the tail (Figure 4) was observed. Similar observations were made by Alimba et al. (2012) which noted hair loss and appearance of abscesses in rats exposed to landfill leachate containing heavy metals after analysis. Similarly, Boujelbene et al. (2002) after experiments confirmed that the bristles are a reliable biomarker of exposure to highlight cadmium intoxication.

The mean and standard deviation of the blood parameters of the blood of rats exposed to cadmium, mercury and cadmium and mercury in combination at various concentrations are shown in Table 2. For WBC, there was a significant decrease (9.85±0.49) in animals of groups D, E and F compared to control group G. For RBC, we noticed a significant decrease in animals of groups D, F compared to the control group G. HGB decreased significantly in the blood of rats of groups D and F relative to the control group G. MCHC decreased significantly in the blood of the rats in groups D and F compared to the control group G. A decrease in HCT and LYM with the high concentration of mercury and the combination of high concentrations of cadmium and mercury was observed. In addition, there was an increase in PLT in all lots intoxicated compared to control group. The results found in this study show that some parameters widely vary depending on the lot of Wistar rats intoxicated with cadmium, mercury and their combination and the control group. This is for example the case of the erythrocyte. Indeed on animals of groups D and F, it reached values of $5.59.10^6$ /uL and $5.46.10^6$/µL against $8.46.10^6$/uL with animals of lot G (control). The number of

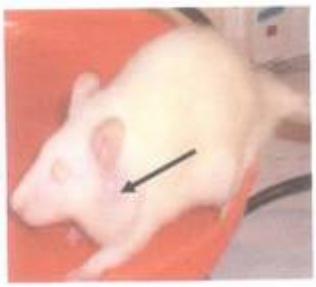


Figure 1. Abcess on the cheek. Rats (Group D) treated with the high concentration of mercury.

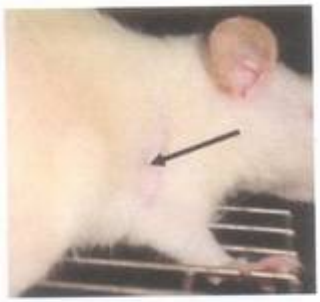


Figure 2. Loss of hair on the arm. Rats (Group D) treated with the high concentration of mercury.

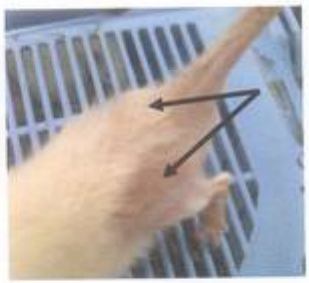


Figure 3. Loss of hair on the back. Rats (Group F) treated with the combination of the high concentration of cadmium and mercury.



Figure 4. Wound on the tail. Rats (Group F) treated with the combination of the high concentration of cadmium and mercury.

red blood cells obtained from animals in the groups D and F was very low compared to the results of Boukerche et al. (2007) where these authors found $8.45.10^6$/uL as the number of red blood cells in healthy Wistar rats. So the high dose of mercury and the combination of high doses of cadmium and mercury reduce the number of red blood cells causing anemia in Wistar rats intoxicated. These results were proved by Guédénon et al. (2012b) on fish exposed to cadmium and mercury and Kanhiya et al. (2009) in rats treated with mercuric chloride (0.926 mg/kg) orally for 21 days. The number of red blood cell hemolysis decreased due to intoxication (Lavicoli et al., 2003). The red blood cell count in not intoxicated rats (control) was stable and varied a little from one subject to another. Regarding hemoglobin, a similar trend was obtained with the lowest levels in the rats of groups D and F. This decrease in hemoglobin was also found by Lahouel et al. (2004) in rats intoxicated with paracetamol; by Bersenyi et al. (2003) in rabbit lead poisoning by Kanhiya et al. (2009) in rats treated with mercuric chloride (0.926 mg/kg) orally for 21 days, and by Ognjanović et al. (2003) in rats exposed to cadmium chloride. However, the reduction in HGB can be probably due to the production of reactive oxygen species (ROS) under the influence of mercuric chloride and cadmium chloride. This results in the destruction of the red blood cell membrane and its function.

With regard to hematocrit, a similar trend was obtained with the lowest levels in the rats of groups D and F. These results corroborate those of Tadjine et al. (2008) and Bersényi et al. (2003) on rabbits treated with metals. Considering the white blood cells, changes were observed mainly in rats of groups D and F in which the number was lower. These low values are related to the

**Table 2.** Mean values and standard deviation of the blood parameters of rats exposed to Cd, Hg and Cd + Hg.

| Dose | Parameter | Control | Cd | Hg | Cd+Hg |
|---|---|---|---|---|---|
| | | G | A | C | E |
| Low | WBC | 13.95±0.21 | 13.55±1.76 | 10.17±2.32 | 8.47±1.50* |
| | RBC | 8.46±0.72 | 7.45±1.76 | 7.36±0.49 | 7.18±0.69 |
| | HGB | 14.40±0.35 | 13.60±2.40 | 13.47±1.57 | 13.32±1.12 |
| | HCT | 47.450±0.07 | 44.95±8.83 | 46.47±5.20 | 45.07±4.84 |
| | MCV | 60.30±1.98 | 61.00±2.54 | 63.00±4.86 | 62.87±5.15 |
| | MCH | 18.20±0.42 | 18.50±1.13 | 18.25±1.40 | 18.60±1.10 |
| | MCHC | 31.30±0.84 | 30.30±0.56 | 29.00±1.07 | 29.60±0.89 |
| | PLT | 624.50±16,26 | 965.00±158.39 | 768.50±163.59 | 742.50±94.60 |
| | LYM | 69.60±10.46 | 69.00±10.46 | 69.87±11.96 | 69.80±6.29 |
| | | G | B | D | F |
| High | WBC | 13.95±0.21 | 12.50±1.20 | 9.85±0.49* | 8.15± 0.49* |
| | RBC | 8.46±0.72 | 7.78±0.66 | 5.59±1.02* | 5.46±0.78* |
| | HGB | 14.40±0.35 | 14.47±0.96 | 10.37±1.97* | 9.65±0.77* |
| | HCT | 47.450±0.07 | 48.00±3.57 | 37.55±8.74 | 35.85±4.73 |
| | MCV | 60.30±1.98 | 61.00±1.91 | 66.62±5.86 | 60.50±0.72 |
| | MCH | 18.20±0.42 | 18.60±0.58 | 18.52±0.48 | 18.45±0.77 |
| | MCHC | 31.30±0.84 | 30.20±0.29 | 27.35±1.39* | 27.00±0.70* |
| | PLT | 624.50±16.26 | 901.50±241.41 | 822.50±378.70 | 841.00±427.09 |
| | LYM | 69.60±10.46 | 71.32±11.02 | 65.75±5.47 | 65.30±4.38 |

*The difference between the value of blood parameters of the experiment groups and that of the negative control at 0.05. WBC, White blood cells (X103/µL); MCV, mean corpuscular volume (fL); RBC, red blood cells (X106/µL);MCH, mean corpuscular hemoglobin (pg); HGB. hemoglobin (g/dL); PLT, platelets (X103/µL); HCT, hematocrit (%); LYM: lymphocytes (%); MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL).

toxic action of mercury and cadmium and mercury combination which can induce leukopenia and thrombocytopenia in cases of severe liver dysfunction (Lee, 2004). These observations were also made by Lodia and Kansala (2012) and Veena et al. (2011) in mice treated with lead. The significant decrease in hemoglobin (10.37±1.97 and 9.65±0.77 g/dL) in rats of groups D and F, associated with a decrease in MCHC (27.35±1.39 and 27.00±0.70 g/L) indicate a tendency to macrocytosis and hypochromia hematopoiesis in the liver which occurs efficiently. Mercury and the combination of high concentrations of cadmium and mercury could inhibit heme synthesis of red blood cells as evidenced by Lodia and Kansala, (2012) and Veena et al. (2011) after lead poisoning. This causes signs of anemia described by Bottomley and Muller-Eberhard (1998). However, red blood cells were low in heme, where there was decrease in mean corpuscular hemoglobin concentration; indicated by our results in rats of groups D and F. The observed decrease in erythrocytes, hemoglobin and haematocrit is consistent with previous studies of anemia by Horiguchi, (2007) and Dhanapakiam and Ramasamy (2001). It was evidenced that the anemia was caused not only by increased destruction of erythrocytes (Kori-Siakpere et al., 2009) but also by decrease in the synthesis and release of erythrocytes into the blood circulation (Vinodhini and Narayanan, 2008). About heavy metals accumulation in kidney, spleen and liver by the same authors, it is conceivable that heavy metals might have suppressed the activity of these hematopoietic tissues. This idea is supported by the study of Gill and Epple (1993) that attributed the anemia to impaired erythropoiesis caused by a direct effect of metals on haematopoietic centres (kidney/spleen), accelerated erythroclasia due to altered membrane permeability and/or increased mechanical fragility and defective Fe metabolism or failure of intestinal uptake of Fe due to mucosal lesions.

## Conclusion

In view of these results, it appears that cadmium chloride and mercuric chloride induce hematological disturbances in rats. A large variation in these parameters from blood was recorded for the high concentration of mercuric chloride and the combination of high concentrations of

cadmium chloride and chloride mercuric. These environmental pollutants known for their effects which are particularly dangerous to human health, are present in the air, soil, water and ricocheted is found in foods of first necessity consumed by humans. Monitoring of these pollutants is necessary for a sustainable environment.

## REFERENCES


Abbas HH, Zaghloul KH, Mousa MA (2002). Effect of some heavy metal pollutants on some biochemical and histopathological changes in Blue tilapia, Oreochromis aureus. Egypt. J. Agric. Res. 80(3):1395-1411.

Adam S, Edorh P, Totin H, Koumolou L, Amoussou E, Aklikokou K, Boko M (2010). Pesticides et métaux lourds dans l'eau de boisson, les sols et les sédiments de la ceinture cotonnière de Gogounou, Kandi et Banikoara (Bénin). Int. J. Biol. Chem. Sci. 3 (5):1141-1150.

Alimba CG, Bakare AA, Aina OO (2012). Liver and kidney dysfunction in wistar Rats exposed to municipal landfill leachate. Scientific. Academic. Publish. 2(4):150-163.

Andujar P, Bensefa-Colas L, Descatha A (2010). Intoxication aiguë et chronique au cadmium. Res. Rev. Med Intern. 31(2):107-115.

Awodele O, Olayemi SO, Alimba CG, Egbejogu C, Akintonwa A (2010). Protective effect of vitamin C and or vitamin E on micronuclei induction by rifampicin in mice. Tanzania. J. Health. Res. 12:2.

Bersényi A, Fekete SG, Szocs Z, Berta E (2003). Effect of ingested heavy metals (Cd, Pb and Hg) on haematology and serum biochemistry in rabbits. Acta. Vet. Hung. 51 (3):297-304.

Bharat BP, Atish R, Soumik A, Shelley B (2010). Induction of oxidative stress by non-lethal dose of mercury in rat liver: Possible relationships between apoptosis and necrosis. J. Environ. Biol. 31:413-416.

Bottomley SS, Muller-Eberhard V (1998). Pathophysiology of the heme synthesis. Pernin. Hematol. 25:282-303.

Boujelbene M, Gorbel F, Makni-ayadi F, Guermazi F, Kammoun A, Groute F, Soleilhavoup JP, El eki addeltett AH (2002). Impact d'un traitement chronique au cadmium sur la fonction rénale chez le rat : Determination d'un biomarqueur d'exposition. L'Eurobiologist., 258 (35):3-17.

Boukerche S, Aouacheri W, Saka S (2007). Les effets toxiques des nitrates : étude biologique chez l'homme et chez l'animal. Ann. Biol. Clin. 65(4):38.

Cai Y, Aoshima K, Katoh T, Teranishi H, Kasuya M (2001). Renal tubular dysfunction in male inhabitants of a cadmium-polluted area in Toyama, Japanan, eleven-year follow-up study. J. Epidemiol. 11:180-189.

Dhanapakiam P, Ramasamy VK (2001). Toxic effects of copper and zinc mixture on some haematological and biochemical parameters in common crap, Cyprinus carpio (Linn). J. Environ.Biol. 22:105-111.

Dougnon TV, Edorh PA, Bankolé HS, Dougnon TJ, Montcho SA, Hounkpatin A, Gouissi M, Sossou B, Boko M, Creppy EE (2012). Evaluation of the toxicological quality of the leaves of Solanum macrocarpum L. cultivated with the chicken's droppings and water of marsh at Cotonou (Benin). J. Res. Environ. Sci. Toxicol., 1(1):001-006.

Edorh AP, Agonkpahoun E, Gnandi K, Guédénon P, Koumolou L, Guedenon P, Edorh PA, Kaki C, Yehouenou EPA, Gnandi K, Montcho S, Hounkpatin A, Koumolou L, Boko M. (2012a). Arsenic, Cadmium, Copper and Lead Accumulation in Water, Sediments and Fish Species of Ouemе River in Bonou. British J. Pharm. Toxicol. 4(1):13-20.

Guedenon P, Edorh PA, Hounkpatin ASY, Alimba CG, Ogunkanmi A, Nwokejiegbe EG, Deguenon Y, Gbeassor M, Creppy EE (2012b). Haematological study of *Clarias gariepinus* exposed to chronic and subchronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury. Sci. Nat. 4(2):2-19.

Guimarães JRD, Roulet M, Lucotte M, Mergler D (2000). Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. Sci. Total Environ. 261:91-98.

Horiguchi H (2007). Anemia induced by cadmium intoxication, Nihon Eiseigaku Zasshi. Japanese J. Hygien. 62(3):888-904.

Hounkpatin ASY, Edorh PA, Salifou S, Gnandi K, Koumolou L, Agbandji L, Aissi KA, Gouissi M, Boko M (2012a). Assessment of exposure risk to lead and cadmium via fish consumption in the lacustrian village of Ganvié in Benin Republic. J. Environ. Chem. Ecotoxicol. 4(1):1-10.

Hounkpatin AS, Edorh PA, Sézonlin M, Guédénon P, Elégbédé B, Boni G, Dougnon V, Montcho S, Kéké E, Boko M (2012b). Pollution of aquatic ecosystems by heavy metals at Ganvié's lacustrine city (Benin). Int. Res. J. Biotechnol. 3(6):81-87.

Jarup L (2003). Hazards of heavy metal contamination. Br. Med. Bull. 68:167-82.

Kanhiya M, Prabhu NS (2009). Assessment of haematotoxic potential of mercuric chloride in rat. J. Environ. Biol. 30 (5):927-928.

Kjellstrom T, Kennedy P, Wallis S, Stewart A, Friberg L, Lind B, Wutherspoon T, Mantell C (1989). Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage II. Interviews ans psychological tests at age 6, Solna. Nat. Swedish. Environ. Protect. Board. Report. 3642.

Kori-Siakpere O, Ogbe MG, Ikomi RB (2009). Haematological response of the African cat fish *clarias gariepinus* (Burchell,1822) to sub-lethal concentrations of potassium permanganate. Sci. Res. Essay. Academic J. 4(5):457-466.

Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre JP (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. J. Pat. Bio. 10:314-322.

Lavicoli I, Carelli G, Stanek EJ, Castellino N, Calabrese EJ (2003). Effects of low doses of dietary lead on red blood cell production in male and female mice. Toxicol. Lett. 137:193-199.

Lee WM (2004). Acetaminophen and the US acute liver failure study group: Lowering the risks of hepatic failure. Hepatology. 40:6-9.

Lindqvist O, Johansson K, Aastrup M, Andersson A, Bringmark L, Gunnar-Hovsenius G (1991). Mercury in the swedish environment recent research on causes, consequences and corrective methods. Water Air Soil Pollut. 55:261.

Lodia S, Kansala L (2012). Antioxidant activity of rubia cordifolia against lead toxicity. Int. J. Pharmacol. Sci. Res. 3(7):2224-2232.

Mergler D, Anderson HA, Chan LHM, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, Stern AH (2007). Methylmercury Exposure and Health Effects In Humans. Worldwide Concern. Ambio. 36 (1):3-11.

Ognjanović BI, Pavlović SZ, Maletić SD, Zikić RV, Stajn AS, Radojičić RM, Saičić ZS, Petrović VM (2003). Protective influence of vitamin E on antioxidant defense system in the blood of rats treated with cadmium. Physiol. Res. 52(5):563-570.

Seymore T (1994). Bioaccumulation of metals in Barbus marequensis from the Olifants River,Krugar National Park and lethal levels of manganese to juvenile Oreochromis mossambicus. M. Sc. Thesis. Rand. Afrikaans University, South Africa.
Tadjine A, Djerar H, Courtois A (2008). Toxicité des poussières rejetées par le complexe sidérurgique d'Annaba sur quelques paramètres hématologiques du lapin Europeus. Environ. Risque Sante. 7:3.
Takizawa Y, Osame M (2001). Understanding Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Minamata and Niigata Japan. Tokyo: Japan Public. Health. Assoc. pp. 27-32.
Van Herck H, Baumans V, Van Der Craats NR (1992). Histological changes in the orbital region after orbital puncture, Lab. Anim. 26:53-58.
Veena S, Leena K, Arti S, Shweta L, Sharma SH (2011). Ameliorating Effect of Coriandrumsativum Extracts on Hematological and Immunological Variables in an Animal Model of Lead Intoxication. J. Pharm. Allied. Health Sci. 1:16-29.
Vinodhini R, Narayanan M (2008). Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish Cyprinus carpio (Common Carp). Int. J. Environ. Sci. Technol 5(2):179-182.

**Publication 4: Protective effects of vitamin C on Haematological parameters in intoxicated wistar rats with Cadmium, Mercury and combined cadmium and mercury**

*International Research Journal of Biological Sciences* ISSN 2278-3202
Vol. 1(8), 76-81, December (2012) *Int. Res. J. Biological Sci.*

# Protective Effects of Vitamin C on Haematological Parameters in Intoxicated Wistar Rats with Cadmium, Mercury and Combined Cadmium and Mercury

**Hounkpatin A.S.Y.*[1], Johnson R.C.[1], Guédénon P.[1], Domingo E.[2], Alimba C.G.[3], Boko M.[1] and Edorh P.A.[1,4]**
[1]Interfaculty Centre of Training and Research in Environment for Sustainable Development (CIFRED), Laboratory of Toxicology and Environmental Health, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 1463, Cotonou, BENIN
[2]Department of Geography and Planning, Processing Laboratory of Geographic Information and Planning Analysis, University of Abomey-Calavi (UAC), BP 939, Porto-Novo, BENIN
[3]Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, university of Lagos, NIGERIA
[4]Departement of Biochemistry and Cellular Biology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 526, Cotonou, BENIN

**Available online at: www.isca.in**
Received 21st October 2012, revised 31th October 2012, accepted 3rd November 2012

## Abstract

*Cadmium and mercury are reported as heavy metals that induce blood disorders and immunological effects. This study was performed to determine the haematological toxicity of cadmium, mercury and evaluated the protective antioxidant role of vitamin C. For this purpose, 65 rats were divided into 13 lots of 5 animals, grouped into 2 groups of 6 lots and one control group. Two different doses of each metal and their combination were administered orally for 28 consecutive days to 6 lots of 1 group. The first two lots (A, B) respectively were exposed to cadmium chloride, two other lots (C, D) were respectively received mercury chloride and the last two lots of this group (E, F) were respectively treated with the combination of these two metals. The second group of 6 lots (Ac, Bc, Cc, Dc, Ec, Fc) respectively have received over the previous doses of metals, a daily dose of Vitamin C during the same period. The control group (G) received the same volume of distilled water. At the end of exposure, the body weight of rats was weighed and whole blood was collected by retro-orbital sinus for analysis of haematological parameters. The results of this study showed a significant decrease ($P < 0.05$) on white blood cell, red blood cell, hemoglobin concentration, mean corpuscular, hemoglobin concentration with high concentrations of mercury and the combination of high concentrations of cadmium and mercury. However, co-administration of mercury, cadmium and mercury and vitamin C had a protective effect on the potential harmful metals.*

**Keywords**: Cadmium, mercury, haematology, antioxidant, vitamin C, rat..

## Introduction

The increase in the pollution of our day is a major and global problem. This is due to the use of toxic chemicals or xenobiotic substances or by certain synthetic compounds such as heavy metallic compounds[1]. Of these compounds, heavy metals, non-biodegradable induced potential effects at low doses. Discharged by industries[2], agriculture and urban communities[3], heavy metals reach the environment. Metallic compounds on land and water pose potential health hazard not only to livestock and wild life but also to fishes, birds, mammals and even to human beings. Also did not help in the metabolism, cadmium and mercury persist in the environment and are the most toxic metals to humans[4]. They have a strong ability to accumulate in the food chain, including halieutics products such as fish[5] and also in snails[6]. This situation exposes consumers to food poisoning. In acute, cadmium as well as in chronic cytotixicity and carcinogenesis, activation of endonucleases, generation of reactive free radical such as reactive oxygen species (ROS)[7,8] and signal transduction pathways involving apoptosis play important roles[9]. Cadmium accelerates lipid peroxidation by stimulating the peroxidation chain reaction in the target organs, resulting in the generation of ROS and consequently the induction of cytotoxicity[10]. Cadmium causes anemia[11,12] and induces immunological effects[13,14]. The classic symptoms of mercury contamination are carcinogenicity and/or damage to kidney function, visual, metabolic, reproductive, immunological and neurological[15-20]. Haematological and immunological effects induced by cadmium and mercury were verified by Guédénon *et al.*[21].

Studies have shown that vitamin C supplementation has varied effects on induced toxicity[22-28]. Ascorbic acid has been found to interact with several elements in such a way as to render them less available for animals[29]. He also demonstrated the protective effect of vitamin C on the toxicity of mercury[29]. Grosicki[30] and Akhere *et al.*[31] reported a decrease in the carcass cadmium burden and the cadmium contents in the liver, kidney, testicles and muscles of cadmium exposed rats given water supplemented vitamin C for 28 days.

Within this framework we proposed to explore the protective effect of vitamin C on blood disorders in rats exposed to cadmium, mercury and their combination.

*International Research Journal of Biological Sciences* ISSN 2278-3202
Vol. 1(8), 76-81, December (2012) *Int. Res. J. Biological Sci.*

## Material and Methods

**Biological Material:** The animal material was composed of 65 male albino Wistar rats aged from 6 to 8 weeks and weighted about 108±25g. These rats obtained at the Animal Breeding Unit of the University of Lagos, Nigeria were acclimated for two weeks before the experiments. They were placed in designed sterile polypropylene cages in a room whose temperature borders 25-30°C with relative humidity of 60°C±5%. The cages were illuminated with a sequence of 12 hours with light and 12 hours into dark. Animals had free access to water and standard rodent laboratory chow (Ladokun feed Nigeria®) *ad libitum*, in the animal "Botanical and Zoological Garden" in UNILAG (University of Lagos), of Nigeria where experiments were conducted.

**Chemicals and Preparation of the Various Solutions:** The chemicals tests used for the experiment were cadmium chloride and chloride anhydrous of mercury. The powdered mercuric chloride ($HgCl_2$ = 271.50; minimum assay: 98%) and chloride cadmium ($CdCl_2$ = 183.32; minimum assay: 99%) were purchased from "General Purpose Reagent BDH Chemicals Ltd. Poolo England". Vitamin C (100 mg tablet), registered under MAFDAC REG. No. 04-1453, manufactured by 'Emzor Pharmaceutical Industries Ltd., Plot 3C Block A, was obtained "Outpatient Pharmacy Department of the Lagos University Teaching Hospital, Lagos, Nigeria" in Nigeria. The expiry date was scheduled for 02/01/2014. The vitamin C tablets not easily soluble were returned in the form of a fine powder prior to their solution was shaken vigorously before each oral administration. Concentrations were prepared for the experiment (0.25 mg/kg, 2.5 mg/kg) for cadmium chloride; (0.12 mg/kg, 1.2 mg/kg) for mercuric chloride and 150 mg/kg ascorbic acid. The different solution concentrations were based on different daily doses, the average weight of each lot and the daily volume administered to rats (1 mL).

**Distribution of rats and testing:** After two weeks of acclimatization, 65 rats were randomly divided into 13 groups of 5 pooled into 2 groups of 6 lots and one control group. Cadmium, mercury and their combination were administered by gavage (by stomach tube) for 28 consecutive days following the method of Alimba[32] and Awodele [22]. Six groups of rats received the first group daily doses of cadmium, mercury and their combination in a final volume of 1 ml of water. The first two batches (A, B) were exposed respectively to cadmium chloride (0.25 mg/kg, 2.5 mg/kg), two other batches (C, D) are respectively received mercury chloride ( 0.12 mg/kg, 1.2 mg/kg) and the last two batches of this group (E, F) were respectively treated with the combination of these two metals (0.25 mg/kg Cd + 0.12 mg/kg Hg) (2.5 mg/kg Cd +1.2 mg/kg Hg). The second group of 6 lots ($A_C$, $B_C$, $C_C$, $D_C$, $E_C$, $F_C$) have respectively received in addition to these previous doses of metals (Cd, Hg, Cd + Hg), a daily dose of 150 mg/kg vitamin C during the same period. The control group (G) received only the same volume of distilled water. These different doses of cadmium respectively correspond to a dose producing significant results: 0.25 mg/kg[33] and 10 times this concentration (2.5 mg/kg). As for mercury, 1/10 (1.2 mg/kg) and 1/100 (0.12 mg/kg) of the LD 50[34] were used.

**Blood Collection and Haematological Analysis:** After 28 days of exposure, rats were fasting overnight. They were weighed before the collection of blood and sacrifice and this to determine the final body weight. All samples were taken between 7 am and 9 am to avoid variations due to circadian rhythm. Whole blood was obtained from a puncture of the retro-orbital sinus by the conventional method[35]. This methodology is to slowly introduce the tip of the microhaematocrit (70 ml heparinized micro-capillary tubes haematocrit) in the medial angle of the eye. Progression through the tissue was facilitated by slightly turning to the pipette. The vessel wall was very fragile and when we reached the venous plexus, blood spurts and periorbital space rises by capillarity into the pipette that was put into tubes with anticoagulant for hematology. Blood samples collected in EDTA anticoagulant tubes (ethylene diamine tetra-acetic acid 8.5%) was quickly returned by mixing with anticoagulant in the tube. All blood samples were labeled and immediately conveyed to the laboratory for analysis. Haematological parameters were analyzed: white blood cell count (WBC), red blood cells (RBC), hemoglobin concentration (HGB), haematocrit (HCT), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet count (PLT) and the number of lymphocytes (LYM). All haematological parameters were analyzed in the "Haematology Unit, Lagos state University Teaching Hospital (ULTH)" using the automated method with the automatic analyzer "Haematology auto analyzer Sysmex KX-21N".

**Statistical Study:** Results are expressed as mean ± $esm^2$ of n experiments (where n represents the number of animals used). The differences between the treated and control rats were evaluated using the Students t-test p (T > t) = 0.05. The software used was Microsoft Excel 2010 and XL Stat 2011. The differences were statistically significant if the value of p was less than 0.05 and not significant if the value of p was greater than 0.05.

## Results and Discussion

Haematological parameters analyzed were: Red Blood Cell ($X10^6$/µL RBC), White blood cell ($X10^3$/µL WBC), hemoglobin concentration (HGB) (g/dL HGB), haematocrit (% HCT), Mean Corpuscular Volume (fL MCV), Mean Corpusculaire Hemoglobin (pg MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (g/dL MCHC) Platelets ($X10^3$/µL PLT) and lymphocytes (% LYM). The results are presented as mean values and standard deviation of haematological parameters in the blood of rats exposed to cadmium, mercury and cadmium and mercury combination at various concentrations and intoxicated rats treated with vitamin C in table-1.

*International Research Journal of Biological Sciences* ISSN 2278-3202
Vol. 1(8), 76-81, December (2012) *Int. Res. J. Biological Sci.*

**Table-1**
**Mean values and SD of hematological parameters of rats exposed to Cd, Hg and treated with vitamin C**

| Concentration | Parameters | control | Cd | Hg | Cd+Hg |
|---|---|---|---|---|---|
| | | G | A | C | E |
| Low | WBC | 13,95±0,21 a | 13,55±1,76 a | 10,17± 2, 32 a | 8,47±1,50* b |
| | RBC | 8,46±0,72 a | 7,45±1,76 a | 7,36±0,49 a | 7,18±0,69 a |
| | HGB | 14,40±0,35 a | 13,60±2,40 a | 13,47±1,57 a | 13,32±1,12 a |
| | HCT | 47, 450±0,07 a | 44,95±8,83 a | 46,47±5,20 a | 45,07±4,84 a |
| | MCV | 60,30±1,98 a | 61,00±2,54 a | 63,00±4,86 a | 62,87±5,15 a |
| | MCH | 18,20±0,42 a | 18,50±1,13 a | 18,25±1,40 a | 18,60±1,10 a |
| | MCHC | 31,30±0,84 a | 30,30±0,56 a | 29,00±1,07 a | 29,60±0,89 a |
| | PLT | 624,50±16,26 a | 965,00±158,39 a | 768,50±163,59 a | 742,50±94,60 a |
| | LYM | 69,60±10,46 a | 69,00±10,46 a | 69,87±11,96 a | 69,80±6,29 a |
| | | G | B | D | F |
| High | WBC | 13,95±0,21 a | 12,50±1, 20 a | 9,85±0,49* b | 8,15± 0,49* b |
| | RBC | 8,46±0,72 a | 7,78±0,66 a | 5,59±1,02* b | 5,46±0,78* b |
| | HGB | 14,40±0, 35 a | 14,47±0,96 a | 10,37±1,97* b | 9,65±0,77* b |
| | HCT | 47,450±0,07 a | 48,00±3,57 a | 37,55±8,74 a | 35,85±4,73 a |
| | MCV | 60,30±1,98 a | 61,00±1,91 a | 66,62±5,86 a | 60,50±0,72 a |
| | MCH | 18,20±0,42 a | 18,60±0,58 a | 18,52±0,48 a | 18,45±0,77 |
| | MCHC | 31,30±0,84 a | 30,20±0,29 a | 27,35±1,39* b | 27,00±0,70* b |
| | PLT | 624,50±16,26 a | 901,50±241,41 a | 822,50±378,70 a | 841,00±427,09 a |
| | LYM | 69,60±10,46 a | 71,32±11,02 a | 65,75±5,47 a | 65,30± 4,38 a |
| **Concentration** | **Parameters** | **control** | **Cd + Vit C** | **Hg + Vit C** | **Cd+Hg+ Vit C** |
| | | G | Ac | Cc | Ec |
| Low | WBC | 13,95±0,21 a | 24,40±5, 39 a | 13, 95± 2, 76 a | 14,05±5,20 a |
| | RBC | 8,46±0,72 a | 7,72±1,07 a | 7,49± 0,30 a | 7,305±0,78 a |
| | HGB | 14,40±0,35 a | 13,55±1,52 a | 13,32±0,44 a | 12,72±0,69 a |
| | HCT | 47, 450±0,07 a | 47,50±6,02 a | 43,67±0,80 a | 43, 95±3,65 a |
| | MCV | 60,30±1,98 a | 61,70±3,22 a | 58,32±1,99 a | 69,30±2,13 a |
| | MCH | 18,20±0,42 a | 17,60±0,67 a | 17,80±0,45 a | 17,50±1,27 a |
| | MCHC | 31,30±0,84 a | 28,57±1,49 a | 30,50±0,78 a | 29,02±1,38 a |
| | PLT | 624,50±16,26 a | 1078,75±180,28 a | 874,75±46,42 a | 1254,50±262,67 a |
| | LYM | 69,60±10,46 a | 54,82±14,15 a | 55,32±13,98 a | 52,30±15,39 a |
| | | G | Bc | Dc | Fc |
| High | WBC | 13,95±0,21 a | 14,75±1,93 a | 14,70±4,18 a | 10,70±2, 34 a |
| | RBC | 8,46±0,72 a | 7,45±1,26 a | 8,10±0,70 a | 8,02±0,12 a |
| | HGB | 14,40±0, 35 a | 14,17±0,35 a | 14,93±0,68 a | 14,25±0,45 a |
| | HCT | 47,450±0,07 a | 46,12±7,58 a | 47,00±3,12 a | 46,30±1,49 a |
| | MCV | 60,30±1,98 a | 61,50±1,05 a | 58,03±1,30 a | 60,30±2,13 a |
| | MCH | 18,20±0,42 a | 21,22±5,27 a | 18,46±0,65 a | 17,77±0,34 a |
| | MCHC | 31,30±0,84 a | 30,85±1,27 a | 31,80±0,72 a | 30,77±0,56 a |
| | PLT | 624,50±16,26 a | 734,00±248,17 a | 1014,33±110,18* b | 907,25±120,40* b |
| | LYM | 69,60±10,46 a | 49,35±7,86 a | 60,86±14,23 a | 57,75±9,24 a |

* The difference between the value of blood parameters of the experiment groups and that of the negative control at 0, 05. The averages followed by the same letter are not statistically different; a and b (significativity enters negative control, lots intoxicated at metals and their correspondent intoxicated and treated with vitamin C; a: not significant and b: significant)

**Interpretation of Results: Count of Red Blood Cell:** In Wistar rats, erythrocyte count has made important and significant variations ranging from 8.46±0.72 in animals of Lot G (control) to 5.59±1.02 and 5.46±0.78 in those of Lot D and F ($p < 0.05$). The red blood cell count was significantly higher (8.10±0.70 and 8.02±0.12) in rats and lots Fc Dc when compared to that of rats of Lot D and F but lower than that of rats of Lot G ($p < 0.05$).

**Count of white blood cells:** The lowest values of 9.85±0.49, 8.47±1.5, 8.15±0.49 for leukocytes was encountered respectively in rats lots D, E, F against 14.70±4.18, 14.05±5.20 and 10.70±2,34, 13.95±0.21 for animals in Dc, Ec, Fc and G ($p < 0.05$). As for platelets, the number has increased in all rats intoxicated (A, B, C, D, E, F) compared to control (G) and more increase with the application of vitamin C (Ac, Bc, Cc, Dc, Ec, Fc).

**Hemoglobin:** Hemoglobin concentration was significantly lower in rats of group D and E (10.37±1.97 and 9.65±0.77) respectively when compared to (14.40±0.35, 14.93±0.68, 14.25±0.45) than rats of lots G, Dc and Fc ($p < 0.05$).

*International Research Journal of Biological Sciences* ISSN 2278-3202
Vol. 1(8), 76-81, December (2012) *Int. Res. J. Biological Sci.*

**Haematocrit :** The haematocrit values in Wistar rats ranged from 47.45±0.07 in animals in the G (37.55±8.74 and 35.85±4.73), respectively, in those of group D and F through intermediate values (47.00±3.12 and 46.30±1.49) rats lots Dc and Fc.

**Mean corpuscular hemoglobin concentration:** The average concentrations corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were fluctuating values with the lowest (27.35±1.39 and 27.00±0.70) respectively in the rats of groups D and F compared to those of other groups ($p < 0.05$).

The results of this study found that some parameters vary widely depending on the batches of Wistar rats intoxicated with cadmium, mercury and their combination and treated with vitamin C. This is for example the case of the erythrocyte: indeed animals of lots D and F, it reached values $5.59.10^6$/uL and $5.46.10^6$/µL against $8.46.10^6$/uL animals of Lot G (control) with intermediate values in animals treated with Fc, Dc and vitamin C. The number of red blood cells obtained from animals in the D and F is very low compared to the results of Boukerche *et al.*[36], where these authors found $8.45.10^6$/uL as the number of red blood cells in healthy Wistar rats. It is likely that the high dose of mercury and the combination of high doses of cadmium and mercury do reduce the number of red blood cells causing anemia in Wistar rats intoxicated. These results have been shown by other authors[37,38] conducted on mice poisoned with lead. These authors argue that the number of red blood cells decreased. The red blood cell count not intoxicated rats (control) is stable and varies little from one subject to another. Even if this stability seems characteristic of healthy Wistar rats, the number of red blood cells obtained from rats of Lot G in this study is almost similar to $8.45.10^6$/uL obtained by Boukerche *et al.*[36] but higher value $7.1.10^6$/uL proposed Lahouel *et al.*[39].

At the rats that were addicted to high doses of mercury and the combination of high doses of cadmium and mercury treated with vitamin C, erythrocyte regeneration was remarkable in batches (Dc and Fc). Similar results were observed by Lahouel *et al.*[39] in Wistar rats intoxicated with paracetamol and treated with propolis, and by Veena *et al.*[37] in mice intoxicated with lead nitrate and treated with ethanoic extract extra coriander.

Regarding hemoglobin and haematocrit, a similar trend was obtained with the lowest levels in the rats of group D and F. The values of these haematological parameters were increased due to treatment with vitamin C. Everything seems to confirm the conclusion Friot and Calvet[40] who argue that the factors that affect the general condition of the animal such as nutritional status, fluid balance and status influence pathological haematocrit.

Regarding the white blood cells, changes were observed mainly in rats lots D and F in which the number was lower. These low values were increased in rats lots Dc and Fc treated with vitamin C would be related to the toxic action of mercury and cadmium and mercury combination can induce leucopenia and thrombocytopenia in cases of severe liver dysfunction[41].

The significant decrease in hemoglobin (10.37±1.97 and 9.65±0.77 g/dl) in rats of group D and F, associated with a decrease in MCHC (27.35±1.39 and 27.00±0.70 g/l) indicate a tendency to macrocytosis and hypochromia hematopoiesis in the liver which occurs efficiently.

This decrease in blood cells has been corrected in rats and lots Dc Fc due to the favorable action of vitamin C used as a dietary supplement. Vitamin C has antioxidant potential which was confirmed by Szeto *et al.*[42] which states that the high amount of vitamin C in pineapple comas contributes to over 30% of its potential antioxidant, which promotes its favorable action on the liver in the regulation of hematopoiesis.

This decrease in hemoglobin was also found by Bersenyi *et al.*[43] in rabbits poisoned by lead, by Sinha *et al.*[44] in mice exposed to cadmium chloride, for Ognjanović *et al.*[45] in rats exposed to cadmium chloride. This result deferred of Smaoui *et al.*[46] which exposed rats to the exhaust gas which had induced erythropoiesis by hypoxia. Mercury and the combination of high concentrations of cadmium and mercury could inhibit heme synthesis of red blood cells and cause anemia signs described by Bottomley and Muller-Eberhard[47]. These signs are offset by the beneficial effect of vitamin C. However, red blood cells are low in heme, where the decline in MCHC, already indicated by our results in rats of Lot D and F. We also found that the rate Red blood cell, White blood cell, Hemoglobin, Haematocrit, the mean corpuscular hemoglobin concentration were not statistically different in control rats (G) and those addicted and treated (lots Dc and Fc). This could be explained by the antioxidant role of vitamin C. It has the ability to capture and deactivate free radicals. According to Siess *et al.*[48], it acts by preventing the binding of free radicals on DNA by activation of detoxification and protection of the capillary walls as noticed Kawabata *et al.*[49].

Awodele *et al.*[22], reported that the administration of vitamin C (8 mg/kg) corrected some of the potential harmful rifampicin of the deoxyribonucleic acid (DNA) in mice. This is due to the small dose lower than that used in this study (150 mg/kg). Ognjanović *et al.*[45] have also shown that as our of results pretreatment with vitamin E and C showed a protective role on the toxic effects of cadmium on haematological values, lipid peroxide. Similar results were obtained by Fox *et al.*[50], which showed the protective effect of vitamin C on anemia induced by heavy metals in rats.

## Conclusion

These findings suggest that cadmium and mercury present in the environment and in particular in foodstuffs of first necessity cause of haematological disturbances in the blood. However, co-administration of (cadmium and mercury) and antioxidant (vitamin C) has protective effect hématotoxic due to cadmium and mercury. It could be concluded from the present study that vitamin C has potent antioxidant activity against cadmium and

*International Research Journal of Biological Sciences* ISSN 2278-3202
Vol. 1(8), 76-81, December (2012) *Int. Res. J. Biological Sci.*

mercury sensitive Haematological. It may then be recommended its use as a dietary supplement to rid the body of these xenobiotics that affect the health of the population. The consumption of rich foods in vitamin C is also highly recommended.

## References


1. Jagadeessan G. and Pillai S.S., Hepatoprotective Effect of Taurine against Mercury Induced Toxicity in Rat, *J. Environ. Biol.*, **28**, 753-756 (**2007**)
2. Akinyeye A.J. and Okorie T.G., Heavy Metal Studies of Industrial Effluent on Alaro Stream Sediment, *I. Res. J. Biological Sci.*, **1(6)**, 5-9 (**2012**)
3. Miquel G., Les Effets des Métaux Lourds sur l'Environnement et la Santé, Rapport d'Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Sénat (261), Assemblée Nationale (1979), Paris, France, 360p (**2001**)
4. Picot A. and Proust N., Mercury and Its Compounds: from Speciation to Toxicity, *Actualit. Chim.* **4**, 16-24 (**1998**)
5. Hounkpatin A.S.Y., Edorh P.A., Salifou S., Gnandi K., Koumolou L., Agbandji L., Aissi K.A., Gouissi M. and Boko M., Assessment of Exposure Risk to Lead and Cadmium Via Fish Consumption in the Lacusrian Village of Ganvié in Benin Republic, *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.*, **4 (1)**, 1-10 (**2012**)
6. Edorh A.P., Agonkpahoun E., Gnandi K., Guédénon P., Koumolou L., Amoussou C., Ayedoun A., Boko M., Gbeassor M., Rihn H. and Creppy E., An Assessment of the Contamination of *Achatina achatina* by Toxic Metals in Okpara Village, *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **3 (6)**, 1428 - 1436 (**2009**)
7. Nath K.A., Croatt A.J., Likely S., Berhrens T.W. and Warden D., Renal Oxidant Injury and Oxidant Response Induced by Mercury, *J. Kidney Int.*, **50**, 1032-1043 (**1996**)
8. Hultberg B., Andersson A. and Isalsson A., Alterations of Thiol Metabolism in Human Cell lines Induced by Low Amounts of Copper, Mercury, of Cadmium Ions, *Toxicol.*, **126**, 203-212 (**1998**)
9. Habeebu S.S., Liu J., Liu Y. and Klaassen C.D., Succeptibility of MT-null Mice to Chronic $CdCl_2$- Induced Nephrotoxicity Indicates that Renal Injury is not Mediated by the CdMT Complex, *Toxicol. Sci.*, **46**, 197- 203 (**1998**)
10. Oteiza P.I., Adonaylo V.N. and Keen C.L., Cadmium Induced Testes Oxidative Damage in Rats can be Influenced by Dietary Zinc Intak, *Toxicol.*, **137**, 13-22 (**1999**)
11. Horiguchi H., Anemia Induced by Cadmium Intoxication, Nihon Eiseigaku Zasshi. Japanese *J. of Hygien.* **62 (3)**, 888-904 (**2007**)
12. Kostić M.M., Ognjanović B., Dimitrijević S., Zikić R.V., ZSCtajn A., Rosić G.L. and Zivković R.V., Cadmium-Induced Changes of Antioxidant and Metabolic Status in Red Blood Cells of Rats: in vivo effects, *European J., Haematol.*, **51 (2)**, 86-92 (**1993**)
13. Blakley B.R., The Effect of Cadmium Chloride on the Immune Response in Mice, *Can. J. Comp. Med.*, **49 (1)**, 104-108 (**1985**)
14. Müller S., Gillert K.E., Krause C., Jautzke G., Gross U. and Diamantstein T., Effects of Cadmium on the Immune System of Mice, *Experientia.*, **35 (7)**, 909-910 (**1979**)
15. Mergler D., Anderson H.A., Chan L.H.M., Mahaffey K.R., Murray M., Sakamoto M. and Stern A.H., Methylmercury Exposure and Health Effects in Humans, *Worldwide Concern. Ambio.*, **36 (1)**, 3-11, (**2007**)
16. Mathiessen T., Ellingsen D.G. and Kjuus H., Neuropsychological Effects Associated with Exposure to Mercury Vapor Among Former Chloralkali Workers, *Scan. J. Work. Environ. Health.*, **25 (4)**, 342-350 (**1999**)
17. Barregard L., Thomassen Y., Schutz A., Marklund S.L., Levels of Selenium and Antioxidative Enzymes Following Occupational Exposure to Inorganic Mercury, *Sci. Total. Environ.*, **99 (1-2)**, 37-47 (**1990**)
18. Sallsten G. and Barregard L., Urinary Excretion of Mercury, Copper and Zinc in Subjects Exposed to Mercury Vapour, *Biometal.*, **10 (4)**, 357-361 (**1997**)
19. Elghany N.A., Stopford W., Bunn W.B. and Fleming L.E., Occupational Exposure to Inorganic Mercury Vapour and Reproductive Outcomes, *Occupational. Med. Oxford.*, **47 (6)**, 333-336 (**1997**)
20. Boffetta P., Merler E. and Vainio H., Carcinogenicity of Mercury and Mercury Compounds, *Scand. J. Work. Environ. Health.*, **19 (1)**, 1-7 (**1993**)
21. Guédénon P., Edorh P. A., Hounkpatin A.S.Y., Alimba C.G., Ogunkanmi A., Nwokejiegbe E.G., Degnenon Y., Gbeassor M. and Creppy E.E., Haematological Study of *Clarias gariepinus* Exposed to Chronic and Subchronic Doses of Cadmium, Mercury and Combined Cadmium and Mercury, *Sci. Nat.*, **4 (2)**, 2-19 (**2012b**)
22. Awodele O., Olayemi S.O., Alimba C.G., Egbejogu C. and Akintonwa A., Protective Effect of Vitamin C and or Vitamin E on Micronuclei Induction by Rifampicin in Mice, *Tanzania. J. Health. Res.*, **12 (2)**, 2 (**2010**)
23. Ddique S., Hasan Y., Tanveer T. and Afzal M., Antigenotoxic Effects of Ascorbic Acid against Megesterol Acetate-induced Genotoxicity in Mice, *Human. Experiment. Toxico.*, **24**, 121-127 (**2005**)
24. Liopiz N., Francesc P., Ela C., Lui A., Anna A., Cinta B. and Salvado J.M., Antigenotoxic Effect of Grape Seed Procyanidin Extract in Fao Cells Submitted to Oxidative stress, *J. Agric. and Food. Chemistry.*, **52**, 1083-1087 (**2004**)

*International Research Journal of Biological Sciences* ISSN 2278-3202
Vol. 1(8), 76-81, December (2012) *Int. Res. J. Biological Sci.*

25. Kaya B., Antigenotoxic Effect of Ascorbic Acid on Mutagenic dose of three Alkylating Agents, *Turkish. J. Biology.*, **27**, 241-246 (2003)
26. Aly F.A.E. and Donya S., *In Vivo* Antimutagenic Effect of Vitamin C and E against Rifampicin Induced Chromosome Aberration in Mouse Bone Marrow, *Mut. Res.*, **518**, 1-7 (2002)
27. Netke S.P., Roomi M.W., Tsao C. and Niedzwiecki A., Ascorbic Acid Protects Guinea pigs from Acute Aflatoxin Toxicity, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **143**, 429-435 (1997)
28. Khan P.K. and Sinha, S.P., Antimutagenic Efficacy of Higher Doses of Vitamin C, *Mut. Res.*, **298**, 157-161 (1993)
29. Hill C.H., Interactions of Vitamin C with Lead and Mercury, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **355**, 262-266 (1950)
30. Grosicki A., Influence of Vitamin C on Cadmium Absorption and Distribution in Rats, *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, **18 (2)**, 183-187 (2004)
31. Akhere A., Omonkhua F.O. and Obi P., Biochemical Evaluation of the Effects of Vitamin C in Rats Exposed to Sub-chronic Low Doses of Cadmium, *Int. J. Toxicol.*, 1559-3916 (2008)
32. Alimba C.G., Bakare A.A. and Latunji C.A., Municipal Landfill Leachates Induced Chromosome Aberrations in Rat Bone Marrow, *African. J. Biotech.*, **5**, 2053-2057 (2006)
33. Ganesh C.J. and Satish K.A., Cadmium Chloride Induces Dose Dependent Increases in the Frequency of Micronuclei in Mouse Bone Marrow, *Sci. Mut. Res.*, **306**, 85-90 (1994)
34. Bharat B.P., Atish R., Soumik A. and Shelley B., Induction of Oxidative Stress by Non-lethal Dose of Mercury in Rat Liver, Possible Relationships Between Apoptosis and Necrosis, *J. Environ. Boil.*, **31**, 413-416 (2010)
35. Boussarie D., Hématologie des Rongeurs et Lagomorphes de Compagnie, *Bull. Acad. Vét.*, **72**, 209-216 (1999)
36. Boukerche S., Aouacheri W. and Saka S., Les Effets Toxiques des Nitrates : Etude Biologique chez l'Homme et chez l'Animal, *Ann. Biol. Clin.*, **65 (4)**, 38 (2007)
37. Veena S., Leena K., Arti S., Shweta L. and Sharma S.H., Ameliorating Effect of Coriandrum sativum Extracts on Hematological and Immunological Variables in an Animal Model of Lead Intoxication, *J. Pharm. Allied. Health. Sci.*, **1**, 16-29 (2011)
38. Lavicoli I, Carelli G., Stanek E.J., Castellino N. and Calabrese E.J., Effects of Low Doses of Dietary Lead on Red Blood Cell Production in Male and Female Mice, *Toxicol. Lett.*, **137**, 193-199 (2003)
39. Lahouel M., Boulkour S., Segueni N. and Fillastre J.P., Effet Protecteur des Flavonoïdes contre la Toxicité de la Vinblastine, Cyclophosphamide et du Paracétamol par Inhibition de la Peroxydation Lipidique et Augmentation du Glutathion Hépatique, *J. pat. Bio.*, **10**, 314-322 (2004)
40. Friot D. and Calvet I.I., Biochimie et Elevage au Sénégal, *Rev. Elev. Méd. Vét.*, **20**, 75-98 (1973).
41. Lee W.M., Acetaminophen and the US Acute Liver Failure Study Group: Lowering the Risks of Hepatic Failure, *Hepatology.*, **40**, 6-9 (2004)
42. Szeto Y.T., Tomlinson B. and Benzie I.F., Total Antioxydant and Ascorbic Acid content of Fresh Fruits and Vegetables: Implications for Dietary Planning and Food Preservation, *J. Nutr.*, **87**, 55-59 (2001)
43. Bersényi A., Fekete S.G., Szocs Z. and Berta E., Effect of Ingested Heavy Metals (Cd, Pb and Hg) on Haematology and Serum Biochemistry in Rabbits, *Acta. Vet. Hung.*, **51 (3)**, 297-304 (2003)
44. Sinha M., Manna P. and Sil P.C., Taurine Protects the Antioxidant Defense System in the Erythrocytes of Cadmium Treated Mice, *B. M .B. report.*, **41 (9)**, 657-663 (2008)
45. Ognjanović B.I., Pavlović S.Z., Maletić S.D., Zikić R.V., Stajn A.S., Radojicić R.M., Saicić Z.S. and Petrović V.M., Protective Influence of Vitamin E on Antioxidant Defense System in the Blood of Rats Treated with Cadmium, *Physiol. Res.*, **52 (5)**, 563-570 (2003)
46. Smaoui M., Yhorbel F., Boujelbene M., Makni-Ayadi F. and El Féki A., Impact de l'Exposition Chronique au Gaz d'Echappement d'Origine Automobile sur certains Biomarqueurs touchant la Fonction Hormonale Sexuelle Mâle, la Fonction Rénale et l'Hémogramme chez le Rat, *Pollut. Atmosph.*, **167 (2)**, 439-449 (2000)
47. Bottomley S.S. and Muller-Eberhard V., Pathophysiology of the Heme Synthesis, *Semin. Hematol.*, **25**, 282-303 (1998)
48. Siess M.H., Le Bon A.M., Canivenc-Lavier M.C. and Susch M., Mechanisms Involved in the Chemoprevention of Flavonoids, *Biofactor.*, **12 (4)**, 193-199 (2000)
49. Kawabata T.T., Chapman M.Y., Kim D.H., Stevens W.D. and Holsapple M.P., Mechanisms of *In Vitro* Immunosuppression by Hepatocyte-generated Cyclophosphamide Metabolites and 4-Hydroxycyclophosphamide, *Biochem. Pharmacol.*, **40 (5)**, 927 (1990)
50. Fox M.R.S., Harland B.F., Schertel M.E. and Weeks C.E., Effect of Ascorbic Acid on Cadmium Toxicity in the Young Coturnix, *J. Nutr.*, **101**, 1295-1305 (1971)

## Publication 5 : Protective effects of vitamin c in kidney, liver and brain: about a study in wistar rats intoxicated with mercury

**A. S. Y. Hounkpatin [1], A. P. E. Yehouenou [2], P. Guedenon [1], C. G. Alimba [3], A. Ogunkanmi [3], V. T. Dougnon[1], M. Senou[4], M. Boko[1], C. Agbangla [5], P. A. Edorh [1, 6]**

[1] *Interfaculty Centre of Training and Research in Environment for Sustainable Development (CIFRED), Laboratory of Toxicology and Environmental Health, University of Abomey-Calavi (UAC), 01 BP 1463 Cotonou, BENIN.*

[2]*Laboratory of Applied Research in Biology (LARBA), Genie Environment Department of Polytechnic University (EPAC), University of Abomey-Calavi (UAC), 01BP 526 Cotonou, BENIN*

[3]*Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Sciences, University of Lagos, NIGERIA.*

[4]*Polytechnic School of Abomey-Calavi, Research Laboratory in Applied Biology, University of Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, BENIN.*

[5]*Laboratory of Genetics, Faculty of Sciences and Technics, University of Abomey-Calavi (UAC), 01BP 526 Cotonou, BENIN.*

[6]*Department of Biochemistry and Cellular Biology, University of Abomey-Calavi (UAC), 01BP 526 Cotonou, BENIN.*

*Corresponding author. E-mail: harmelle2007@yahoo.fr; Tel: 00 (229) 95 49 35 77/ 93 91 64 64

### Abstract

The present study was designed to investigate the effects of chronic mercury poisoning on the kidney, liver and brain and remedial possibilities of these effects by vitamin C. For this purpose, 25 rats were divided into 4 groups of 5 animals and a control group. The first two group (I; II) were exposed respectively to mercury chloride (0.12 mg/kg, 1.2 mg/kg) and the last two group (Ic; IIc) have respectively received in addition to these previous doses of mercury a daily dose of 150 mg/kg vitamin C during the same period. Mercury as well as vitamin C were administered orally for 28 consecutive days to rats. At the end of the exposure, the liver, kidneys and brain of rats were examined by histopathology. Mercury induced degeneration and necrotic alteration of the kidney, liver and brain. The results of this study suggested that mercury poisoning induced hepato-nephro-neurotic deleterious effects which were reversed by vitamin C used as a dietary supplement.

**Keywords:** Kidney, Liver, Brain, Mercury, Vitamin C, Rat.

### 1. Introduction

Mercury is a widespread environmental and industrial pollutant, which induces severe alterations of body tissues in both human and animals (Lund *et al*., 1993; Mahbood *et al.,* 2001; Sener *et al*., 2007). Mercury (fungicides, thimerosal in vaccines, and gamma-globulin) also causes renal and central nervous system toxicity and is deposited in the liver, kidneys and brain (Clarkson, 2002)**.** Chronic exposure to mercury through consumption of fish and seafood products (Suzy *et al.*, 2008) can cause adverse effects on the cardiovascular, gastrointestinal, reproductive, immune and nervous systems (Clarkson, 1997; Crinnion, 2000; Cheng *et al*., 2006; Boscolo *et al.*, 2009; Diez, 2009; Mahour and Saxena, 2009). Chronic toxicity symptoms include paresthesia, peripheral neuropathy, cerebellar ataxia, akathisia, spasticity, memory loss, dementia, constricted vision, dysarthria, impaired hearing, smell and taste, tremors, and depression (Clarkson, 2002). Mercury can induce apoptosis in affected organs (Olivieri *et al.,* 2000; Reus *et al.,* 2003; Monroe and Halvorsen, 2006; Singh *et al.,* 2007). The mercury intoxication causes nephrotoxicity and kidney damage (Nath *et al.,* 1996; Oda and El-Ashmawy, 2012). Neurologic and neurobehavioral disturbances caused by mercury compounds have gained more attention in recent decades. Some mercuric compounds can pass through placenta and blood brain barrier and affect the developing central nervous system of embryos

(Satoh and Suzuki, 1983; Suzuki *et al*., 1984; Kishi *et al*., 1994; Sakamoto *et al*., 2004). The prenatal exposure to mercuric chloride has shown teratogenic effects (Satoh and Suzuki, 1983; Yoshida, 2002). It can cause structural abnormalities in the neural tube and spinal cord of embryos in rats (Rastegar *et al.,* 2010).

Vitamine C is a very strong antioxidant compound capable of scavenging both free radicals and other reactive oxygen species (ROS) and thus it increases the antioxidant potential of cells by reversing the deleterious effects of free radical reactions (Lee *et al*., 2001). In addition, vitamin C regulates the intracellular contents of reduced glutathione (GSH) and chelates metal ions (Borsari *et al*., 2001). Studies have shown that vitamin C supplementation has varied effects on induced toxicity (Khan et Sinha, 1993; Netke *et al.,* 1997; Aly et Donya, 2002; Kaya, 2003; Liopiz *et al.*, 2004; Dique *et al.,* 2005). Ascorbic acid has been found to interact with several elements and rendered them less available for animals (Hill, 1950). The present study was carried out to investigate the adverse effect of chronic mercury intoxication on the kidneys as well as liver and brain based on histopatological alteration parameters and the probable reverse effect of vitamin C against chronic mercury intoxication in rats.

## 2. Materials and Methods

### *2.1 Biological material*

The animal material was composed of 25 male albino Wistar rats aged from 6 to 8 weeks and weighted about 108±25g. These rats obtained at the Animal Breeding Unit of the University of Lagos, Nigeria were acclimated for two weeks before the experiments. They were placed in designed sterile polypropylene cages in a room whose temperature was 25-30°C with relative humidity of 60°C±5%. The cages were illuminated with a sequence of 12 hours with light and 12 hours into dark. Animals had free access to water and standard rodent laboratory chow (Ladokun feed Nigeria®) *ad libitum,* in the animal "Botanical and Zoological Garden" in UNILAG (University of Lagos), Nigeria where experiments were conducted.

### *2.2 Chemicals and preparation of different solutions*

The chemicals tests used for the experiment is chloride anhydrous of mercury. The powdered mercuric chloride ($HgCl_2$ = 271.50; Minimum assay: 98%) is purchased from "General Purpose Reagent BDH Chemicals Ltd. Poolo England". Vitamin C (100 mg tablet), registered under MAFDAC REG. No. 04-1453, manufactured by 'Emzor Pharmaceutical Industries Ltd., Plot 3C Block A, was obtained at "Outpatient Pharmacy Department of the Lagos University Teaching Hospital" in Nigeria. The vitamin C tablets that were made were hardly soluble form of a fine powder prior to their solution was shaken vigorously before each oral administration. Concentrations were prepared for the experiment (0.12 mg/kg, 1.2 mg/kg) for mercuric chloride and 150 mg/kg ascorbic acid. The different solution concentrations were based on different daily doses, the average weight of each lot and the daily volume administered to rats (1 mL).

### *2.3 Experimental design*

After two weeks of acclimatization, 25 animals were randomly divided into 4 groups of 5 rats each and 1 control group. Mercury is administered by gavage (via stomach tube) for 28 consecutive days following the method of Alimba *et al.* (2006) and Awodele *et al.* (2010). The first two group (I; II) were exposed respectively mercury chloride (0.12 mg/kg, 1.2 mg/kg) and the last two group (Ic; IIc) have respectively received in addition to these previous doses of mercury a daily dose of 150 mg/kg vitamin C during the same period (Group I : 0.12mg/kg de Hg; Group II: 1,12mg/kg Hg ; Group Ic : 0.12 mg/kg de Hg + 150 mg/kg de vitamin C; Group

IIc : 1.2 mg/kg de mercury et 150 mg/kg de vitamin C ; Group Control : only same volume of distilled water). These different doses of mercury respectively correspond to 1/10 (1.2 mg/kg) and 1/100 (0.12 mg/kg) of the LD 50 (Bharat *et al.,* 2010) were used.

### *2.4 Histopathological analysis*

Slices of the right lobe of the liver, the left kidney and the left brain from exposed and control animals were fixed in 10% neutral buffered formalin. After 48 hours of fixation, organs were dehydrated by passing through ascending order of ethyl alcohol–water concentrations, cleared in xylene and sequentially embedded in paraffin wax blocks using rotary microtome. Tissue sections of 3–5µm thick were cut, stained with Haematoxylin–eosin (H–E), then mounted in neutral DPX medium for morphological evaluation before microscopic examination at magnification x100 and x 400 (Senou *et al*., 2009; Alimba *et al*., 2012).

## 3. Results

### 3.1 Kidney

In light microscopy, figures 1, 2, 3, 4, 5 respectively show the photos of normal kidney of Wistar rats (control group); kidney of rats poisoned with mercury (0.12 mg / kg, 1.2mg/kg) (I, II) and kidney of rats poisoned with mercury and treated with vitamin C (150 mg / Kg) (Ic, IIc).

In rats of the control group, the kidneys were normal. The collecting tubules are lined with the relatively low simple cubic epithelium. The thick descending and ascending parts of Henle loop and collecting coils of small caliber, and small amount of tissue can be seen in the cross-sections. (Fig. 1)

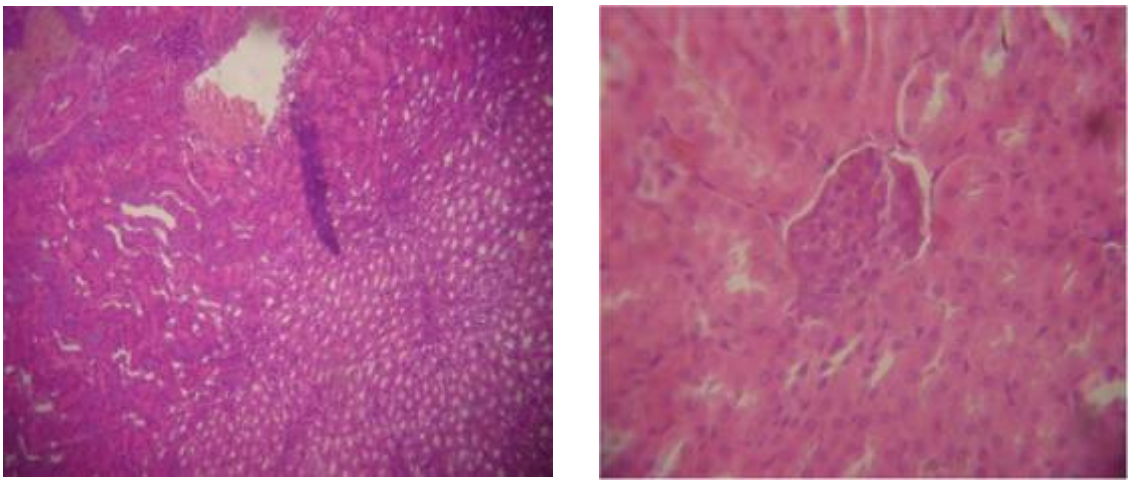


Fig.1: Normal kidney of Wistar rats. G : x100 and x400

In rats of Group I addicted to a low dose of mercury, was observed multiple foci of thinned tubules with squamous epithelium, probably a tubular regeneration (Fig. 2). Similarly in rats of group II addicted to a high dose of mercuric chloride, it was noted vacuolar changes of the tubular epithelium in the renal papillae and some are squamous (arrow) instead of cubic (Fig.3).

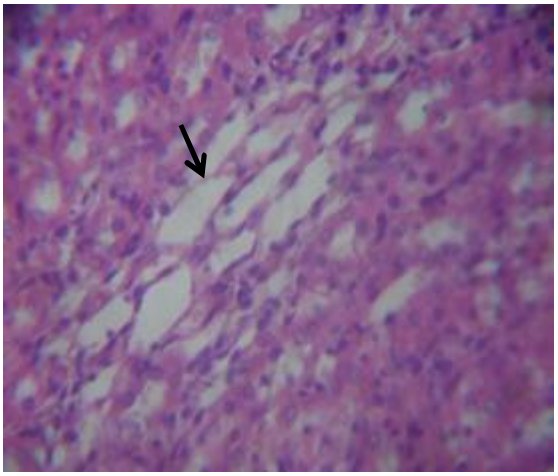


Fig.2 : Tubules amincis (flèche) G: x100

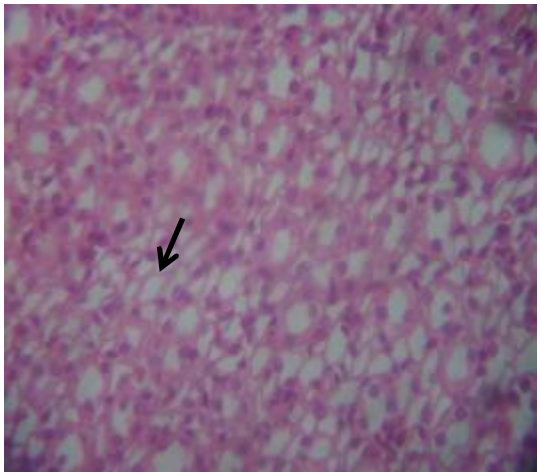


Fig.3 : Tube à épithélium pavimenteux (flèche) G: x100

In rats of group Ic addicted to low doses of mercury and treated with vitamin C, there is an absence of visible lesions (normal kidney) as in the control groups.
In rats of group IIc addicted to high doses of mercury and treated with vitamin C, there was a slight focal loss of epithelium of some tubules in the renal medulla. These tubules, however, kept the remains of their basement membranes. A slight inflammatory cells aggregation were noted in the renal interstitium (arrow). The renal medulla were also changed; the tubular epithelium going from the cubic form to cylindrical (asterisk) (Fig. 4 and 5).

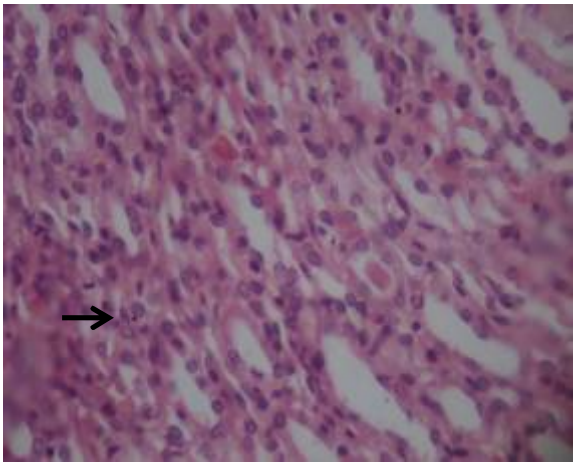


Fig.4: Inflammatory infiltrate in the renal interstitium (arrow). G: x400

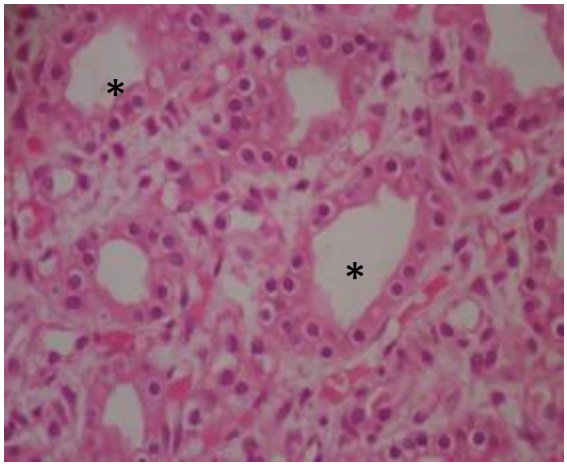


Fig.5: Columna repithelium in renal medulla (asterisk). G: x400

### 3.2 Liver

The liver of rats intoxicated is crumbly. In light microscopy, Figures 6, 7, 8,9, 10 respectively show the pictures of normal liver of Wistar rats (control group), liver of rats intoxicated with mercury (I, II) and liver of rats intoxicated and treated with Vitamin C.

The architecture of the normal liver parenchyma in control rats is marked by hepatocyte bays arranged radial around the central vein. Hepatocytes have a basophilic and large cytoplasm, one or two prominent and slightly stained nuclei (Fig.6).

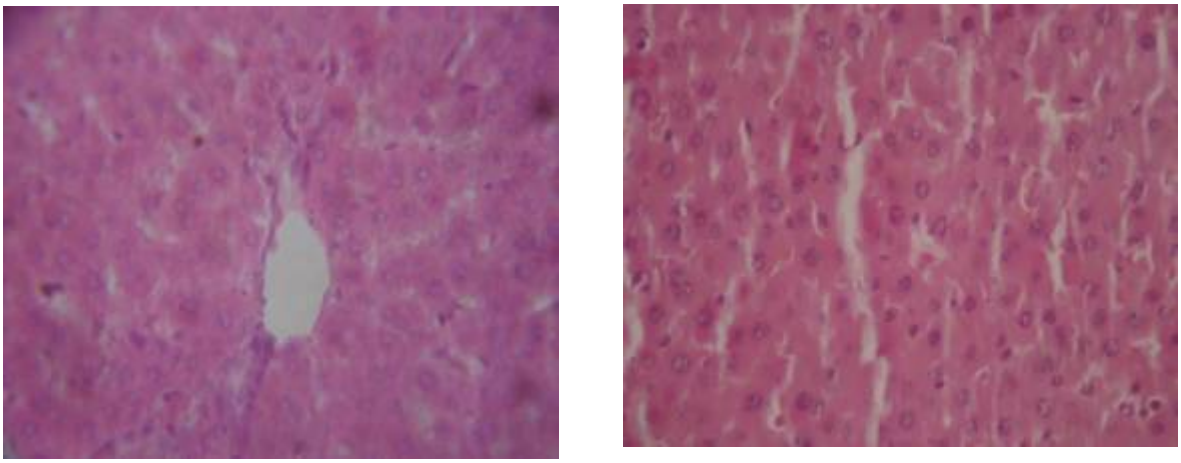


Fig.6: Morphology of normal Wistar rat liver (lot G). G: x400

In Group I rats, addicted to the low dose of mercury, rare isolated necrotic hepatocytes were found. Among these, phantom cells (arrows) and pyknotic nuclei (arrowheads) were identified (Fig.7). In group II rats addicted to a high dose of mercury, a moderate hyperplasia of Küpffer cells were (arrows) (Fig.8).

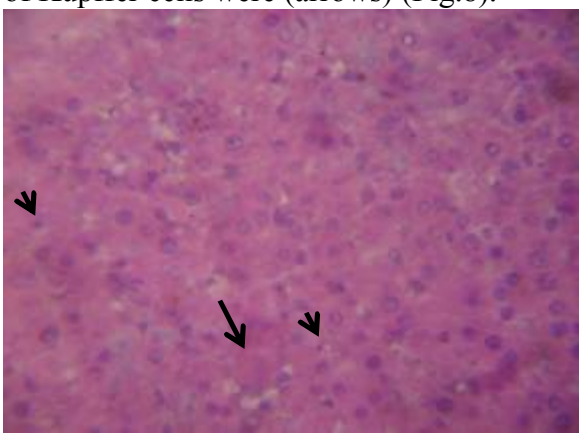


Fig.7: Necrotic hepatocytes, phantom cells (arrow) and pyknotic nuclei (arrowheads) G: x400

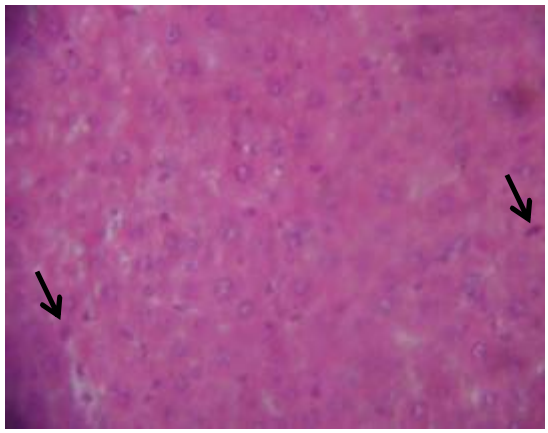


Fig.8: Hyperplasia of Kupffer cells (arrows) G: x400

In rats of group Ic, addicted to low doses of mercury and treated with vitamin C, there was a slight vacuolar changes in periportal hepatocytes and Kupffer cells contain varying amounts of black pigments in their cytoplasm (Fig. 9). In rats of group IIc addicted to high doses of mercury and treated with vitamin C, it has been noticed a moderate congestion of the hepatic veins (Fig. 10).

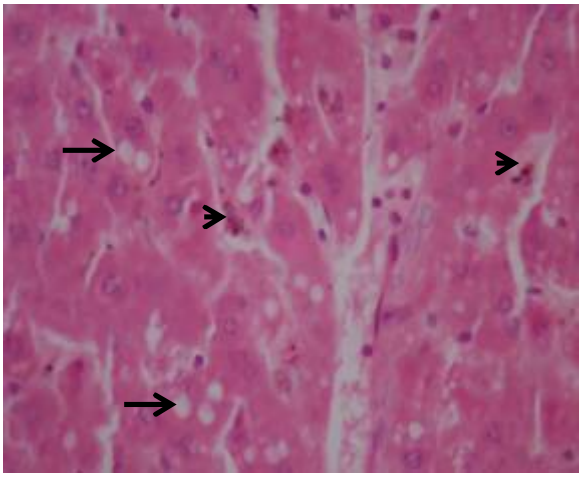


**Fig.9:** Slight change vacuolar (arrows) of periportal hepatocytes. Kupffer cells with pigments black (arrowheads). G: x400

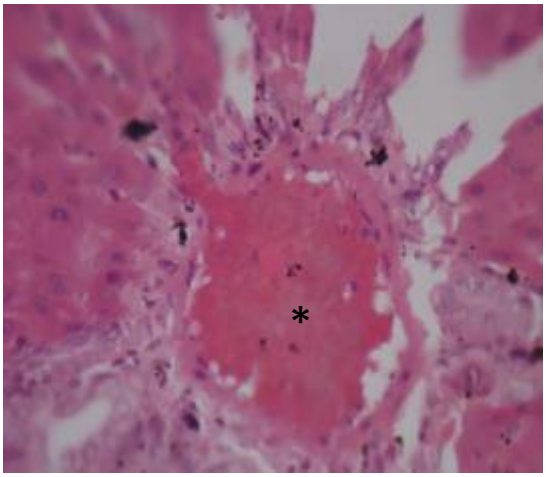


**Fig.10:** Slight congestion of the hepatic veins (asterisk) G: x400

### 3.3 Brain

Light microscopy, Figures 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, respectively, show the photos of normal brain of Wistar rats (control group); the brain of rats intoxicated with mercuric chloride (0.12 mg / kg, 1.2mg/kg) (I, II) and brain of rats poisoned and treated with vitamin C (150mg/kg) (Ic, IIc).
In control rats, there was an absence of visible lesions of the brain (Fig.11).

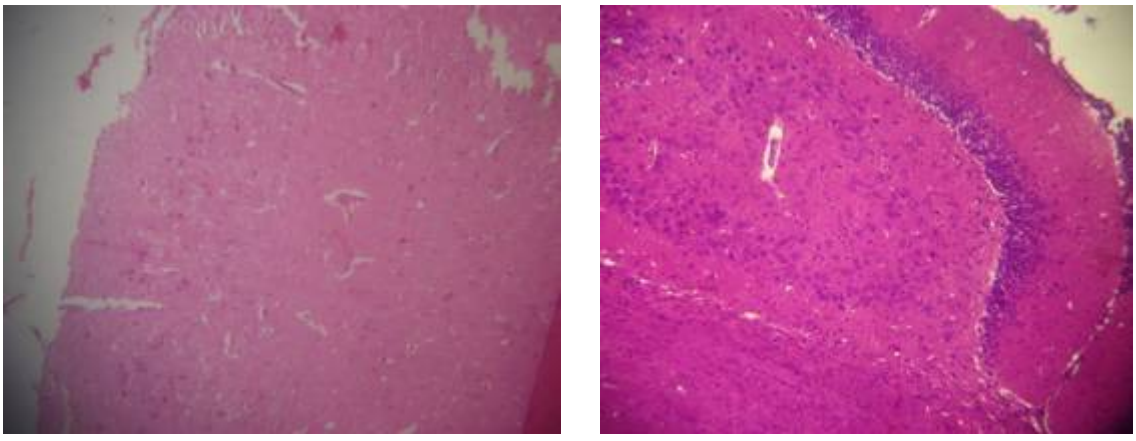


Fig.11: Morphologically normal brain of Wistar rats (control) G: x100

Rats in Group I, addicted to low dose of mercuric chloride, it was observed acute focal necrosis of neurons with pyknosis (arrow), the presence of ghost cells (arrowheads) and a proliferation of astrocytes. It was also noted multiple small foci of gliosis (Fig. 12 and 13).

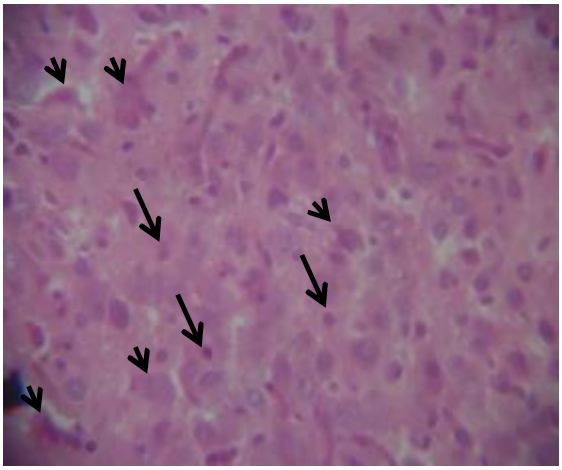


Fig.12: Focal acute neuronal necrosis with pyknosis (arrow), ghost cells (arrowhead) and astrocytic proliferation. G: x400

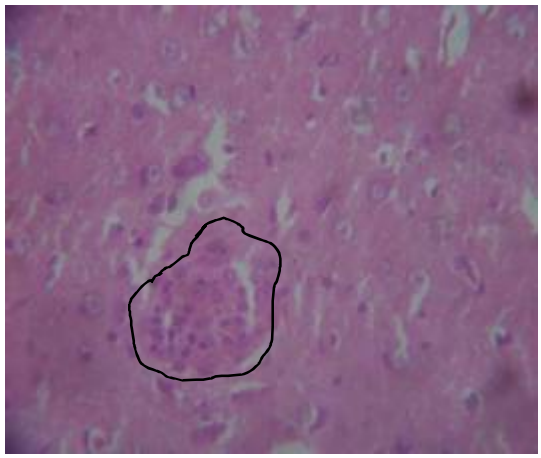


Fig.13: Foci of gliosis (circled area). G: x400

In group II rats addicted to high dose of mercury, it was observed a moderate astrocytic gliosis centers (circled area) at the base of the brain (Fig. 14).

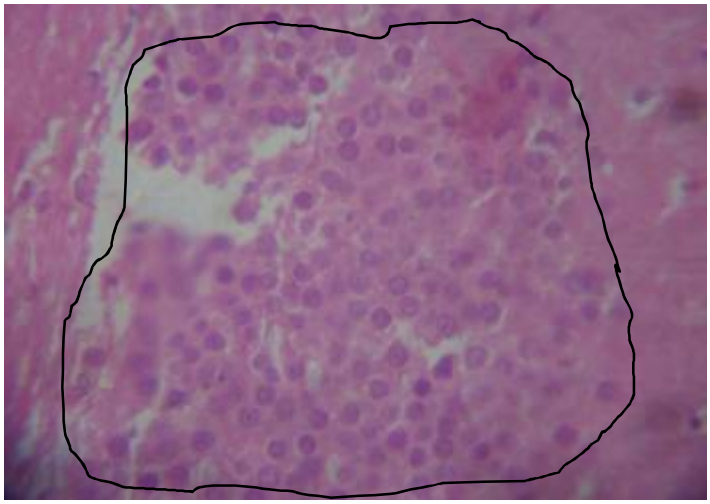


Fig.14: Center astrocytic gliosis (circled area) G: x400

In group Ic rats intoxicated with low dose mercury and treated with vitamin C, it was noted an absence of visible injury in some rats, a moderate neuronal focal necrosis, gliosis, and a marked vascular congestion in others (Fig. 15 and 16).

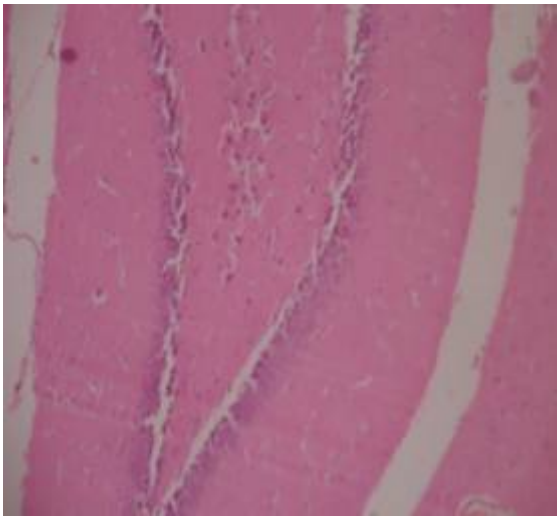


Fig.15: No visible injury. G: x100

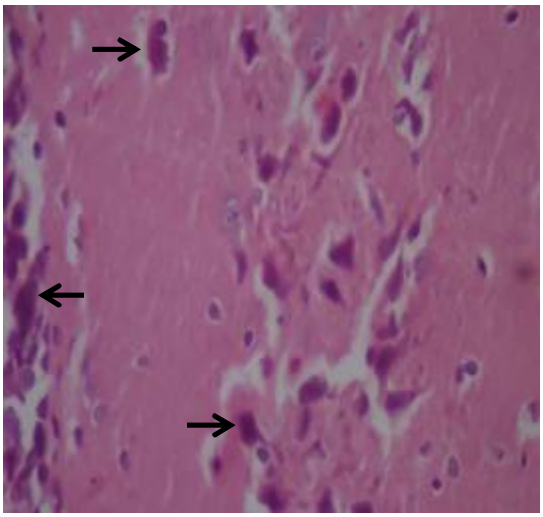


Fig.16: neuronal necrosis (arrow) gliosis and vascular congestion. G: x400

In group IIc rats intoxicated with high dose of mercury and treated with vitamin C, it was found no visible lesions in anyone of them (Fig. 17).

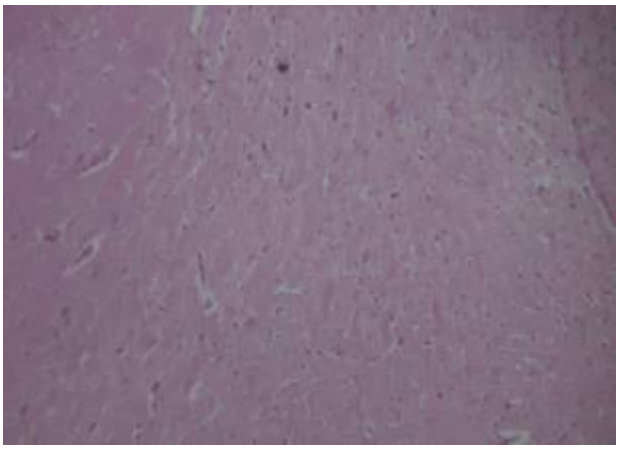


Fig.17: No visible injury G: x100

**Table 1: Comparison of histopathology results between Groups of rats intoxicated with mercury, and those intoxicated and treated with vitamin C.**

| | Groups | organs / Treatment | Liver | Kidney | Brain |
|---|---|---|---|---|---|
| | Control | Distilled water | - | - | - |
| Mercury (Hg) | I | 0.12mg/kg Hg | + | ++ | ++ |
| | Ic | 0.12mg/kg Hg + 150 mg/kg Vit.C | + /- | - | + |
| | II | 1.2mg/kg Hg | + | ++ | + |
| | IIc | 1.2mg/kg Hg + 150 mg/kg Vit.C | + /- | + /- | - |

++ : marked histopathological lesion;

+ : moderate histopathological lesion;
+/- : Barely visible lesion;
- : no visible lesion.

**Discussion**

The present study investigated the protective effect of vitamin C on liver, kidney and brain in rats poisoned with mercury. Hematein-eosin staining was used to assess the damage caused by mercury kidneys, liver, brain and compensation obtained through the use of vitamin C. This technique was used by Gabe (1968) and Senou (2009) to stain structures of damaged organs. Kidney is the first target organ of accumulation and toxicity of inorganic mercury (Zalups, 2000). In fact, in a very short time (1 hour), 50% of an administered dose of inorganic mercury is present in the kidney (Zalups, 1993). In this organ, the majority of mercuric ions were detected in outer stripe of the outer medulla. Our histopathological findings on kidney tissue after chronic mercury introxication indicate the presence of multiple foci of thinned tubules with squamous epithelium (low dose) and vacuolar changes of the tubular epithelium in renal papillae and some are squamous (high dose). Interaction of mercury with protein sulfhydryl groups is thought to play an important role in nephrotoxicity induced by mercury at cellular level (Zalups, 2000). The results obtained in rats intoxicated with low doses of mercury and treated with vitamin C shows no visible lesion (kidney seem normal) in rats of group Ic. In group IIc rats, addicted to high doses of mercury and treated with vitamin C, were observed a slight focal loss of some tubule epithelium in the renal medulla and a small cluster of inflammatory cells in the renal interstitium. These results compared to the first shows that vitamin C used reduce the severity of intoxication caused by renal mercury in Wistar rats. This beneficial effect of vitamin C was also demonstrated by (Akhere *et al.,* 2008) on renal cadmium poisoning.

In the liver, chronic mercury poisoning caused histopathological changes such as presence of rare isolated necrotic hepatocytes. With the high dose of mercury was observed, moderate hyperplasia of Kupffer cells. Similar changes have also been reported by Al-Saleh *et al.,* 2005; Jadhav *et al.,* 2007; Wadaan, 2009 and Agarwal *et al.,* 2010; Oda and El-Ashmawy, 2012, in liver tissue after exposure to mercury. In rats of group Ic and IIc intoxicated and treated with vitamin C, it was observed a slight vacuolar modification of periportal hepatocytes and a moderate congestion of the hepatic veins. The comparison of these results shows the protective role played by vitamin C used as a dietary supplement. Such liver improvement was obtained by Dougnon *et al.* (2006) after paracetamol poisoning and corrected with fresh pineapple juice.

The cerebral cortex is the key structures of memory formation. It also integrates higher mental functions, general movement, visceral functions, and behavioral reactions. (Cauller, 1995). Very significant structure, the brain is very sensitive and vulnerable to the devastating effects of many environmental component, biological factors and dietary exposure to heavy metals such as mercury (Schettler, 2001). Neurotoxic effects of mercury are shown *in vitro* and *in vivo* in humans and animals. Previous research has shown the effects of mercury poisoning on behavioral, neurological and psychological functions. Mercury components can induce cerebellar degeneration, sensorimotor and gating disturbances, tremor, ataxia, and depression (Diez, 2009; Nahavadi and Shahbazi, 2010). The results of the present study show an acute focal necrosis with pyknosis of neuron nuclei, the presence of ghost cells and proliferation of astrocytes, the presence of multiple small foci of gliosis in rats addicted to low doses of mercury. There is also a center of moderate astrocytic gliosis at the base of the brain of rats

poisoned with a large dose of mercury. These results are similar to those obtained by Eto (1997), which showed the appearance of an acute cerebral edema with focal necrosis of neurons and their replacement by glial cells after mercury intoxication. In rats of group Ic and IIc mercury poisoning treated with vitamin C, it was noted as in the control a lack of visible injury in some rats and a moderate neuronal focal necrosis, gliosis, as well as vascular congestion in others. The comparison of these results with those of intoxicated groups shows the protective effect of vitamin C on the neurotoxicity of mercury. As these findings, other studies have shown that vitamin C supplementation has varied effects on induced toxicity (Khan et Sinha, 1993; Netke *et al.,* 1997; Aly et Donya, 2002; Kaya, 2003; Liopiz *et al.*, 2004; Dique *et al.,* 2005 Awodele *et al,* 2010). Ascorbic acid has been found to interact with several elements in such a way to render them less available for animal cells (Hill, 1950). The protective effect of vitamin C against toxicity of mercury has also been demonstrated (Hill, 1950). Considering that oxidative stress and mercury toxicity, it has been suggested that antioxidants could contribute to the treatment of mercury poisoning (Patrick, 2002, Pillai, 2005). Vitamin C is a very strong antioxidant compound capable of scavenging both free radicals and thus it increases the antioxidant potential of cells by improving the deleterious effects of free radical reactions (Flora *et al*., 2008). Vitamin C supplementation regulates the intracellular contents of the reduced glutathione (GSH) and chelates metal ions (Borsari *et al.,* 2001; Flora *et al.,* 2008).

## Conclusion

This study demonstrated the detrimental effects of mercury which induced chronic toxicity on the kidney, liver and Brain. Vitamin C supplementation, improve mercury-induced nephrotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity and protected the kidney, the liver and the brain against mercury intoxication in male albino rats.

## References

Agarwal, A.S., Goel R., & Beharia J. (2010). Detoxification and antioxidant effects of curcumin in rats experimentally exposed to mercury. *Journal of Applied Toxicology*, 30: 457-468.

Akhere, A., Omonkhua, F.O. & Obi, P. (2008). Biochemical evaluation of the effects of vitamin C in rats exposed to sub-chronic low doses of cadmium. *International journal of Toxicology,* 1559-3916.

Alimba, C.G., Bakare, A.A., & Latunji, C.A. (2006). Municipal landfill leachates induced chromosome aberrations in rat bone marrow. *African J. Biotech*. 5:2053-2057.

Alimba, C.G., Bakare, A.A. & Aina O.O. (2012). Liver and Kidney Dysfunction in Wistar Rats Exposed to Municipal Landfill Leachate. *Scientific and Academic Publishing,*2(4):150-163.

Al-Saleh, I., El-Doush, I., Shinwari N. & Al-Baradei, R. (2005). Does low mercury containing skin lightening cream (Fair and Lovely) affect the kidney, liver and brain of female mice? *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 24: 11-29.

Aly, F.A.E., & Donya, S. (2002). *In vivo* antimutagenic effect of vitamin C and E against rifampicin induced chromosome aberration in mouse bone marrow. *Mutant Research* 518: 1-7.

Awodele, O., Olayemi, S.O., Alimba, C.G., Egbejogu, C. & Akintonwa, A. (2010). Protective effect of vitamin C and or vitamin E on micronuclei induction by rifampicin in mice. *Tanzania Journal Health. Reach*, 12:2.

Borsari, M., Gabbi, C., Ghelfi, F., Grandi, R., Saladini, M., Severi S., & Borella, F. (2001). Silybin, a new iron-chelating agent. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85: 123-129.

Bharat, B.P., Atish, R., Soumik, A. & Shelley, B. (2010). Induction of oxidative stress by non-lethal dose of mercury in rat liver: Possible relationships between apoptosis and necrosis. *J. Environ. Boil.,* 31:413-416.

Boscolo, M., Antonucci, S., Volpe, A.R., Carmignani, M. & Di-Gioacchino, M. (2009). Acute mercury intoxication and use of chelating agents. *J Biol Regul Homeost Agents,* 23:217-223.

Cauller, L. (1995). Layer I of primary sensory neocortex: where top-down converges upon bottom-up. *Behav Brain Res.*, 71(1-2):163-70.

Cheng, J.P., Min, Z., Wei, S. & Xue-Yu, L. (2006). Expression of c-fos in Rat Brain as a Prelude Marker of Central Nervous System Injury in Response to Methylmercury-stimulation, Biomedical and Environmental Sciences 19:67-72.

Clarkson, T.W. (1997). The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 34: 369-403.

Clarkson, T. W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environ. Health. Perspect*., 110 (1): 11-23.

Crinnion, W. (2000). Environmental medicine, part three: long-term effects of chronic low-dose mercury. *Altern Med Rev*, 5:209-223.

Ddique, S., Hasan, Y., Tanveer, T. & Afzal, M. (2005). Antigenotoxic effects of ascorbic acid against megesterol acetate-induced genotoxicity in mice. *Human and Experimental Toxicology* 24:121-127.

Diez, S. (2009). Human health effects of methylmercury exposure. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.,* 198:111-132.

Dougnon T. J., Kpodekon T. M., Laleye A., Adjagba M. & Darboux B. R. (2006). Effets de *Ananas Comus,* (Variété « Pain de sucre ») sur les lésions hépatiques dues à l'intoxication au paracétamol chez les rats Wistar. *Journal de la Société de Biologie Clinique* 10: 47-50.

Eto K. (1997). Pathology of Minamata disease. *Toxicol. Pathol*. 25: 614-623.

Flora, S.J.S., Megha, M. & Ashish, M. (2008). Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128:501-523.

Gabe, M. (1968). Techniques histologiques. *Editions Masson et Cie*. Paris-France. p435.

Hill, C.H. (1980). Interactions of vitamin C with lead and mercury. *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 355: 262-266.

Jadhac, S.H., Sarkar, S.N., Patil, R.D. & Tripathi, H.C. (2007). Effect of subchronic exposure via drinking water to a mixture of eight water-contaminating metals: A biochemical and histopathological study in male rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*., 53:667-677.

Kaya, B. (2003) Antigenotoxic effect of Ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turkish Journal of Biology* 27, 241-246.

Khan, P.K. & Sinha, S.P. (1993). Antimutagenic efficacy of higher doses of vitamin C. *Mutant Research,* 298:157-161.

Kishi, R., Doi R., Fukuchi, Y., Satoh H., Satoh, T., Ono, A., Moriwaka, F., Tashiro, K., Takahata, N., & Sasatani, H. (1994). Residual neurobehavioural effects associated with chronic exposure to mercury vapour. *Occup. Environ. Med.,* 51:35-41.

Lee, S.H., Oe, T. & Blair, I.A. (2001). Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*, 292 :2083-2086.

Liopiz, N., Francesc, P., Ela, C., Lluis, A., Anna, A., Cinta, B. & Salvado, J.M. (2004) Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *Journal of .Agriculture and Food Chemistry* 52, 1083-1087

Lund, B.O., Miller, D.M. & Wods, J.S. (1993). Studies on Hg (II)-induced $H_2O_2$ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol*., 45 : 2017-2024.

Mahboob, M., Shireen, K.F., Atkinson, A. & Khan, A.T. (2001). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity indifferent organs of mice exposed to low level of mercury. *Journal of Environmental Science and Health B*., 36: 687-697.

Mahour, K. & Saxena, P.N. (2009). Assessment of haematotoxic potential of mercuric chloride in rat. *J. Environ. Biol.*, 30:927-928.

Monroe, R.K. & Halvorsen, S.W. (2006). Mercury abolishes neurotrophic factor-stimulated Jak-STAT signaling in nerve cells by oxidative stress. *Toxicol. Sci.*, 94:129-138.

Nahavadi, A. & Shahbazi, A. (2010). Nitric Oxide is Protective Against Mercury Induced Depression. *Basic. Clin. Neurosc.,* 1:56-60.

Nath, K.A., Croatt, A.J., Likely, S., Behrens, T.W., Warden, D. (1996). Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *J. Kidney. Int.*50:1032-1043.

Netke, S.P., Roomi, M.W., Tsao C. & Niedzwiecki A. (1997). Ascorbic acid protects guinea pigs from acute aflatoxin toxicity. *Toxicol. Appl. Pharm*., 143:429-435.

Oda-Samah, S. & El-Ashmawy I.M. (2012). Protective Effect of Silymarin on Mercury-Induced Acute Nephro-Hepatotoxicity in Rats. *Global Veterinaria,* 9 (4):376-383.

Oliveira, C., Lopasso, F.P., Laurindo, F., Leitao, R.M. & Laundanna, A.A. (2001). Protection against liver ischemia-reperfusion injury in rats by silymarin or verapamil. Transplantation Proceedings, 33: 3010-3014.

Patrick, L., (2002). Mercury toxicity and antioxidants. Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Alternative Medicine Review*, 7:456-471.

Pillai, A., Gupta, S. (2005). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats co-exposed to lead and cadmium: effect of vitamin E and $Mn^{2+}$. *Free Radical Research*, 39:707-712.

Rastegar, T., Nobakht, M., Mehdizadeh, M., Shahbazi, A. (2010). Mercuric Chloride Induced Cell Death in Spinal Cord of Embryo in Rat. *Basic. Clin. Neurosc.,*1:47-51.

Reus, I.S., Bando, I., Andres, D. & Cascales, M. (2003). Relationship between expression of HSP70 and metallothioneins and oxidative stress during mercuric chloride induced acute liver injury in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17:161-168.

Sakamoto, M., Kubota, M., Liu, X.J., Murata, K., Nakai, K., Satoh, H. (2004). Maternal and fetal mercury and n-3 polyunsaturated fatty acids as a risk and beneft of fsh consumption to fetus. *Environ. Sci. Technol.,* 38:3860-3863.

Satoh, H. (2003). Behavioral teratology of mercury and its com-pounds. *Tohoku. J. Exp. Med.*, 201:1-9.

Satoh, H., Suzuki, T., (1983). Embryonic and fetal death after in utero methylmercury exposure and resultant organ mer-cury concentrations in mice. *Ind. Health*., 21:19-24.

Schettler T. (2001). Toxic threats to neurologic development of children. *Environ. Health. Perspect. 109 Suppl.,* 6:813-816.

Sener, G., Sehirli, A.O. & Ayanoglu-Dulger, G., (2003). Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Pharmacology and Toxicology*, 93:290-296.

Senou M., Costa M. J. , Khalifa C., Many M-C., (2009). Role of caveolin-1 in thyroid phenotype, cell homeostasis, and hormone synthesis: in vivo study of caveolin-1 knockout mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 297: 438 – 451.

Singh, V., Joshi, D., Shrivastava, S., Shukla, S. (2007). Effect of monothiol along with antioxidant against mercury-induced oxidative stress in rat. *Indian. J. Exp. Biol.* 45:1037-1044.

Suzuki, T., Yonemoto, J., Satoh, H., Naganuma, A., Imura, N. & Kigawa, T. (1984). Normal organic and inorganic mercury levels in the human feto-placental system. *J. Appl. Toxicol.* 4:249-252.

Suzy L. W., Ellen J. & Lye D. (2008) Statistique Canada n° 82-000 XPF au catalogue. Rapport sur la santé, 19(4): 31-37.

Wadaam, A. & Mohammad, M. (2009). Effects of mercury exposue on blood chemistry and liver histopathology of male rats. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4(3):126-131.

Yoshida, M. (2002). Placental to fetal transfer of mercury and fetotoxicity. *Tohoku. J. Exp. Med.,* 196:79-88.

Zalups, R.K., (1993). Early aspects of the intrarenal distribution of mercury after the intravenous administration of mercuric chloride. *Toxicology,* 79:215-228.

Zalups, R.K. (2000). Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacological Reviews*, 52:113-143.

# ANNEXES I: POSTER

# Pollution des écosystèmes aquatiques par les métaux toxiques (Pb et Cd) : cas de la cité lacustre de Ganvié (Bénin)

**HOUNKPATIN Armelle S.Y., EDORH Patrick A., BOKO Michel**

## Introduction

L'environnement est fortement contaminé par de nombreux produits chimiques dont les métaux lourds rejetés par les industries, l'agriculture et les communautés urbaines (Miquel, 2001). Le Bénin n'est pas exempt de ce fléau (ABE/MEHU, 1998). Les écosystèmes aquatiques, sous forte influence anthropique, sont atteints par cette contamination. En effet, le rejet des ordures ménagères et résidus de tout genre, le trafic des produits pétroliers par les pirogues, l'utilisation des barques motorisées, les rejets des collecteurs d'évacuation d'eaux pluviales en provenance de la ville de Cotonou, les apports du fleuve Ouémé sont entre autres les sources d'une contamination poussée de la cité lacustre de Ganvié (Fig.1) par les métaux lourds. Ces métaux présentent ainsi un risque potentiel pour cet écosystème aquatique dont le degré de contamination par les métaux toxiques (Plomb et Cadmium) a été évalué au cours de cette étude.




## Méthodologie

La cité lacustre de Ganvié a servi de cadre d'étude (Fig.2). Des échantillons d'eau, de sédiments de poissons et de crevettes ont été prélevés à cet effet. Ils ont subi les traitements nécessaires par minéralisation, avant leur analyse par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA) (Fig.3) au Laboratoire GTVD de l'Université de Lomé.

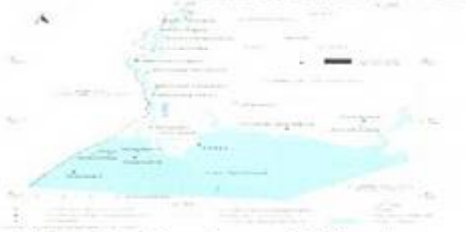


Fig.2: Cadre d'étude

## Résultats et Discussion

Les teneurs moyennes en Pb (0,56mg/L) et en Cd (0,03 mg/L) enregistrées dans l'eau de Ganvié sont significativement plus élevées que les normes fixées par GESAMP (Pb : 0,0004 mg/L et Cd : 0,00021 mg/L) ($p<0,05$). En comparaison avec d'autres travaux, nos résultats diffèrent de ceux trouvés par Agonkpahoun en 2006 (Pb : 0,043 mg/L ; Cd : 0,0043 mg/L) dans la rivière Okpara. Les teneurs moyennes en Pb (54,04 mg/kg) et en Cd (0,74 mg/kg) enregistrées dans les sédiments à Ganvié sont significativement plus élevées que celles obtenues dans l'eau (Pb: 0,56 mg/kg; Cd: 0,03 mg/kg) du même lac ($p<0,05$). Dans les poissons et crustacés (Fig. 4), les teneurs moyennes des métaux étudiés (Pb : 26,80 mg/kg ; Cd : 2,03 mg/kg) sont supérieures à la norme CE 466/2001 (Pb: 0,2 mg/kg; Cd: 0,01 mg/kg). Ces teneurs sont considérablement plus élevées que celles obtenues dans l'eau (Pb : 0,56 mg/kg; Cd : 0,02 mg/kg). Ceci indique ainsi le phénomène de bioaccumulation (Ademoroti, 1996). L'espèce *Penaeus Kerathurus* a accumulé la même teneur en plomb (29,52 mg/kg) que *Chysichthys auratus ;* mais *Liza falcipinnis* avec sa forte teneur en plomb (31,7 mg/kg), se révèle être l'espèce la plus accumulatrice de plomb. Cette large capacité d'accumulation de métaux lourds observée chez certaines espèces en particulier les espèces de fond a été rapportée par Nicolas *et al.*, en 1987.



Fig.3:Spectrophotomètre SAA



Fig.4. Produits halieutiques utilisés

## Conclusion

L'eau, les sédiments de Ganvié sont pollués par le plomb et le cadmium. Toutes les différentes espèces de poissons et crustacés ont accumulé de fortes teneurs de plomb et de cadmium. Une évaluation suivie d'une prévention des risques et d'une surveillance régulière de l'état de la pollution s'avèrent nécessaires afin de concilier la protection de l'environnement et le développement humain durable.

## Personne contact

HOUNKPATIN Armelle, 02 BP 351 Cotonou, Tél. 00 229 95 49 35 77, Mail. harmelle2007@yahoo.fr

## Remerciements

Hommages spéciaux aux Professeurs **Michel BOKO**, Directeur de l'Ecole Doctorale Pluridisciplinaire (EDP) de la FLASH, Professeur Titulaire; **Salifou SAHIDOU**, Maître de Conférences; **Kissao GNANDI**, Maître de Conférences; au Docteur **Julien SEGBO**, Professeur assistant. Merci infiniment à **Monsieur Joël KOUASSI** et aux Doctorants **Gratien BONI, Patient GUEDENON, Luc KOUMOLOU, Victorien DOUGNON, Sabine MONTCHO, Alain AISSI** pour leurs divers apports scientifiques. Ces travaux n'auraient pu se faire sans l'appui appréciable du **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS).**

## Pour en savoir plus

1- **Hounkpatin A. S., Edorh A. P.**, Sézonlin M., Guédénon P., Elégbédé B., Boni G., Dougnon V., Montcho S., Kéké E., **Boko M.** 2012. Pollution of aquatic ecosystems by heavy metals at Ganvié's lacustrine city (Benin). Int. Res. J. Biotechnol., 3 (2): xxx-xxx. (Revue indexée, http://www.interesjournals.org/IRJO(8).

2- **HOUNKPATIN Armelle S. Y., EDORH A. Patrick**, SALIFOU Sahidou, GNANDI Kissao, KOUMOLOU Luc, AGBANDJI Lucien, AISSI K. Alain, **BOKO Michel.** 2012. Assessment of exposure risk to lead and cadmium via fish consumption in the lacustrian village of Ganvié in Benin Republic. J. Environ. Chem. Ecotoxicol., 4 (1): 1-10. (Revue indexée, http://www.academicjournals.org/jece).

# ANNEXES II: TABLEAUX

**Tableau I: Concentrations en mg/L du Pb et du Cd dans les échantillons d'eau**

| | Pb | Cd |
|---|---|---|
| E1 | 0,62 | - |
| E2 | 0,34 | 0,04 |
| E3 | 0,71 | - |
| E4 | 0,52 | 0,03 |
| E5 | 0,84 | 0,04 |
| E6 | 0,68 | 0,04 |
| E7 | 0,33 | 0,04 |
| E8 | 0,52 | 0,07 |
| E9 | 0,89 | 0,02 |
| E10 | 0,2 | - |
| Moyenne | 0,56 | 0,03 |
| Ecart type | 0,23 | 0,02 |

***Source :*** Travaux de terrain

E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 et E10 représentent les échantillons d'eau prélevés.

**Tableau II: Concentration (mg/kg) du Pb et du Cd dans les échantillons de sédiments**

| | Pb | Cd |
|---|---|---|
| S1 | 22,1 | 0,12 |
| S2 | 50,61 | 0,67 |
| S3 | 67,4 | - |
| S4 | 42,62 | 0,81 |
| S5 | 57,3 | - |
| S6 | 19,74 | 0,71 |
| S7 | 31,84 | 0,97 |
| S8 | 43,16 | 1,34 |
| S9 | 61,91 | 0,98 |
| S10 | 143,79 | 1,82 |
| Moyenne | 54,04 | 0,74 |
| Ecart type | 35,37 | 0,59 |

***Source :*** Travaux de terrain

S1, S2, S3, S4, S5 S6, S7, S8, S9 et S10 représentent les échantillons de sédiments prélevés.

**Tableau III: Comparaison des teneurs moyennes (mg/kg) en métaux lourds dans les 30 échantillons de poissons étudiés**

| | Pb | Cd |
|---|---|---|
| Chrysichthys auratus1 | 29,78 | 1,89 |
| Chrysichthys auratus2 | 39,62 | 2,77 |
| Chrysichthys auratus3 | 15,28 | 3,70 |
| Chrysichthys auratus4 | 28,31 | 2,09 |
| Chrysichthys auratus5 | 14,43 | 3,48 |
| Chrysichthys auratus6 | 42,97 | 1,57 |
| Ethmalosa fimbriata 1 | 14,12 | 0,21 |
| Ethmalosa fimbriata 2 | 31,87 | 2,60 |
| Ethmalosa fimbriata 3 | 63,98 | 1,84 |
| Ethmalosa fimbriata 4 | 8,40 | 3,60 |
| Ethmalosa fimbriata 5 | 16,50 | 2,33 |
| Ethmalosa fimbriata 6 | 17,89 | 2,12 |
| Sarotherodon melanotheron1 | 22,15 | 3,56 |
| Sarotherodon melanotheron2 | 27,82 | 2,15 |
| Sarotherodon melanotheron3 | 12,43 | 2,84 |
| Sarotherodon melanotheron4 | 30,34 | 3,31 |
| Sarotherodon melanotheron5 | 12,37 | 3,51 |
| Sarotherodon melanotheron6 | 9,99 | 2,40 |
| Liza falcipinnis 1 | 20,86 | 3,18 |
| Liza falcipinnis 2 | 40,50 | 1,92 |
| Liza falcipinnis 3 | 38,46 | 2,90 |
| Liza falcipinnis 4 | 21,37 | 1,56 |
| Liza falcipinnis 5 | 37,46 | 2,01 |
| Liza falcipinnis 6 | 31,55 | 1,11 |
| Penaeus Kerathurus 1 | 41,99 | 0,45 |
| Penaeus Kerathurus 2 | 24,60 | 0,84 |
| Penaeus Kerathurus 3 | 26,81 | 0,26 |
| Penaeus Kerathurus 4 | 21,59 | 0,24 |
| Penaeus Kerathurus 5 | 34,04 | - |
| Penaeus Kerathurus 6 | 28,11 | - |
| **Moyenne** | 26,85 | 2,01 |
| **Ecart type** | 12,30 | 1,18 |

**Tableau IV: Comparaison des teneurs moyennes (mg/kg) en métaux lourds dans les cinq espèces de poissons étudiés**

| | Pb | Cd |
|---|---|---|
| *Chrysichthys auratus* | 29,52 | 0,3 |
| *Ethmalosa fimbriata* | 25,46 | 2,12 |
| *Sarotherodon melanotheron* | 19,18 | 2,96 |
| *Liza falcipinnis* | 31,7 | 2,11 |
| *Penaeus Kerathurus* | 29,52 | 0,3 |
| Moyenne | 26,85 | 2,01 |
| Ecart-type | 12,3 | 1,18 |

**Tableau V : Variance de la teneur en plomb dans les différentes composantes**

| Facteur | Nombre d'échantillons | Moyenne | Ecart type |
|---|---|---|---|
| Eau | 10 | 0,56 | 0,22 |
| Sédiment | 10 | 54,04 | 35,36 |
| Poisson | 30 | 26,81 | 12,50 |
| Total | 50 | 27,03 | 24,72 |

**Tableau VI : Variance de la teneur en cadmium dans les différentes composantes**

| Facteur | Nombre d'échantillons | Moyenne | Ecart type |
|---|---|---|---|
| Eau | 10 | 0,02 | 0,03 |
| Sédiment | 10 | 0,67 | 0,68 |
| Poisson | 30 | 2,03 | 1,32 |
| Total | 50 | 1,314 | 1,32 |

**Tableau VII: Concentrations en µg/L de Hg dans les échantillons d'eau**

| | Hg |
|---|---|
| E1 | 0,14 |
| E2 | 0,135 |
| E3 | 0,125 |
| E4 | 0,13 |
| E5 | 0,24 |
| E6 | 0,235 |
| E7 | 0,135 |
| E8 | 0,24 |
| E9 | 0,238 |
| E10 | 0,145 |
| Moyenne | 0,176 |
| Ecart type | 0,05 |

***Source :*** Travaux de terrain

E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9 et E10 représentent les échantillons d'eau prélevés.

**Tableau VIII : Concentration (mg/kg) de Hg dans les échantillons de sédiments**

| | Hg |
|---|---|
| S1 | 0,14 |
| S2 | 0,145 |
| S3 | 0,142 |
| S4 | 0,145 |
| S5 | 0,14 |
| S6 | 0,145 |
| S7 | 0,14 |
| S8 | 0,145 |
| S9 | 0,145 |
| S10 | 0,143 |
| Moyenne | 0,143 |
| Ecart type | 0,002 |

***Source :*** Travaux de terrain

S1, S2, S3, S4, S5 S6, S7, S8, S9 et S10 représentent les échantillons de sédiments prélevés.

**Tableau IX: Comparaison des teneurs moyennes (mg/kg) en Hg dans les échantillons de poissons étudiés**

| | **Hg** |
|---|---|
| Sarotherodon melanotheron1 | 0,024 |
| Sarotherodon melanotheron2 | 0,023 |
| Sarotherodon melanotheron3 | 0,024 |
| Sarotherodon melanotheron4 | 0,027 |
| Sarotherodon melanotheron5 | 0,023 |
| Sarotherodon melanotheron6 | 0,026 |
| Chrysichthys auratus1 | 0,028 |
| Chrysichthys auratus2 | 0,028 |
| Chrysichthys auratus3 | 0,028 |
| Chrysichthys auratus4 | 0,028 |
| Chrysichthys auratus5 | 0,028 |
| Chrysichthys auratus6 | 0,028 |
| **Moyenne** | 0,026 |
| **Ecart type** | 0,002 |

**Tableau X: Comparaison des teneurs moyennes (mg/kg) en Hg dans les espèces de poissons étudiés**

| | **Hg** |
|---|---|
| *Sarotherodon melanotheron* | 0,024 |
| *Chrysichthys auratus* | 0,028 |
| Moyenne | 0,026 |
| Ecart-type | 0,002 |

**Tableau XI: Variance de la teneur en Hg dans les différentes composantes**

| **Facteur** | **Nombre d'échantillons** | **Moyenne** | **Ecart type** |
|---|---|---|---|
| Eau | 10 | $1,76\ 10^{-10}$ | 0,05 |
| Sédiment | 10 | 0,143 | 0,002 |
| Poisson | 12 | 0,026 | 0,002 |
| Total | 32 | 0,056 | 0,062 |

# *ANNEXES III: PROTOCOLE DE DOSAGE DU MERCURE*

# ANALYTICAL PROCEDURES
## For DR/2000 and DR/3000 Instruments

**MERCURY** (0.1 to 2.5 µg/L) Method 10065

**Cold Vapor Mercury Preconcentration Method***

***Scope and Application:*** *For water, wastewater and seawater*

**Cat. No. 26583-88**

**Phase 1 Sample Digestion - must be done in a fume hood! Toxic gases may be produced.**



**1.** Transfer one liter of the sample to a 2000-mL erlenmeyer flask. Add a 50-mm magnetic stir bar to the sample. Place the flask on a magnetic stirring hot plate and begin stirring.

***Caution:*** *This procedure must be done in a fume hood. Toxic chlorine or other gases may be produced!*

***Note:*** *Hach recommends using dedicated digestion glassware and sample cells for this procedure.*



**2.** Add 50 mL concentrated sulfuric acid to the sample.

***Note:*** *Determine a reagent blank for each new lot of reagent by running the entire procedure, including the digestion, using one liter of deionized water instead of sample. Add the same amount of potassium permanganate as required by the sample. Subtract the reagent blank from each test result.*



**3.** Add 25 mL concentrated nitric acid to the sample.



**4.** Add 4.0 g of potassium persulfate to the sample. Stir until dissolved.

***Note:*** *Alternatively, add one 5-gram measuring scoop of potassium persulfate to the sample.*

* Patent pending

1

## MERCURY, continued



**5.** Add 7.5 g of potassium permanganate to the sample. Stir until dissolved.

*Note: Alternatively, add a 10-gram measuring scoop of potassium permanganate to the sample.*



**6.** Cover the flask with a watch glass. Begin heating the sample to a temperature of 90 °C after the reagents have dissolved. **AVOID BOILING.**

*Note: For a mercury standard or reagent blank in distilled water the heat step is not necessary.*



**7.** Continue to stir and heat the sample at 90 °C for two hours.

*Note: A dark purple color must persist throughout the two hour digestion. Some samples, such as sea waters, industrial effluents or other samples high in organic matter or chloride concentration, require additional permanganate. It may be difficult to see a dark purple color if the sample contains a black/brown manganese dioxide precipitate. You may add more potassium permanganate if the solution is not dark purple.*



**8.** Cool the digested sample to room temperature. A brown/black precipitate of manganese dioxide may settle during cooling. If the digested sample does not have a purple color, the digestion may be incomplete. Add more potassium permanganate. Return the sample to the magnetic stirring hot plate and continue digestion until a purple color persists.



**9.** Return the cool, digested sample to the cool, magnetic stirring hot plate. Turn the stirrer on.



**10.** Using a 0.5-gram measuring spoon, add 0.5g-additions of hydroxylamine-hydrochloride until the purple color disappears. Wait 30 seconds after each addition to see if the purple disappears. Add hydroxylamine-hydrochloride until all the manganese dioxide is dissolved.



**11.** Remove the stir bar.



**12.** The digested sample is now ready for processing by cold vapor separation and preconcentration. Proceed to Phase 2.

**Phase 2 Cold Vapor Separation and Preconcentration of Mercury**

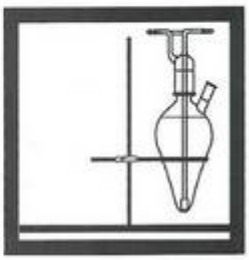
2

## MERCURY, continued



**1.** Transfer the digested sample to the Cold Vapor Gas Washing Bottle.

*Note: The volume of digested sample should contain 0.1 to 2.5 µg Hg.*



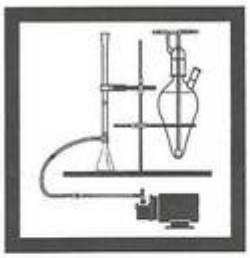
**2.** Set the Gas Washing Bottle in the support ring. Place the top on the Gas Washing Bottle. Wait until Step 9 to connect the mercury absorber column to the Gas Washing Bottle



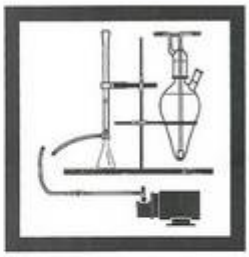
**3.** Connect the 100-mL erlenmeyer flask to the mercury absorber column.



**4.** Pipet 8 mL of HgEX Reagent B into the Mercury Absorber column.



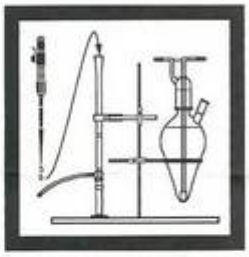
**5.** Connect the power to the vacuum pump and apply vacuum to the Mercury Absorber Column. Draw most of the HgEX Reagent B into the 100-mL erlenmeyer flask.



**6.** Disconnect the vacuum using the quick disconnect when HgEX Reagent B begins to drip from the inner delivery tube on the Mercury Absorber Column (about 10 seconds after starting the vacuum). Do not draw enough air through the column to begin drying the packing.

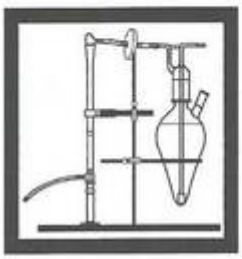


**7.** Remove the 100-mL erlenmeyer flask from the Mercury Absorber Column. Replace it with the 10-mL Distilling Receiver.

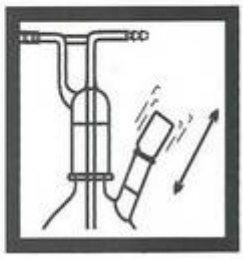


**8.** Pipet 2 mL of HgEX Reagent C into the Mercury Absorber Column.

## MERCURY, continued



**9.** Connect the Mercury Absorber Column to the Gas Washing Bottle using the glass elbow.

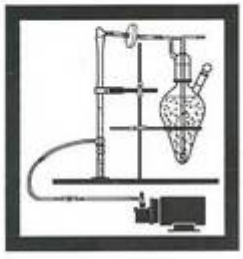


**10.** Shake an ampule of HgEX Reagent A to suspend the undissolved reagent. Open the ampule and gently shake the contents into the Gas Washing Bottle through the side neck.

*Note: Shaking the ampule is not necessary if there is no undissolved reagent in the ampule.*



**11.** Stopper the side neck on the Gas Washing Bottle.



**12.** Reconnect the vacuum to the Mercury Absorber Column using the quick disconnect. The vacuum will pull HgEX Reagent C through the Mercury Absorber Column packing into the 10-mL receiver. Air bubbles should be produced at the gas dispersion tube in the Gas Washing Bottle.

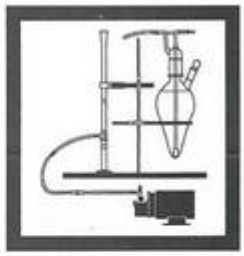



**13.** Press: **SHIFT TIMER**

A 5-minute reaction period will begin. Let the solution bubble for this period.

*Note: Air flow rate through the Gas Washing Bottle should be between 1-5 liters/minute. Allow more bubbling time for lower air flow rates. For example, if the air flow rate is 1 liter/minute, let the solution bubble for 10 minutes.*

*Note: For DR/3000s, press* **5 TIMER**



**14.** After the timer beeps, remove the glass elbow from the top of the Mercury Absorber Column. Keep the vacuum pump on.



**15.** Pipet 8 mL of HgEX Reagent B into the Mercury Absorber Column to elute the captured mercury. Continue to apply vacuum to pull the HgEX Reagent B into the Distilling Receiver.



**16.** Turn off or disconnect power to the vacuum pump when the volume in the Distilling Receiver reaches the 10 mL mark.

*Note: If necessary, the volume in the Distilling Receiver may be brought up to 10 mL with HgEX Reagent B. To avoid low volumes in the future, disconnect the vacuum a little sooner in Step 6. This leaves more HgEX Reagent B in the packing of the Mercury Absorber Column.*

4

## MERCURY, continued



**17.** Remove the Distilling Receiver from the Mercury Absorber Column. Reconnect the 100-mL erlenmeyer flask to the column.



**18.** Pipet 3 mL of HgEX Reagent B into the Mercury Absorber Column without applying vacuum. This keeps the absorber packing wet between tests.



**19.** The Mercury Absorber Column eluate in the Distilling Receiver is ready for analysis.

Proceed to Phase 3.

### Phase 3 Colorimetric Analysis




**1.** Enter the stored program number for the Cold Vapor Mercury method.

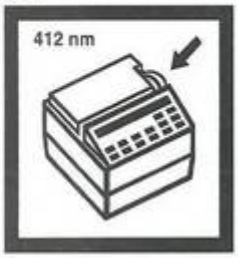
Press: **312 READ/ENTER**

The display will read:

**Dial nm to 412**

*Note: DR/2000s with software version 3.0 and greater will not display "Dial nm to" message if the wavelength is already set correctly. The display will show the message in Step 3. Proceed with Step 4.*

*Note: For DR/2000s without this stored program, see Instrument Setup following these steps.*




**2.** Rotate the wavelength dial until the small display reads:

**412 nm**

*Note: For DR/3000s, rotate the wavelength selector dial to a setting of 412 nm. Enter the calibration data in the Instrument Setup section following these steps.*




**3.** Press: **READ/ENTER**

The display will read:

**µg/L CV Hg**



**4.** Insert the 10-mL Cell Riser into the sample cell compartment.

*Note: For DR/3000s, insert the 10-mL Cell Riser into the sample cell compartment.*

5

## MERCURY, continued



**5.** Using the funnel provided, add the contents of one HgEX Reagent 3 foil pillow to the eluate in the Distilling Receiver. Stopper the receiver. Invert to dissolve the reagent.



**6.** Add the contents of one HgEX Reagent 4 foil pillow to the Distilling Receiver using the funnel provided. Stopper the receiver. Invert to dissolve the reagent.



**7.** Add 8 drops of HgEX Reagent 5 to the Distilling Receiver. Stopper the Receiver. Invert to mix.




**8.** Press: **SHIFT TIMER**

A two-minute reaction period will start.

*Note: For DR/3000s, press* ***2 TIMER***



**9.** During the reaction period, transfer the solution to a 10-mL sample cell. Wipe the sample cell sides with a clean tissue.

*Note: The Pour-Thru Cell cannot be used with this procedure.*



**10.** After the timer beeps, place the prepared sample into the cell holder and close the light shield.




**11.** Press: **ZERO**

The display will show:

**WAIT**

then:

**0.0 µg/L CV Hg**

*Note: For DR/3000s, press ZERO. The display will show 0.1. This program uses a non-zero intercept.*



**12.** Remove the cell from the cell holder. Add the contents of one HgEX Reagent 6 foil pillow to the solution. Swirl the cell until the reagent is completely dissolved. Immediately go to Step 13.

***Note:*** *Do not use the funnel to add HgEX Reagent 6 to the sample cell. Any HgEX Reagent 6 in the funnel will make mercury undetectable in subsequent tests.*

## MERCURY, continued



**13.** Return the sample cell to the cell holder. Close the light shield.




**14.** Press: **READ/ENTER**

The display will show:

**WAIT**

then the results for the mercury concentration of the original sample will be displayed in µg/L mercury.

*Note: For DR/3000s, pressing* ***READ*** *is not necessary. The instrument will automatically display the result.*

### Instrument Setup
**DR/3000 Instruments**

1. Enter the following data according to the procedure using Stored Program 1 (see paragraph 3.3.4.2 in the DR/3000 Instrument Manual).
2. After entering **1 STORED PROGRAM**, zero the instrument without placing a sample cell into the cell compartment. The prompting light on the **STANDARD 1** key will flash. Use this key to enter the absorbance data for each standard. The **STANDARD 2** key is used to enter the concentration values.
3. Press: **-0.03 STANDARD 1**. This enters the absorbance value for the blank.
4. Press: **0 STANDARD 2**. This enters the blank concentration value and completes the first calibration data point.
5. Continue entering the absorbance and concentration values for each data point from the table below, using Step 3 and 4 as examples.
6. After the last calibration point is entered, press **BEST FIT CALCULATE** to terminate entry and store the calibration.
7. Press: **1 CONC.** The instrument will enter readout mode and display the correct decimal placement.

| Calibration data point | Absorbance | Concentration (µg/L) |
|---|---|---|
| 1 | -0.03 | 0 |
| 2 | 0.094 | 0.5 |
| 3 | 0.227 | 1.0 |
| 4 | 0.355 | 1.5 |
| 5 | 0.465 | 2.0 |
| 6 | 0.558 | 2.5 |
| 7 | 0.637 | 3.0 |

7

## MERCURY, continued

**DR/2000s With Software Version 3.0**

1. Turn the instrument on. Press **SHIFT METHOD** to enter the configuration mode. The display will show: **MOMENTARY** or **CONSTANT ON**
2. Press the up arrow key twice to select HACH UPDATE. Press **READ/ENTER**. The display will show:
   **ENTER #:**
3. Press: PROG 3 | BATT 1 | EDIT 2 | READ ENTER
   The display will show:
   **P 312 ENTER nm**

*Note: If you make an error, press* **SHIFT CLEAR** *and re-enter the number. When the number is correct, press* **READ/ENTER**.

4. Press: %T 4 | BATT 1 | EDIT 2 | READ ENTER
   The display will show:
   **P 312 Decimal? 00.00**
5. Use the arrow keys to correctly position the decimal point. Press the down arrow key once. The display will show:
   **DECIMAL? 000.0**
6. Press **READ ENTER.** The display will show:
   **P 312 UNITS?**
7. Use the arrow keys to select the appropriate unit of measure. Press the down arrow key three times. The display will show:
   **P 312 µg/l**
8. Press **READ/ENTER** when the correct unit of measure is displayed. This display will show:
   **P 312 µg/l _**
9. Construct the display to read the correct symbol. The symbol must be entered exactly as shown including spaces between characters:
   **CV Hg**
   a) Select letters and numbers by scrolling to the correct character with the arrow keys.
   b) To make a letter or number uppercase, press the **SHIFT** key.
   c) The space is the character displayed after one press of the down arrow key.
   d) Make sure to enter the display line *EXACTLY* as shown, including the spaces. Do not enter trailing spaces.
   e) Accept each symbol by pressing **READ/ENTER**.
   f) To end symbol entry, press **READ/ENTER** a second time after accepting the last character.
10. When the instrument is out of symbol entry mode, the display will read:
    **P 312 TIMER**
11. This method has 2 timed steps, so press **SHIFT TIMER**. The display will show:
    **MM:SS TIME 1?**

8

## MERCURY, continued

12. Enter a timer value of 5 minutes. Press: 0 ABS 5 0 0
13. Press **READ/ENTER** to accept the timer value. The display will show:
    **MM:SS TIME 2?**
14. Enter a timer value of 2 minutes. Press: 0 EDIT 2 0 0
15. Press **READ/ENTER** to accept the timer value. The display will show:
    **MM:SS TIME 3?**
16. Press **READ/ENTER** to complete the timer entry. The display will show:
    **#0 STANDARD**
17. Press **READ/ENTER** to display the zero data pair. The display will show:
    **0.000 Abs 000.0 µg/l**
18. Press **READ/ENTER**. The display will show:
    **#1 STANDARD**
19. Press **READ/ENTER**. The display will prompt for entry of the first concentration point:
    **#1 000.0 µg/l**
20. Enter concentration point #1 from the table below by pressing **0002** so that the display shows:
    **# 1 000.2 µg/l**
21. Press **READ/ENTER**. The display will prompt for entry of the first absorbance point:
    **# 1 0.000 Abs**
22. Enter absorbance point #1 from the table below by pressing **0021**. The display will show:
    **# 1 0.021 Abs**
23. Press **READ/ENTER**. The display will show the first data pair: **0.021 Abs 000.2 µg/l**
24. Press **READ/ENTER** to accept the first data pair. The display will show:
    **#2 STANDARD**
25. Following steps 19-24 above, enter the remaining data pair values from this table.

| Standard | Concentration (µg/L) | Absorbance (Abs) |
|---|---|---|
| #0 | 0.0 | 0.000 |
| #1 | 0.2 | 0.021 |
| #2 | 1.0 | 0.224 |
| #3 | 1.5 | 0.345 |
| #4 | 2.0 | 0.454 |
| #5 | 2.5 | 0.553 |
| #6 | 3.0 | 0.640 |

26. When the last point pair is entered, the display will show:
    **#7 STANDARD**
27. Press **SHIFT READ/ENTER** to complete data point entry. The display will show:
    **#:**
28. Enter the validation number **3974**. The display will show:
    **#: 3974**

9

## MERCURY, continued

29. Press **READ/ENTER**. The display will show: **COMPLETED**

then:
**P 312 µg/l CV Hg**

If the display shows **INCORRECT #**, then prompts for the validation number, a mistake may have been made during data entry. Make sure the validation number is correct. If so, the error occurred during some other portion of the method entry. Press **METH** and respond to the **ABORT?** message by pressing **READ/ENTER**, then re-enter the method.

The instrument is now ready for use with method 312.

### Sample Collection And Preservation

Collect 1000 mL of sample in an analytically clean, glass or polyethylene terephthalate (PET) container. Add 10 mL of concentrated hydrochloric acid to preserve the sample before sample collection. Fill the container completely full to minimize air space when closed. Close a glass container with a ground glass stopper. Close a PET container with a PET cap or a polypropylene cap (no liner).

Store aqueous samples at 2-6 °C. Acid-preserved samples are stable for at least 6 months.

### Accuracy Check

**Standard Additions Method**

a) Use a TenSette® pipet to add 0.10 mL of a 12.5 mg/L Mercury Standard Solution to the purged solution in the Gas Washing Bottle after an analysis has been performed. Immediately stopper the Gas Washing Bottle.

b) Begin at Step 3 of Phase 2. Follow the procedure steps.

c) Test the eluate as described in Phase 3. The displayed concentration should be between 1.1-1.4 µg/L Hg.

**Standard Solution Method**

a) Transfer 800 mL of mercury-free water into the Gas Washing Bottle.

b) Add 50 mL of concentrated sulfuric acid and 25 mL of concentrated nitric acid to the water. Swirl to mix.

c) Prepare a 0.1-mg/L mercury standard solution by serially diluting a 1000-mg/L Mercury Standard Solution:

- To make a 10.0-mg/L standard, add 1.0 mL of concentrated nitric acid to a 500-mL volumetric flask. Dilute 5.00 mL of a 1000 mg/L standard to 500 mL with deionized water. Mix well.
- To make a 1.0-mg/L standard solution, add 0.2 mL of concentrated nitric acid to a 100-mL volumetric flask. Dilute 10.0 mL of the 10.0-mg/L standard to 100 mL with deionized water. Mix well.
- To make a 0.1-mg/L standard solution, add 0.2 mL of concentrated nitric acid to a 100-mL volumetric flask. Dilute 10.00 mL of the 1.0-mg/L solution to 100 mL with deionized water. Mix well.

d) Pipet 10.0 mL of the 0.1-mg/L mercury standard solution into the Gas Washing Bottle. Swirl to mix.

e) Begin at Step 2 of Phase 2. Follow the procedure steps.

## MERCURY, continued

f) Test the eluate as described in Phase 3. The displayed concentration should be between 0.9-1.1 µg/L Hg.

### System Start Up

Hach recommends that the analyst perform a few analyses on mercury standards and blanks for system equilibration before beginning sample testing. This allows the system to stabilize before processing samples.

### Startup Standard

Test a mercury standard solution by following the procedure under Accuracy Check using the Standard Solution Method. Continue with step g (below) if the value is not within specified limits.

g) Pipet 10.0 mL of the 0.1-mg/L mercury standard solution into the purged solution in the Gas Washing Bottle. Immediately stopper the Gas Washing Bottle.

h) Begin at Step 3 of Phase 2. Follow the procedure steps.

i) Test the eluate as described in Phase 3. The displayed concentration should be between 0.9-1.1 µg/L Hg. Repeat steps g-i if the value is not within these limits.

### Startup Blank

Run a system blank by using the purged solution in the Gas Washing Bottle after a satisfactory test of the Startup Standard has been completed.

a) Leave the purged solution in the Gas Washing Bottle. Do not add an aliquot of mercury standard.

b) Begin at Step 3 of Phase 2. Follow the procedure steps.

c) Test the eluate as described in Phase 3. The displayed concentration should be 0.2 µg/L Hg. Repeat the Startup Blank procedure until a reproducible value is obtained.

### Method Performance

#### Precision

**DR/2000:** In a single laboratory using a standard solution of 1.00 µg/L Hg and two representative lots of reagent with a DR/2000, a single operator obtained a mean value of 0.95µg/L Hg and a standard deviation of ±0.05 µg/L Hg for nine replicates.

**DR/3000:** In a single laboratory using a standard solution of 1.00 µg/L Hg and two representative lots of reagent with a DR/3000, a single operator obtained a mean value of 0.96 µg/L Hg and a standard deviation of ±0.04 µg/L Hg for nine replicates.

### Estimated Detection Limit

The estimated detection limit for the Cold Vapor Mercury method is 0.1 µg/L Hg.

## MERCURY, continued

### Interferences

Standards were used to prepare a single test solution with the following matrix. A second test solution containing only mercury at the same concentration was prepared as the control. The two solutions were digested then analyzed concurrently. There was no interference from the matrix of the test solution at the concentrations listed:

**Table 1 Interference Test Solution Matrix**

| Ion or Substance | Concentration |
|---|---|
| $Ag^{+2}$ | 7 mg/L $Ag^{+2}$ |
| $Al^{+3}$ | 10 mg/L $Al^{+3}$ |
| $Au^{3+}$ | 500 µg/L $Au^{3+}$ |
| $Cd^{+2}$ | 10 mg/ L $Cd^{+2}$ |
| $Co^{+2}$ | 10 mg/L $Co^{+2}$ |
| $Cr^{+6}$ | 10 mg/L $Cr^{+6}$ |
| $Cu^{+2}$ | 10 mg/L $Cu^{+2}$ |
| $F^-$ | 1.0 mg/L $F^-$ |
| $Fe^{+2}$ | 100 mg/L $Fe^{+2}$ |
| $Hg^{+2}$ | 1 µg/L $Hg^{+2}$ |
| $Mo^{+6}$ | 10 mg/L $Mo^{+6}$ |
| $Ni^{+2}$ | 10 mg/L $Ni^{+2}$ |
| $NO_3^-$-N | 50 mg/L $NO_3^-$-N |
| $Pb^{2+}$ | 10 mg/L $Pb^{2+}$ |
| $SiO_2$ | 100 mg/L $SiO_2$ |
| $Zn^{+2}$ | 10 mg/L $Zn^{+2}$ |

In addition, no interference occurred with a test solution containing 1000 mg/L $Na^+$, 1000 mg/L $K^+$, 1000 mg/L $Mg^{2+}$, and 400 mg/L $Ca^{2+}$.

### Storage and Maintenance of the Cold Vapor Mercury Apparatus

#### Storage

Store the apparatus as follows for fastest system stabilization and greatest sensitivity:

- Store the Gas Washing Bottle filled with deionized water containing 15 mL of concentrated sulfuric acid. Seal the bottle with the Gas Washing Bottle stopper and top.
- Store the Mercury Absorber Column with the packing wetted with HgEX Reagent B. The erlenmeyer flask should be kept attached underneath the column. The top of the Mercury Absorber column should be attached to the Gas Washing Bottled with the glass elbow as in the procedure.

#### Glassware Care

Hach recommends using dedicated glassware and sample cells because of the sensitivity of this procedure. Thoroughly clean the glassware and sample cells between tests. After washing, rinse with 1:1 hydrochloric acid solution, then rinse several times with deionized water.

12

## MERCURY, continued

### Maintaining the System

- With proper care and storage, the Mercury Absorber Column may be used an unlimited number of times.
- Replace the Mercury Scrubber in the air trap housing at least once for every reagent set used.
- Moisture build up on the Gas Washing Bottle side of the Acro® 50 Vent Filter will reduce the purging air flow rate. If this occurs replace the filter or dry it in an oven at 110 °C.

### Summary of Method

The sample is digested to convert all forms of mercury in the sample to mercuric ($Hg^{2+}$) ions. The mercuric ions in the digested sample are converted to mercury vapor in a semi-closed system. The vapor is carried into a chemically activated absorber column by ambient air where the mercury vapor is converted to mercuric chloride.

The mercuric chloride is eluted off the column and a sensitive indicator is added. The instrument is zeroed using the absorbance peak of the unreacted indicator. A complexing agent is added to break the mercury:indicator complex. The increase in unreacted indicator causes an increase in absorbance which is proportional to the amount of mercury in the original sample.

### Safety

Wear personal protective equipment such as safety glasses with side shields, or a face shield to protect your eyes. Use other protective equipment as necessary (such as a fume hood) to avoid chemical exposure. Perform all steps exactly as prescribed in the procedure.

### Waste Disposal

Proper management and disposal of waste is the responsibility of the waste generator. Hach Company provides waste disposal information as a guideline only. It is up to the generator to arrange for proper disposal and comply with applicable local, state, and federal regulations governing waste disposal. Hach Company makes no guarantees or warranties, express or implied, for the waste disposal information represented in this procedure.

1. Dispose of the solution in the Gas Washing Bottle by neutralizing the solution to a pH of 6-9 and flushing to the sanitary sewer with water for several minutes.
2. The mercury contained in one liter of sample is concentrated by a factor of 100 by the Mercury Absorber Column. Mercury analysis within the range of the test may produce a solution in the sample cell that is above the RCRA Toxicity Characteristic limit of 0.20 mg/L Hg. The sample cell will contain 0.25 mg/L mercury if the original sample was at 2.5 µg/L mercury (the upper limit of the test range). Dispose of the solution in the sample cell as a hazardous waste if the test result was over 2 µg/L mercury in the original sample. Otherwise, pour the solution into the sanitary sewer and flush with water for several minutes.
3. The mercury scrubber will capture mercury vapor if the Mercury Absorber Column is not properly activated using HgEX Reagent B and HgEx Reagent C. In addition, mercury is also captured if the capacity of the Absorber Column is exceeded. If the Mercury Scrubber has captured mercury vapor, it must be disposed of according to applicable regulations.

## MERCURY, continued

### REQUIRED REAGENTS

| | Cat. No. |
|---|---|
| Cold Vapor Mercury Reagent Set (25 tests) | 26583-00 |

| Description | Quantity Required Per Test | Unit | Cat. No. |
|---|---|---|---|
| HgEX Reagent A, Stannous Sulfate Solution Ampules | 1 | 25/pkg | 26588-25 |
| HgEX Reagent B, Sulfuric Acid Solution | 19 mL | 500 mL | 26589-49 |
| HgEX Reagent C, Sodium Hypochlorite Solution | 2 mL | 55 mL | 26590-59 |
| HgEX Reagent 3, Alkaline Reagent Powder Pillows | 1 pillow | 25/pkg | 26584-48 |
| HgEx Reagent 4, Indicator Powder Pillows | 1 pillow | 25/pkg | 26585-48 |
| HgEx Reagent 5, Hydroxide Solution | 8 drops | 10 mL SCDB | 26586-36 |
| HgEx Reagent 6, Complexing Reagent Powder Pillows | 1 pillow | 25/pkg | 26587-48 |
| Mercury Scrubber | 2/reagent set | 2/pkg | 26558-00 |
| **Digestion Reagents** | | | |
| Hydroxylamine Hydrochloride, ACS | varies | 113 g | 246-14 |
| Nitric Acid, ACS | 25 mL | 500 mL | 152-49 |
| Potassium Permanganate, ACS | varies | 454 g | 168-01 |
| Potassium Persulfate, ACS | 4.0 g | 454 g | 26175-01 |
| Sulfuric Acid, ACS | 50 mL | 4 kg | 979-09 |

### REQUIRED APPARATUS

| | Cat. No. |
|---|---|
| Cold Vapor Mercury Apparatus Set | 26744-00 |

| Description | Quantity Required Per Test | Unit | Cat. No. |
|---|---|---|---|
| Acro® 50 Vent Filter | 1 | 18/pkg | 26833-18 |
| Air Trap Housing | 1 | each | 26639-00 |
| Ampule Breaker | 1 | each | 25640-00 |
| Breaker/Capper Tool for Mercury Scrubber | 1 | each | 26640-00 |
| C-flex Tubing, 0.25" ID, white | 4 ft | 25 ft | 23273-67 |
| Cell Riser, DR/2000 | 1 | each | 45282-00 |
| Cell Riser, DR/3000 | 1 | each | 48403-00 |
| Clamp for Mercury Absorber Column | 1 | each | 26562-00 |
| Distilling Receiver, 10 mL | 1 | each | 26554-38 |
| Erlenmeyer Flask, 100 mL | 1 | each | 26553-42 |
| Funnel | 1 | each | 25843-35 |
| Gas Washing Bottle, 1200 mL | 1 | each | 26622-00 |
| Glass Elbow, with hose adapter | 1 | each | 26552-00 |
| Mercury Absorber Column | 1 | each | 26555-10 |
| Rod Clamp | 2 | each | 326-00 |
| Support Ring for Gas Washing Bottle | 1 | each | 26563-00 |
| Stopper, for Distilling Receiver | 1 | each | 26559-00 |
| Stopper, for Gas Washing Bottle | 1 | each | 26623-00 |
| Support Base and Rod | 1 | each | 329-00 |
| Tubing Quick Disconnect, HDPE | 1 | 12/pkg | 14810-00 |
| **Digestion Apparatus** | | | |
| Erlenmeyer Flask, 2000 mL | 1 | each | 24894-54 |
| Hot Plate/Stirrer, 120 V | 1 | each | 23442-00 |
| Hot Plate/Stirrer, 240 V | 1 | each | 23442-02 |
| Spoon, measuring, 0.5 g | 1 | each | 907-00 |
| Stir Bar | 1 | each | 20953-55 |
| Thermometer, -20 to 110 °C | 1 | each | 566-01 |
| Watch Glass | 1 | each | 578-67 |

## MERCURY, continued

### OPTIONAL REAGENTS

| | | |
|---|---|---|
| Hydrochloric Acid, ACS | 500mL | 134-49 |
| Mercury Standard Solution, 12.5 mg/L Hg (NIST) | 100 mL | 2389-42 |
| Mercury Standard Solution, 1000 mg/L Hg (NIST) | 100 mL | 14195-42 |
| Water, deionized | 4 L | 272-56 |

### OPTIONAL APPARATUS

| | | |
|---|---|---|
| Analytical Balance | each | 25568-00 |
| Cylinder, graduated, 1000 mL, with handle | each | 26129-53 |
| Incoming Air Filtration Apparatus | each | 26846-00 |
| Spoon, measuring, 5 g | each | 26572-05 |
| Spoon, measuring, 10 g | each | 26572-10 |
| Stir Bar Retriever | each | 15232-00 |
| TenSette Pipet, 0.1-1.0 mL | each | 19700-01 |
| TenSette Pipet, 1.0-10.0 mL | each | 19700-10 |
| TenSette Pipet tips, for 19700-01 | 50/pkg | 21856-96 |
| TenSette Pipet tips, for 19700-10 | 50/pkg | 21997-96 |
| Vacuum Pump, with fittings, 115 V | each | 26557-00 |
| Vacuum Pump, with fittings, 230 V | each | 26557-02 |

HACH®

**HACH** COMPANY
WORLD HEADQUARTERS
P.O. Box 389
Loveland, Colorado 80539-0389
Telephone: (970) 669-3050
FAX: (970) 669-2932

**FOR TECHNICAL ASSISTANCE, PRICE INFORMATION AND ORDERING:**
In the U.S.A. - **Call toll-free 800-227-4224**
Outside the U.S.A. - **Contact the HACH office or distributor serving you.**
On the Worldwide Web - **www.hach.com**; E-mail - **techhelp@hach.com**

© Hach Company, 1997. All rights reserved. Printed in the U.S.A. 1874 1/97-900

# Table des matières

Sommaire ..... i
Dédicace ..... iv
Remerciements ..... v
Liste des sigles et abréviations ..... viii
Liste des tableaux ..... xiv
Liste des figures ..... xv
Liste des photos ..... xvii
Liste des annexes ..... xx
Résumé ..... xxi
Abstract ..... xxii
*INTRODUCTION GENERALE* ..... 1
*CADRE THEORIQUE* ..... 6
Problématique ..... 7
Justification ..... 10
Objectifs ..... 13
Objectif général ..... 13
Objectifs spécifiques ..... 13
Hypothèses ..... 13
*PREMIERE PARTIE: REVUE DE LITTERATURE* ..... 15
Chapitre 1 : Eléménts Traces Métalliques (Plomb, Cadmium et Mercure) ..... 16
I. Généralité sur les ETM ..... 16
1.1 Eléments Traces Métalliques (ETM) et Environnement ..... 16
1.2 Répartition et devenir des ETM dans l'environnement aquatique ..... 18
1.3 Biodisponibilité des ETM dans l'environnement aquatique ..... 19
1.4 Bioaccumulation ETM ..... 20
II. Caracteristique, source, toxicité et normes des ETM ..... 21
2.1 Plomb ..... 21
2.1.1 Caractéristique ..... 21
2.1.2 Source de pollution ..... 22
2.1.3 Toxicité ..... 22
2.2 Cadmium ..... 23
2.2.1 Caractéristique ..... 23
2.2.2 Source de pollution ..... 24
2.2.3 Toxicité ..... 25
2.3 Mercure ..... 27
2.3.1 Caractéristique ..... 27
2.3.2 Formes du mercure ..... 27

2.3.3 Source de pollution ....28
2.3.4 Toxicité....31
2.4 Normes des ETM....32
Chapitre 2 : Particularités anatomiques et histophysiologiques des organes cibles (foie, reins, cerveau)....34
I. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du foie chez l'homme et les animaux....34
1.1 Anatomie descriptive ....34
1.2 Unité fonctionnelle du foie....35
1.3 Physiologie du foie ....38
1.3.1 Fonction métabolique du foie ....38
1.3.2 Fonction biliaire : Sécrétion et excrétion biliaires ....38
1.3.3 Fonction de stockage....38
1.3.4 Fonction xénobiotique ou d'élimination ....38
II. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du rein chez l'homme et les animaux....40
2.1 Morphologie du rein....40
2.2 Anatomie du rein ....40
2.3 Organisation anatomique du rein....40
L'unité anatomique du rein : le néphron ....42
2.4 Physiologie rénale....43
2.4.1 Fonctions émonctoires....43
2.4.2 Fonction endocriniennes....44
III. Aperçu sur l'anatomie et l'histologie du cerveau chez l'homme et les animaux ....44
3.1 Morphologie du cerveau....44
3.2 Anatomie du cerveau ....44
3.3 Organisation anatomique et physiologie du cerveau ....45
Chapitre 3 : Notion de radicaux libres, de stress oxydant et mécanisme de défense....47
I. Notion de radicaux libres et de stress oxydant ....47
II. Mécanismes de défense contre le stress oxydant : systèmes anti-oxydants....51
*DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES*....63
Chapitre 1 : Approche méthodologique d'évaluation du risque d'exposition de la population de Ganvié aux ETM (Pb, Cd, Hg) ....64
I. Evaluation du degré de pollution par les ETM (plomb, cadmium et mercure)....64
1.1 Cadre d'etude....64
1.1.1 Présentation du lac Nokoué ....64
1.1.2 Présentation de la cité lacustre de Ganvié ....64
1.1.2.1 Situation géographique....64
1.1.2.2 Relief et climat....67
1.1.2.3 Tourisme et artisanat ....67

1.1.2.4 Economie ....68
1.2 Approche méthodologique ....69
1.2.1 Recherche documentaire et collecte des données ....69
1.2.2 Recherche documentaire ....69
1.2.3 Observation de terrain ....70
1.2.4 Prélèvements ....70
1.2.5 Méthodologie des travaux de laboratoire ....79
1.2.5.1 Conservation et prétraitement des échantillons au laboratoire ....79
1.2.5.2 Dosages des métaux lourds dans les échantillons ....80
1.2.5.2.1 Dosage du plomb et du cadmium par SAA ....80
1.2.5.2.2 Dosage du mercure par SAM ....84
II. Evaluation du risque d'exposition de la population via la consommation des poissons ....88
III. Analyse statistique ....88
Chapitre 2 : Méthodologie d'évaluation in vivo de l'effet protecteur de la « vitamine C » contre l'effet de cadmium et du mercure ....89
I. Lieu d'étude, matériel et méthode ....89
1.1 Lieu d'étude ....89
1.2 Matériel ....89
1.2.1 Matériel animal ....89
1.2.2 Produits chimiques ....91
1.2.3 Autres matériels de laboratoire ....92
1.3 Méthodes ....93
1.3.1 Préparation des différentes solutions ....93
1.3.2 Répartition des rats et essais ....93
1.3.3 Mode d'administration ....94
1.3.4 Observations cliniques et mesure de poids corporel ....95
1.3.5 Prélèvement du sang par ponction du sinus rétro-orbitaire ....96
1.3.6 Autopsie des rats et prélèvement d'organes ....97
II. Examens ....99
2.1 Examens Hématologiques ....99
2.2 Examens histopathologiques ....100
III. Traitement et analyses statistiques ....102
*TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION* ....103
Chapitre 1 : Pollution par les éléments traces métalliques (plomb, cadmium et mercure) à Ganvié et évaluation de risque d'exposition de la population. ....104
I. Evaluation du degré de pollution de l'écosystème de Ganviè par le plomb et le cadmium (Publication 1). ....104
1.1 L'eau ....104

1.2 Les sédiments .....105
1.3 Les poissons.....105
1.4 Analyse de variance .....106
1.4.1 Teneur en plomb .....106
1.4.2 Teneur en cadmium.....107
II. Risque d'exposition de la population au Pb et au Cd via la consommation des poissons (Publication 2) .....110
2.1 Identification des risques.....110
2.2 Valeurs toxicologiques de référence .....111
2.3 Estimation de l'exposition et niveaux de contamination des poissons. .....111
2.4 Caractérisation du risque : calcul de la DJE.....113
2.5 Calcul des quotients de danger .....115
III.Evaluation du degré de contamination de la cité lacustre de Ganvié par le mercure .....118
3.1 L'eau .....118
3.2 Les sédiments .....118
3.3 Les poissons.....119
3.4 Analyse de variance .....119
Chapitre 2 : Résultats de la toxicité des métaux (cadmium et mercure) sur les rats et évaluation de l'effet protecteur de l'acide ascorbique « vitamine C » .....123
I. Signes clinques de toxicité .....123
II. Variation des paramètres hématologiques et effet protecteur de la vitamine C .....124
2.1 Toxicité (Publication 3).....124
2.2 Evaluation de l'effet protecteur de la vitamine C sur la variation des paramètres hématologiques des rats intoxiqués au cadmium, au mercure et à leur combinaison (Publication 4) .....129
III.Observation histopathologique et effet protecteur de la vitamine C .....134
3.1 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués au cadmium. .....134
3.1.1 Reins.....134
3.1.2 Foie.....136
3.1.3 Cerveau.....138
3.2 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués au mercure. (Publication 5).....144
3.2.1 Reins.....144
3.2.2 Foie.....146
3.2.3 Cerveau.....148

3.3 Effet protecteur de la vitamine C sur les altérations des tissus du rein, du foie et du cerveau chez les rats intoxiqués avec une combinaison du mercure et du cadmium ..... 153

3.3.1 Reins ..... 153

3.3.2. Foie ..... 155

3.3.2 Cerveau ..... 157

*CONCLUSION GENERALE ET SUGGESTION* ..... 162

*REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES* ..... 166

*ANNEXES* ..... 199

Annexes I: Publications scientifiques ..... 200

Publication 1: Pollution of aquatic ecosystems by heavy metals at Ganvié's lacustrine city (Benin) ..... 201

Publication 2: Assessment of exposure risk to lead and cadmium via fish consumption in the lacusrian village of Ganvié in Benin Republic ..... 208

Publication 3 : Haematological evaluation of Wistar rats exposed to chronic doses of cadmium, mercury and combined cadmium and mercury ..... 218

Publication 4: Protective effects of vitamin C on Haematological parameters in intoxicated wistar rats with Cadmium, Mercury and combined cadmium and mercury ..... 225

Publication 5 : Protective effects of vitamin c in kidney, liver and brain: about a study in wistar rats intoxicated with mercury ..... 231

Annexes II : Poster ..... 244

Annexes III : Tableaux ..... 246

Annexes IV : Protocole de dosage du mercure ..... 252

Table des matières ..... 268