

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre
Département de Biologie

N° : SNV-ST

Khemis Miliana, le 05 /05/2022



Cycle : Master Protection des écosystèmes

✚ OUVRAGE PEDAGOGIQUE
✚ ECOTOXICOLOGIE APPLIQUÉE

Année Universitaire 2021/2022



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université de Djillali Bounaama Khemis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et science de la terre
Département de biologie

Écotoxicologie Appliquée

Master Protection des écosystèmes



Cours présenté par

2017-2018

Dr. NABTI DJAHIDA

Table de matière

INTRODUCTION GENERALE	8
OBJECTIFS.....	9
CHAPITRE 1 GENERALITE SUR L'ECOTOXICOLOGIE	10
I.1.Éléments de définitions.....	11
I.2.Objectif et contraintes.....	15
I.3.Méthodologie et approches.....	15
I.4.Normes	16
I.5.Bioteneurs.....	17
I.6.Niveaux d'étude des polluants.....	17
I.7.Règle des trois actions polluantes.....	
CHAPITRE 2 ÉCOTOXICOLOGIE DES MILIEUX AQUATIQUES	21
II.1.Définition.....	22
II.2.Tests de toxicité in vivo et in vitro des écosystèmes aquatiques.....	22
II.2.1.Objectif des tests écotoxicologiques.....	23
II.2.2.Caractéristiques des tests écotoxicologiques.....	24
II.2.3.Conditions expérimentales.....	24
II.2.4.Mode d'application des polluants en milieu aquatique.....	25
II.2.5.Paramètre de létalité.....	26
II.2.6.Génotoxicité et Mutagénéicité.....	26
II.3.Impact d'activités humaines sur les écosystèmes aquatiques.....	28
II.3.1.Impact des perturbateurs endocriniens sur les écosystèmes aquatiques.....	28
II.3.1.1.Définition d'un perturbateur endocrinien.....	28
II.3.1.2.Classification.....	28
II.3.1.3.Effets des perturbateurs endocriniens.....	29
II.3.1.4.Mécanisme d'action.....	30
II.4.Qualité écologique du milieu aquatique.....	31
CHAPITRE 3 ÉCOTOXICOLOGIE DE MILIEUX TERRESTRES	
III.1.Définition.....	34
III.2.Tests de toxicité in vivo/in vitro terrestre.....	34
III.3.Impact et transfert des polluants.....	35
III.3.1.Dynamique de transfert des polluants.....	35
III.3.1.1Dynamique de transfert des polluants dans les écosystèmes.....	35
II.3.1.2.Dynamique de transfert du polluant Dans l'organisme.....	41
CHAPITRE 4 BIOS SURVEILLANCES	44
4.1. Notion de la biosurveillance.....	45
4.1.1. Les Bioindicateurs.....	45
*Type des bioindicateurs.....	46
*Utilité des bioindicateurs.....	46

*Caractéristiques des bioindicateurs.....	46
*Type d'organisme en qualité bioindicateurs.....	47
*Indicateurs biologiques de la qualité des milieux terrestre.....	47
*Indicateur biologiques de la qualité des milieux aquatiques.....	48
*Rôle et fonctionnement des bioindicateurs.....	48
*Le phénomène de résistance ou de tolérance.....	48
4.1.2. Les biomarqueurs.....	51
*Définition.....	51
*Utilité des biomarqueurs.....	51
*Caractéristiques.....	51
*Types des biomarqueurs.....	51
*Mode d'action d'un xénobiotique sur l'Acétylcholinesterase (<u>bimarqueur de neurotoxicité</u>)	53
*Fonctionnement normal et perturbé d'AChE.....	53
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	59

Liste des Figures

Titre	Page
Figure 1 Place de l'écotoxicologie par rapport aux autres disciplines et objectif.....	8
Figure 2 Toxicité aigue et chronique dans le milieu aquatique.....	21
Figure 3 Effets clastogènes du méthylmercure.....	22
Figure 4 Action des perturbateurs endocriniens.....	25
Figure 5 Principe de l'évaluation du milieu aquatique.....	32
Figure 6 Dynamique des ETM dans les trois compartiments.....	36
Figure 7 Bioamplification du polluant (cas du ddt ou mercure).....	37
Figure 8 Rose du vent et de pollution.....	38
Figure 9 Variation de la température.....	39
Figure 10 Représentation schématique du déplacement des polluants atmosphériques entre la source et le milieu récepteur.....	40
Figure 11 Approches complémentaire dans les programmes de la biosurveillance...	45
Figure 12 Quelques Exemples des bioindicateurs.....	47
Figure 13 Schéma conceptuel avec l'utilisation des bioindicateurs terrestres.....	48
Figure 14 Effets biologiques subséquents à l'exposition aux contaminants chimiques.....	49
Figure 15 Fonctionnement normal et perturbé d'AchE au niveau cellulaire.....	54
Figure 16 Fonctionnement normal et perturbé (inhibition) d'AchE au niveau moléculaire.....	54

Liste des Tableaux

Titre	Page
Tableau 1 Comparaison entre les micropolluants et les macropolluants.....	14
Tableau 2 Critères influençant sur les tests écotoxicologiques.....	23
Tableau 3 Caractéristiques des tests écotoxicologiques.....	24
Tableau 4 Liste non exhaustive des perturbateurs endocriniens reconnus ou potentiels utilisés dans les produits cosmétiques.....	30
Tableau 5 Types des biomarqueurs et leurs actions.....	52

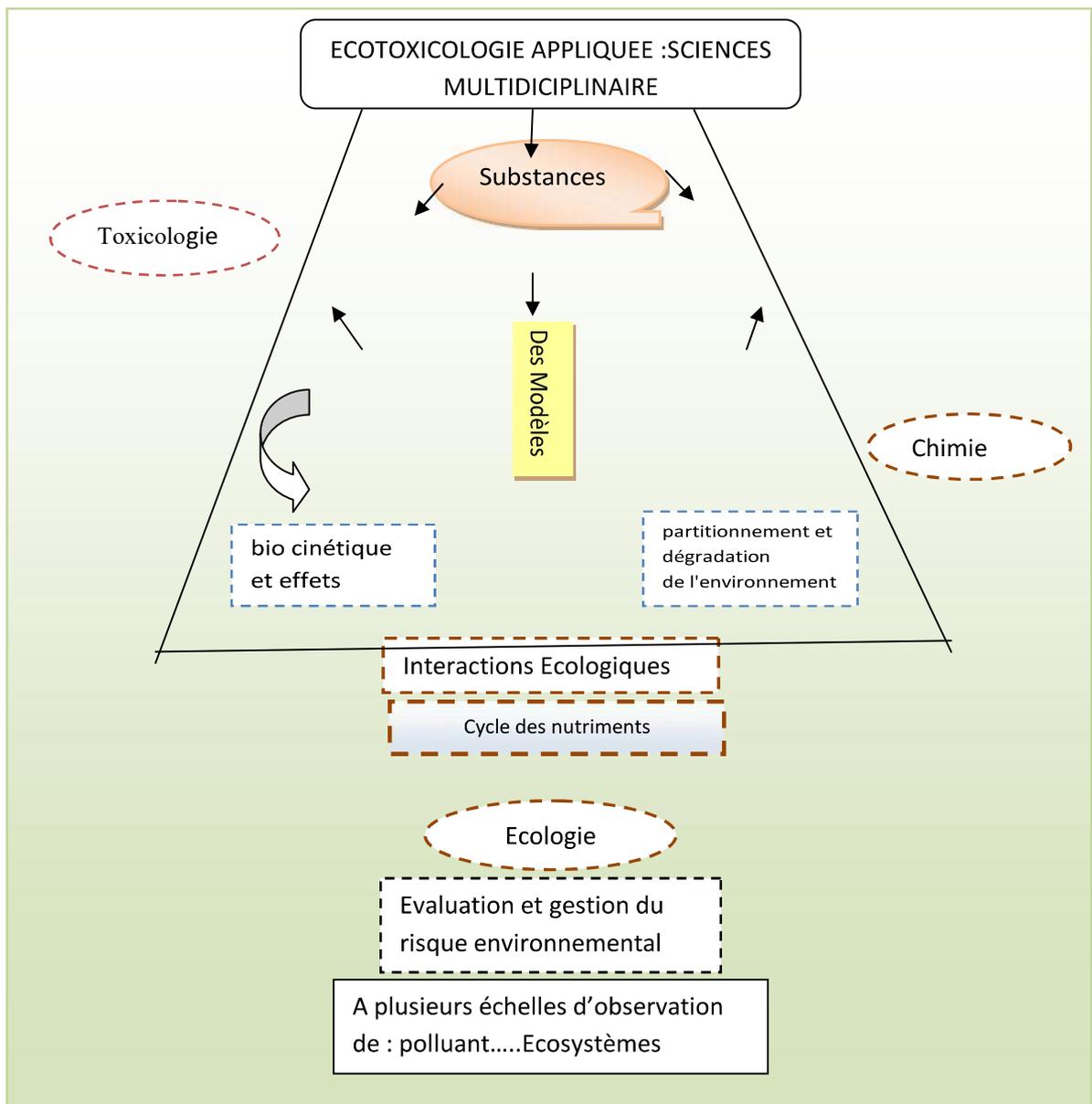
Fiche de contact

Intitulé de Master	Protection des Ecosystèmes
Module/ Cours	Ecotoxicologie Appliquée
Unité d'enseignement	Fondamentale (UEF1)
Crédits	6
Coefficient	3
Enseignante	Dr. NABTI Djahida
Horaire	Théorie/Travaux dirigées/Travaux pratiques: Dimanche
Contact	Salle : 23 VHS : 67,30h, TD+TP+Cours nabtidjahida@gmail.com d.nabti@univ-dbk.m.dz



INTRODUCTION GENERALE

I. Introduction Générale



INTRODUCTION GENERALE

L'écotoxicologie parmi les nouvelles discipline qui traite l'effet de la pollution dans les différents milieux. C'est la science qui traite l'impact des composés chimiques sur les écosystèmes. Elle intègre la chimie, l'écologie et la toxicologie [1,2] (Fig1). Elle est devenue nécessaire lorsque l'homme a commencé à introduire des produits chimiques dans l'environnement. Personne ne s'était préoccupé du devenir de ces molécules jusqu'au moment ou ils sont commencé à se manifester dans les endroits inattendus, ou lorsque ils ont eu des effets néfastes sur les organismes vivants dans l'environnement. Jusqu'ici on ne sait que très peu de chose sur le niveau de stress que peuvent subir sur les écosystèmes. Pour cela ce module traite plusieurs volets commençant d'abord par une généralité sur l'écotoxicologie, Méthodologie et approches, normes, bioteneurs, niveaux d'études des polluants...). Ensuite le deuxième chapitre concerne l'écotoxicologie des milieux aquatique ainsi que le troisième concerne l'écosystème terrestre et enfin la biosurveillance environnementale qui est basés sur deux approches complémentaires, les bio indicateurs et les biomarqueurs. A cette mosaïque de milieux des niveaux d'études, des facteurs, des mécanismes, des espèces faunistiques ou floristique s'ajoute la présence non négligeable d'une variété des contaminants de types, des doses, des sources différentes induisant à des effets nocifs sur la santé publiques. En effet, dans le but d'harmoniser les tests toxicologiques entre les laboratoires et de contrôler plus aisément divers paramètres, qui sont généralement réalisées dans des conditions expérimentales largement simplifiées par rapport à la complexité des conditions naturelles. Ces tests de toxicité ont pour objectif d'évaluer et de déterminer le potentiel toxique d'une substance qu'il s'agisse d'effets aigus ou à long terme en suivant les actions dommageables envers les écosystèmes pour une bonne gestion environnementale et durable.

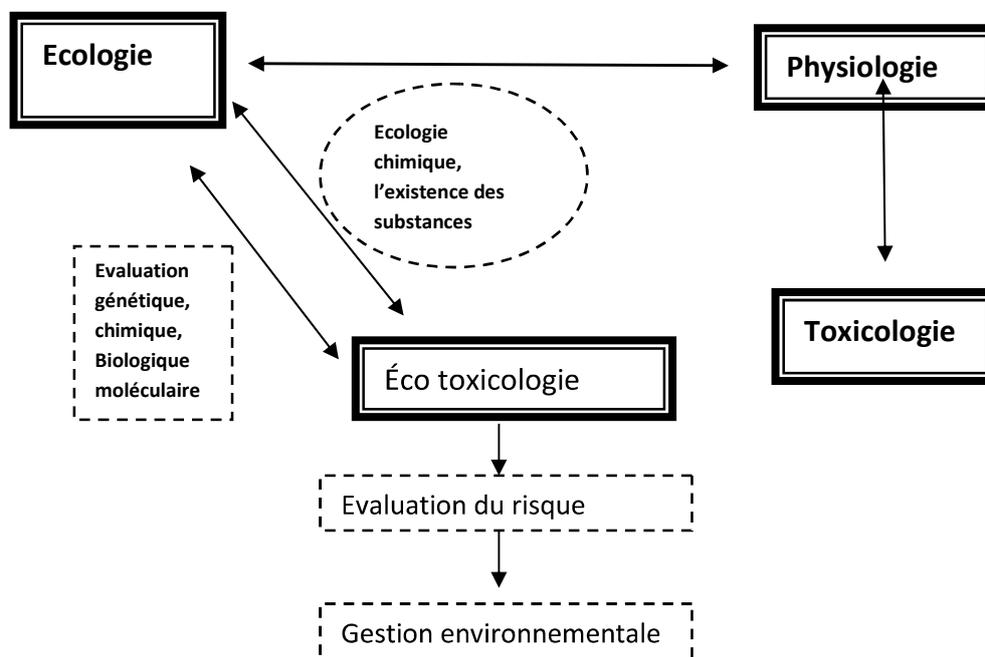


Figure 1 : Place de l'Écotoxicologie par rapport aux autres discipline et objectif.

2. Objectifs :

1

Connaitre les bases de la toxicocinétique et sa régulation ainsi que la toxicodynamique

2

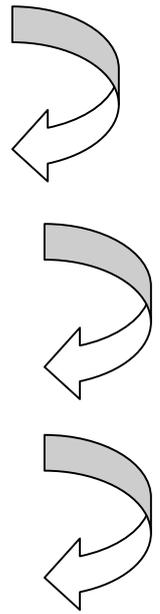
Connaitre les outils et les méthodes écotoxicologiques (bioessais, bioindicateurs, biomarqueurs, bioteneurs)

3

Évaluation des effets des polluants à partir de la structuration et fonctionnement des milieux naturels

4

Connaitre les processus de contaminations de milieux (mode d'action et métabolisme)



CHAPITRE 1

GENERALITE SUR

L'ÉCOTOXICOLOGIE

I.1 Éléments de définitions

1. Ecologie : C'est la science globale des relations des organismes avec leur monde extérieur environnant, dans lequel sont inclus au sens large, toutes les conditions d'existence.

2. Ecotoxicologie :

La science qui étudie les interactions et les effets in situ de contaminants, sur les êtres vivants (animaux, végétaux) à différents niveaux (organisme, population, peuplement communauté) et le devenir de ces substances dans l'écosystème.

3. Toxicologie :

C'est la discipline qui étudie les substances toxiques qui provoquent des altérations biologiques menant à la mort, si les perturbations physiologiques sont intenses. La toxicologie est à la fois descriptive (modalités de contamination) et explicative (mécanismes d'action), elle évalue la toxicité (tests) et précise les mécanismes.

4. Ecologisme :

Isme = mouvement, c'est un mouvement, social, physiologique, politique.

C'est également un courant de pensée et d'action, qui pose la question du rapport entre la nature et la société dans un siècle où l'homme dénaturé, enfermé dans son rôle social, est la première victime de dysfonctionnement dans ce rapport.

5. Environnique

C'est l'ensemble des approches techniques qui gèrent les connaissances bio physio chimique permettant l'évaluation environnementale des objets bio physio chimique d'études et y'a compris nos actes.

6. Intégrologie 4 points nécessaires pour définir ce terme :

1. C'est une technique de gestion des savoirs applicables aux systèmes complexes étudiés par l'écologie et pratiqués par l'environnement
2. Elle est définie comme la science d'intégration globale des connaissances produites par les diverses spécialités étudiant le réel.
3. Son objet, est la gestion de la connaissance exhaustive, pertinente et explicite
4. L'intégrologie est à la fois sociale et concrète.

7. pollution

7.1. Définition : est une modification défavorable d'intervention négative du milieu naturel, qui apparaît en totalité ou en partie, comme un sous-produit de l'action humaine aux travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition.

***Facteurs abiotiques**

1. Des flux d'énergies (photosynthèse)
2. Des niveaux de radiations (certains aliments peuvent être dégradés à travers la lumière)
3. De la constitution physicochimique du milieu naturel.

***Facteur biotique**

L'abondance de certaines espèces

Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou indirectement à travers des :

-Ressources agricoles, ressources hydrauliques, autres produits biologiques

- Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'ils possèdent, les possibilités récréatives du milieu ou encore en laidissant la nature.

7.2. Sources de pollution

7.2.1. Production d'énergie :

Utilisation et gaspillage de ressources non renouvelables (extraction et combustion du pétrole, développement du transport routier)

7.2.2. Activités industrielles :

Émission des composés minéraux dans les trois compartiments environnementaux (air, eau, sol) :

Exemples 1 : métaux et métalloïdes comme le mercure, le plomb et le cadmium

Exemple 2 : composés organiques comme DDT, aldéhydes, phénols chlorés

Exemple 3 : matières plastiques comme le polyéthylène, le polystyrène

7.2.3. Diversification de l'industrie chimique :

1000 ou plus de substances nouvelles dont la nocivité et la toxicité sont souvent très mal connues.

7.2.4. Agriculture : les engrais et les pesticides.

7.2.5. Pollution anthropiques : qui perturbe les équilibres globaux avec le réchauffement climatique.

Exemples: Pluies acides de la transformation des oxydes de soufre en acide sulfurique et d'oxydes d'azote en acide nitrique (pH de pluie acide < 2.5), rejets de gaz propulseurs des aérosols (CFC) ayant un impact sur la couche d'ozone.

7.3. Classification des polluants :

Trois critères de classification des polluants

*selon la nature [3].

*selon l'abondance naturelle des éléments traces métalliques ETM.

*selon la taille des polluants [4].

7.3.1. Classification de Ramade 1977 : Ramade a classé les polluants selon leur nature:

*polluants physique : radiations ionisantes, pollution thermique, nucléaire.

*polluants chimique : les plus importants sont : les plastiques, pesticides en plus les nitrates, phosphates, métaux lourds, fluores et les hydrocarbures.

*polluants biologiques comme la matière organique morte, les microorganismes et les agents pathogènes.

7.3.2. Classification selon l'abondance naturelle des éléments traces métalliques ETM :

*68 éléments dont la concentration individuelle est inférieure à 0,1% (1%) avec un total de 0,6 de la masse de la croûte terrestre (élément mineur).

* 12 éléments majeurs dont la concentration est supérieure à 1% intervenant pour un total de 99,4%.

7.3.3. Classification de Bouche 2005 : Bouche classe les toxiques en quatre selon leurs tailles :

*Les méga polluants lorsque la substance considérée est constituée environ 1% ou plus de sol/sédiment (masse sèche).

Exemple : cas de matière organique morte.

*Génotoxiques : ce sont des substances qui agissent directement sur le fonctionnement d'ADN comme le cas des adduits se fixant sur l'ADN et induisant des dysfonctionnements cellulaires (cancers, tératogène).

*Les macropolluants lorsque la substance considérée représente quelques ppm(mg/kg) du substrat analysé.

Exemple : métaux lourds, ammoniac.

*Les micropolluants : lorsqu'il représente quelques ppb (ug/kg) du substrat.

Exemple : PCB HAP, dioxines, pesticides.

Nous pouvons distinguer :

-**Des micropolluants minéraux:** métaux lourds, silice, silicates, amiante, fluorocarbure (gaz propulseur des aérosols nocif pour la couche d'ozone).

-**Des micropolluants organiques non pesticides:**

- Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Et Hétérocycliques.

- Paraffines Chlorées.

- Aromatiques Halogénés.

- Aromatiques Halogénés Avec Oxygène.

- Aromatiques Volatils.

- Amines Aromatiques.

-Des Pesticides Et Biocides:

- Organo-Halogénés Aliphatiques (Lindane, Hch).
- Acides Phénoxyacétiques (2,4 D).
- Cyclodiènes (Aldrine).
- Triazines.
- Carbamates (Carbaryl).
- Organo-Phosphates (Malathion).
- Organo-Mercuriels.
- Benzoylurées.
- Benzoylhydrazine.

Comparaison entre les macropolluants et les micropolluants (partie du TD)

Différences entre les macropolluants et les micropolluants: Les micropolluants se distinguent des autres polluants par les caractéristiques suivantes:

- **Les sources** des micropolluants sont le plus souvent diffuses et difficilement contrôlables.
- Leur faible **concentration** dans les déchets gazeux, liquides ou solides rend leur élimination difficile et leur analyse délicate et nécessitant un ensemble de techniques particulières.
- Ils **pénètrent** facilement dans l'organisme.
- Ils entraînent des **perturbations** des écosystèmes ou des troubles métaboliques (par modification des réactions biochimiques de base telles le cycle de krebs ou par compétition au niveau d'une fonction essentielle) chez les organismes pour des doses très faibles, généralement inférieures à 1 ppm (1 mg/kg).
- Ils sont souvent peu **biodégradables**, s'accumulent dans l'environnement et leurs produits de dégradation peuvent être aussi dangereux que la molécule mère.

Tableau 1 : Comparaison entre les micropolluants et les macro polluants
(Synthèse personnelle « TD »).

Paramètres	Micropolluants	Macropolluants
Sources/Distribution	Diffusion facile	Diffusion difficile
Concentration/Doses	Emit dans l'environnement en faible concentration Agissant à des doses très faibles	Emit dans l'environnement en grande quantité Agissant à des doses très élevés
Analyses	Délicate	Facile/aisé
Pénétration	Pénétration facile	Pénétration difficile
Biodégradation	Peu biodégradable	biodégradables
Elimination	Difficile	Facile
Perturbation/Effets	Perturbation des écosystèmes et troubles métaboliques chez les organismes	Déséquilibre écologique

I.2.Objectif et contraintes

I.2.1. Objectif

L'écotoxicologie est une excoissance de la nécessité de l'homme de se protéger de préserver la base de sa survie, l'équilibre de la nature, contre les effets de ses propres produits. Pour cela il sera intéressant d'étudier donc la relation entre le polluant et le milieu :

- *transfert de polluant
- *biodégradation (qui peu se faire à l'extérieur ou à l'intérieur)
- *bioaccumulation et biotransformation.

I.2.2.Contraintes

Il existe quatre problèmes de l'écotoxicologie appliquée

- *Complexité liée à la diversité des composants de l'écosphère,
- *Variation spatiotemporel des facteurs écologiques qui caractérise le milieu qu'en va étudier,
- *Complexité liée à la diversité quantitative et qualitative de contaminant,
- *Multiplicités des mécanismes d'adaptation ou de tolérance, mise en ouvre par les mécanismes exposées par la pollution.

I.3. Méthodologie et approches

I.3.1.Méthodologie :

*Les objectif de l'écotoxicologie appliquée peuvent se faire à différents niveaux d'intégration de la molécule (la plus petite), et la plus élevé (biocénose) et entre les deux extrémités, et ceci à fin d'estimer ou d'évaluer l'influence des différents facteurs de contaminations.

*Les méthodologies qui sont développées en écotoxicologie peuvent êtres distingué selon deux critères :

***Échelle expérimentale** : qui dépend du niveau d'intégration

***Degré de représentativité** : par rapport au phénomène naturel depuis les tests monospécifiques jusqu'au l'étude de terrain sur les écosystèmes naturel en passant par les essais en laboratoire à l'aide des molécules écotoxicologiques, les écosystèmes contrôlées, chaque niveau d'intégration ou échelles expérimentale implique un degré de réductionnisme plus au moins important, associée à un niveau de compréhension des mécanismes étudiés et un risque d'extrapolation.

I.3.2.Approches : Il existe trois approches :

I.3.2.1. Approche réductionniste :

Qui se fait au laboratoire, propre à la toxicologie, l'étude physio toxicologie des effets des polluants sur des organismes ou des modèles cibles. Portant sur les « Bas » niveaux

d'organisation biologique, allant de la biologie moléculaire à la physiologie individuelle voire l'écophysiologie [5].

I.3.2.2. Approche holistique :

Qui se fait au niveau d'un écosystème (milieu). C'est l'étude des mécanismes de contamination des milieux (transfert, transformation, impact sur biocénose), portant sur les « Hauts » niveaux d'organisation du vivant, allant de l'écologie des populations, puis à celle des communautés (multi-spécifiques) jusqu'à l'écosphère

* Cette approche complexe est centrée sur les écosystèmes.

I.3.2.2. Approche intégrative et comparative

C'est l'étude des mécanismes de contamination par l'existence de plusieurs espèces, chaîne trophique (alimentaire).

NB : les deux dernières approches concernent l'écotoxicologie appliquée.

I.4. Normes: Les experts écotoxicologues ont défini des doses maximales dites admissibles pour les principaux contaminants présents dans l'environnement. Ces doses sont considérées comme inoffensives pour notre espèce, même en cas d'exposition interrompue pendant toute une vie.

*La plupart des normes sont d'origine anglo-saxonne et sont désignées généralement par leurs abréviations en anglais. Ces normes ne s'appliquent qu'aux produits industriels et agricoles ayant fait l'objet d'un test de toxicité et d'une demande d'agrément.

I.3.1.ADI (*Acceptable Daily Intake*): c'est la quantité de polluant à laquelle peut être soumis quotidiennement un être humain sans induire des effets nocifs. Elle est établie à partir d'expériences réalisées sur rat (la dose obtenue sur rat est divisée par 100 pour obtenir l'*ADI* concernant l'homme).

I.3.2.TLV (*Threshold Limit Value*): c'est la concentration maximale de polluant admissible dans l'air des lieux de travail pour une exposition de 8 heures maximum par jour.

I.3.3.DMT *Dose maximale tolérable*: cette notion implique le concept de rapport bénéfique/risque. La dose maximale tolérable est établie en fonction d'un seuil économiquement rentable à ne pas dépasser vers le bas et du danger que les polluants fabriqués présentent pour la santé publique.

I.3.4.MRF *Maximum Recommending Field* : C'est la dose maximum recommandée par le fabricant pour un traitement au plein champ (terrain).

I.5. Les Bioteneurs

I.5.1. Bioconcentration: c'est la capacité qu'a un organisme de stocker une substance à une concentration supérieure à celle de milieu de vie (l'eau ou de la nourriture). Elle est appréciée par un facteur de bioconcentration $FC = \frac{\text{concentration de pesticide dans l'organisme}}{\text{concentration de pesticide dans le milieu}}$. Ce facteur dépend du milieu et le mode d'action du pesticide [6]

I.5.2. Biomagnification ou bioamplification:

elle désigne une accumulation progressive d'une substance *via* la chaîne alimentaire. Elle est caractérisée par le facteur de transfert (FT) :

$FT = \frac{X1}{X0}$; **X1** : niveau trophique supérieur (n+1) ; **X0** : niveau trophique inférieur(n).

FT dépend de ce qui est absorbé par l'organisme en fonction du :

- a) Poids de l'organisme
- b) Niveau de contamination des proies.

NB/*Si $FT > 1$ Biomagnification

*Si $FT < 1$ pas de biomagnification

*Si $FT = 1$ simple Transfer de polluant

I.5.3. Bioaccumulation(FC): Est un terme qui englobe biomagnification et bioconcentration. La bioaccumulation résulte d'un phénomène de transfert et d'amplification biologique de la pollution à travers les biocénoses contaminées. Elle est caractérisé par :

***Le coefficient de partage ou de partition (P) :** C'est le rapport de la solubilité d'une substance (polluant) dans un solvant (*Octanol*) sur la solubilité du même polluant dans l'eau, il permet l'accumulation d'un polluant dans les graisses qui est désigné par **$KOW = \log P$**

- a. Si le $\log p > 3$ (substance bioaccumulable)
- b. Si le $\log p < 3$ (substance non bioaccumulable).

Le $BCF = Kow$ *solubilité d'un polluant dans les lipides.

Si $BCF > 100$ (substance bioaccumulable).

I.5.4. Biodisponibilité : C'est la propriété d'un élément ou d'une substance d'atteindre la membrane biologique des organismes contaminés. Cette notion souvent appliquée pour les éléments trace métalliques.

I.5.5. Biodégradation

La biodégradation détermine la dégradation des pesticides dans les sols, dans les eaux par les micro-organismes. La dégradation des contaminants est évaluée par deux paramètres : Demi-vie (DT50) et le taux de dégradation [7].

I.6. Niveaux d'étude des polluants:

L'action des polluants peut être envisagée à 5 niveaux:

- A/ Le Niveau Biochimique Et Cellulaire,
- B/ Le Niveau Des Organismes,

C/ Le Niveau Des Populations,

D/ Le Niveau Des Ecosystèmes Naturels,

E/ le niveau des écosystèmes contrôlés (=écosystèmes expérimentaux ou bassins de simulations).

a. Le niveau biochimique et cellulaire:

Les effets des polluants sont examinés aux plans enzymologie, endocrinologie et histologie.

b. Le niveau des organismes:

L'impact des polluants est étudié sur :

- la croissance, le développement et la reproduction,
- la physiologie comme par exemple le métabolisme respiratoire,
- le comportement: On distingue quatre seuils de réponses éthologiques de l'animal en présence d'un polluant ou altéragène :

1/ Détection,

2/ Altération du Comportement Appétitif,

3/ Comportement adaptatif de défense,

4/ Comportement aberrant.

c. Le niveau des populations:

Il s'agit de travaux à vocation écologique de longue durée qui seront réalisés sur le terrain; pour chaque population étudiée sont considérés les paramètres suivants:

- paramètres de structure: détermination des classes d'âge et des classes de génération.
- paramètres de fonction: détermination des taux de croissance des individus des différentes classes d'âge et les taux de reproduction par exemple.

d. Le niveau des écosystèmes naturels:

Il s'agit de déterminer d'une part les paramètres de structure en précisant les espèces appartenant aux différents niveaux trophiques (producteurs, herbivores, carnivores...), d'autre part de déterminer les paramètres de fonction qui touchent diverses activités métaboliques comme l'activité bactérienne et l'activité photosynthétique. Ces études sont plus difficiles à mettre en œuvre, plus coûteuses et de longue durée que les études réalisées aux niveaux précédents.

e. Le niveau des écosystèmes contrôlés:

Il n'est qu'une variante du niveau des écosystèmes naturels. Il permet de combler le vide qui existe entre les essais de laboratoire et l'observation du milieu naturel. Les études portent sur de petits écosystèmes tels les microcosmes (quelques litres) ou mésocosmes (quelques m³). La durée est comprise entre 1 mois et 1 année.

On distingue deux types de recherche:

1/ les recherches menées en laboratoire (difficilement extrapolables pour le milieu naturel), se réalisant au niveau biochimique et des organismes et permettent d'établir des seuils d'action (toxicité d'une substance et normes) pour un niveau donné.

2/ des recherches de terrain (niveau des populations et niveau des écosystèmes naturels) plus réaliste sur le plan écologique, plus longue et coûteuse.

I.7. Règle des trois actions polluantes

(partie du TD): Mode d'action/Métabolisme des Xénobiotiques

A. Liaison aux constituants chimiques des organismes au moyen d'un groupement chimique simple:

Une substance est qualifiée de polluante lorsqu'elle est étrangère au milieu naturel mais qu'elle peut se lier aux constituants chimiques des organismes au moyen d'un groupement chimique simple. Ainsi, sa nature étrangère au milieu modifie les réactions biochimiques de base. Si le mercure métallique présente un certain danger (troubles du métabolisme et des équilibres au niveau des écosystèmes terrestres et aquatiques), ce sont surtout les sels de mercure et les dérivés organomercuriels qui sont les plus à craindre pour la santé et l'environnement). Le mercure fait partie d'une famille de pesticides organo-mercuriels très efficaces dans la protection des semences contre divers parasites (bactéries, champignons, insectes).

Exemple: le méthyl-mercure ou le nitrate de méthyl-mercure (la liaison électrovalente, leur confère une hydrosolubilité donc une entrée facile dans le milieu aquatique tandis que le radical méthyl leur permet de s'insérer dans les cycles biochimiques).

Beaucoup de micropolluants agissent selon ce type de mécanisme. C'est le cas, en particulier, des micropolluants cancérigènes tels les **amines aromatiques** ou les **hydrocarbures poly aromatiques**.

B. Caractéristiques réactionnelles et structurales du polluant semblables à celles des fonctions chimiques constitutives des organismes:

Le polluant présente des caractéristiques réactionnelles et structurales semblables à celles des fonctions chimiques constitutives des organismes. Il y a alors compétition.

Exemple: l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Cette enzyme inactive un médiateur chimique l'acétylcholine qui est libéré dans l'intervalle synaptique et se fixe sur les plaques motrices du muscle provoquant l'apparition d'un potentiel d'action responsable des contractions musculaires. À défaut d'enzymes inactivant ce médiateur chimique, il s'établit un blocage de la synapse et une contraction continue des muscles aboutissant à un état tétanique.

Les insecticides organophosphorés, tels le **malathion** et les **esters phosphoriques de synthèse**, sont de puissants inhibiteurs des acétylcholinestérases. En effet, ils agissent en se fixant de façon irréversible sur les sites actifs de l'enzyme. Dès lors, l'acétylcholine s'accumule dans les synapses provoquant une stimulation constante des muscles entraînant une paralysie tétanique). Les insecticides organophosphorés sont encore utilisés. Ils présentent

une toxicité aiguë très élevée provoquant des troubles profonds du système nerveux suite à un blocage des acétylcholinestérases.

C. Déplacement par les polluants les équilibres dans l'environnement:

Le polluant est un composé naturel et un élément essentiel, tel le phosphore ou le zinc par exemple, dont la présence dans l'environnement en concentration élevée déplace les équilibres. Exemple: le phénomène d'eutrophisation. Lorsque les nutriments comme les phosphates ou les nitrates provenant des amendements agricoles ou des détergents, sont présents en quantités très importantes dans l'environnement aquatique, il peut y avoir un développement excessif des producteurs, ce qui va entraîner une consommation accrue d'oxygène. Ce phénomène particulier de la pollution est bien connu; il s'agit de l'eutrophisation).

CHAPITRE 2

ÉCOTOXICOLOGIE DES MILIEUX

AQUATIQUES

CHAPITRE 2 : ECOTOXICOLOGIE DES MILIEUX AQUATIQUES

II.1. Définition : L'Écotoxicologie des milieux aquatiques consiste à étudier les effets des polluants et produits chimiques anthropiques sur la qualité de l'eau (paramètres physicochimiques, organoleptique et résidus des pesticides), ainsi que sur la faune et la flore aquatiques.

II.2. Tests de toxicité in vivo et in vitro des écosystèmes aquatiques

Pour les écosystèmes aquatiques, de nombreux tests ont été développés tant sur des vertébrés, des invertébrés que sur des végétaux. Signalant les tests réalisés sur des algues unicellulaires, sur les daphnies et sur diverses espèces de poissons appartenant aux genres salmo (*S. gairdneri*) et brachydanio (*B. rerio*). Ces deux espèces de poissons servent surtout dans le cadre d'étude d'impact des pesticides organochlorés.

NB/Le choix du test dépend des propriétés de la substance à tester ainsi que des exigences réglementaires.

Nous vous proposons plusieurs tests in vitro.

***Test de reprotoxicité :** Elle étudie l'effet des reprotoxiques (pesticides, métaux lourds, perturbateurs endocriniens) altérant la fécondation la fertilité, l'état physiologique des organes et l'appareilles sexuels, sécrétion hormonale par la glande.

***Test de la tératogénicité :** C'est l'étude des malformations de fœtus qui est provoqué par la mère transmis au fœtus, en étudiant : le retard de croissance (au niveau neurologique (si le retard à la fin de gestation pas de problème).

Selon **Marks 1991** le risque tératogène se manifeste de manière conventionnellement classé en 4 groupes par ordre de gravité croissante (de – grave au + grave) :

1. Les malformations
2. les déficits fonctionnels
3. Retards de croissance
4. mort

***Tests hormonale:**des tests écotoxicologiques des régulateurs de croissance (**Novaluron**) sur les larves des moustiques (*Culex pipiens*) en étudiant l'aspect structural et de développement et même hormonale « ecdystéroïdes » [8].

***Tests de cytoxicité :** Elle peut être évaluée sur les mouvements cellulaires, notamment la motilité spermatique, on dénombre dans un champ d'une préparation microscopique la proportion d'un spermatozoïde immobilisé, ce test est remplacé par la mesure de l'activité des α glucosidase qui est un indice de la motilité des spermatozoïdes (Seloviljoen et al. 1990)

***Test des biomarqueur** (AChE, GST). Le dosage des biomarqueurs (enzymatiques) détermine l'état enzymatique sur organisme (induction ou inhibition) Ex : l'impact du

cadmium su *Gambusia affinis affinis*). Des travaux écotoxicologique aussi sur *Donax trunculus* ont été réalisés dans le cadre de la biosurveillance de la qualité des eaux du golf d'Annaba [9].

NB/ *la présence de certain micropolluant provoquant l'apparition de troubles métaboliques.

*Certaines substances n'altèrent pas le récepteur de l'hormone, mais agissent sur l'hormone elle-même.

*D'autres substances comme les phtalates bloquent le transport de l'hormone, en particulier les hormones lipophiles dépendantes de transporteurs pour atteindre leurs cellules cibles, comme la Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) [10].

II.2.1. Objectif des tests écotoxicologiques

Les tests de toxicités ont pour objectif d'évaluer et de déterminer le potentiel toxique d'une substance qu'il s'agisse d'effets aigus ou à long terme, consiste à préciser divers paramètres qui caractérisent son action non pas au niveau de l'individu mais aussi au niveau d'une population.

La principale conséquence d'une intoxication est la mort des organismes qui s'exprime par un taux de mortalité.

Ces objectifs comportent un ensemble d'actions et critères qui précèdent, accompagnent ou suivent les actions dommageables envers les écosystèmes (**Tableau 2**):

Tableau 2 : Critères influençant sur les tests écotoxicologiques (Synthèse)

Paramètres	Objectifs
La prédiction du risque	Doit éviter à l'économie, le cout de projets comportant un danger.
Le diagnostic	Intervient après la constatation des dégâts, pour identifier les causes, afin d'y porter remède.
La réglementation	Doit s'appuyer sur des critères objectifs, équitables et décisifs, équitables et décisifs. en cas de défaut de données suffisamment précise, le principe de précaution doit prévaloir, et au minimum d'importants coefficients de sécurité doivent être adoptés.
La cartographie	Des zones contaminées doit être tenue à jour, y 'a compris pour des contaminations de faibles niveaux apparents, en particulier lorsque l'on se trouve en présence de mélanges complexes de substances.
Le classement	Par niveau de risque est indispensable face à la multiplicité des molécules utilisées.

AchE : Acétylcholinestérase, biomarqueur de neurotoxicité
 GST : Glutathion-S-transférae, bimarqueurs de détoxification

II.1.2. Caractéristiques des tests écotoxicologiques

Ces tests doivent remplir au préalable un ensemble de conditions qui sont nécessaires pour l'évaluation des risques toxicologiques avec des objectifs bien ciblé et sur des organismes bien choisis dans des conditions expérimentales favorable pour des résultats et capacité informative élevée (**Tableau 3**):

Tableau 3: Caractéristiques des tests écotoxicologiques (Synthèse)

Caractéristiques des tests	Objectifs
La pertinence biologique	Exige que le test soit capable de contribuer au maintien de l'équilibre d'une communauté, et non d'une organisme-type isolé.
La pertinence sociale	Doit faire émerger un consensus parmi les experts et rendre le test accessible à un grand nombre d'entre eux.
La sensibilité de la réponse	Du test aux facteurs toxiques doit à la fois bannir les formes binomiales et la variabilité excessive.
La polyvalence	Du test doit le rendre applicable à divers facteurs et sur différents sites.
Le diagnostic de causalité	Doit être favorisé par le test. l'anamnèse est l'ensemble des renseignements fournis au médecin par le malade ou son entourage sur les circonstances qui ont précédées un état pathologique
Les paramètres statistiques	Doivent être définis par un protocole opérationnel précis.
L'interprétation des résultats	Doit pouvoir dégager des conclusions claires.
Le cout	Doit minimal pour des capacités informatives élevées.
capacité intégrative du test	Doit fournir des informations sur des cibles non étudiées.
Des données historiques	Disponibles pour fournir des indications quant aux précédents et sur la dynamique antérieure des écosystèmes.
Le caractère préventif	Des tests doit permettre d'anticiper sur le risque de dégâts trop élevés.
Réalisation des tests	En condition non destructives des écosystèmes naturels.
continuité des mesures	Doit être possible dans le temps.
pertinence d'échelle	Doit être compatible avec la dimension spatiale du système étudié.
non redondance	D'information pour éviter le double emploi.
pertinence du temps	Doit permettre au test de fournir des informations nécessaires dans des délais assez courts.

II.2.3. Condition expérimentales

Dans tout essai toxicologique, il convient de respecter trois conditions essentielles :

***Homogénéité des échantillons** par une sélection d'individus de même sexe, âge et de même poids.

***Utilisation d'une technique d'administration** du xénobiotique analysé en assurant une normalisation des conditions expérimentales pendant toute la durée du test.

***Recueillir avec discernement les données** expérimentales et les analyser avec des tests statistiques appropriés.

II.2.4.Mode d'application des polluants en milieu aquatique

***Végétaux** : chez les unicellulaires (algues), sont réputées sensibles aux polluants d'origine métalliques, notamment *P. subcapitata* en ce qui concerne les substances pures (Santiago et al. 2002), elle est utilisée pour les tests écotoxicologiques en raison de sa facilité de culture et sa croissance rapide

***Insectes** : **administration** par contact, ingestion, injection, trempage (dipping) ou application topique dans les expérimentations in vivo, et addition au milieu de culture (cellule, organes, tissus) dans le cas de systèmes in vitro. Ex : moustiques (*Culex pipiens*)

***Vertébrés (poissons)** : même modes d'application que sur insectes. Ex: *Gambusia affinis*. Selon les manifestations dans le temps, on distingue deux types de toxicité (**Figure 2**):

- La toxicité aiguë se manifeste après une exposition très courte à une concentration élevée de substance toxique
- La toxicité chronique se manifeste après une exposition longue à une concentration faible de la substance toxique. (Fig.2)

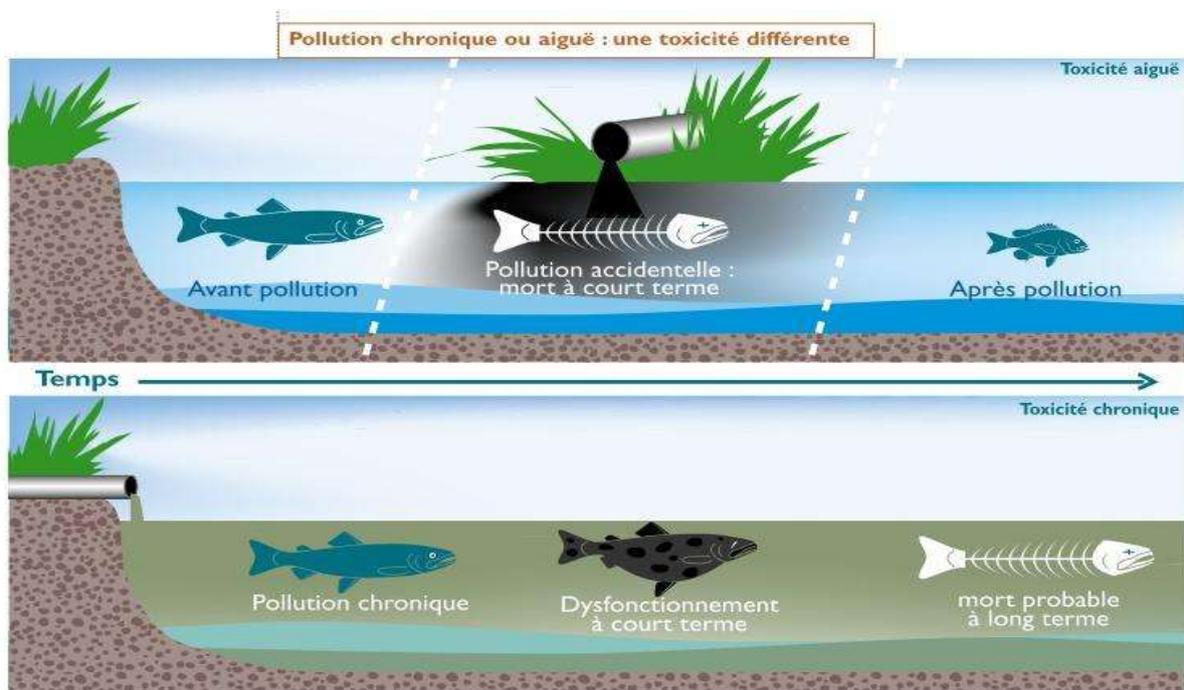


Figure 2 : Toxicité aiguë et chronique dans le milieu aquatique.

Agence de l'eau Rhône Méditerranée sierm.eaurmc.fr/sdage/documents/guide-technique-sdage-7.pdf

II.2.5. Paramètres de létalité :

La mortalité constitue la phase extrême de la toxicité d'un polluant. Elle peut être observée au niveau de cellules isolées (cytotoxicité, système in vitro) ou d'organismes entiers (létalité des organismes, système in vivo).

II.2.5.1. Dose et concentration létales :

En pratique on détermine la dose létale 50 (*DL50*) ou la concentration létales 50 *CL50* des différentes formes et modes de toxicité dans la nourriture ou l'eau.

Une mortalité de 50% des animaux testés au terme d'une période courte d'intoxication (24, 48, 72, 96h) appelle une toxicité aigue. À partir de ces tests, il est possible de calculer la *DL10* qui marque la limite entre toxicité aigue et subaigüe et la *DL90* dont l'intérêt pratique est évident dans la recherche intentionnelle de la toxicité (screening de pesticides).

II.2.5.2. Temps létales :

Une seconde méthode consiste à déterminer les mortalités consécutives à l'application d'une dose constante en fonction de temps croissants.

Il est alors possible de calculer le temps létales moyen *TL50*, temps théorique au bout duquel doivent périr 50% des individus exposés à une teneur déterminée de toxique.

II.2.5.3. Traitement des données

Les données obtenues font l'objet d'un traitement statistique et d'une analyse des probits comprenant les étapes suivantes :

*Mortalité observée

*Mortalité corrigée [11] : $\text{Mortalité corrigée (\%)} = (Y - X) / (100 - X) * 100$

X : Nombre d'individus vivants dans le lot témoin ;

Y : Nombre d'individus vivant dans le lot traité

*Transformation angulaire (Bliss, cité par [12].

*Analyse de variance à un critère de classification AV1.

*Classement des concentrations (test de Tuckey).

*Transformation en probits (Fisher et Yates, 1957).

*Droite de régression *CL50* et *CL90* [13].

*Intervalle de confiance [14].

II.2.6. Génotoxicité et Mutagénicité

II.2.6.1. Définition de Génotoxicité:

Les altérations du génome peuvent se manifester à des doses très faibles et entraîner des conséquences très graves pour la survie de l'organisme et éventuellement de sa descendance. L'évaluation de la génotoxicité des contaminants environnementaux est l'un des premières études écotoxicologiques [15]. L'aberration chromosomique concerne l'anomalie détectable par

examen microscopique effectué au stade métaphase : cassure de chromosome, modification de structure et d'appariement, erreur au cours de la mitose (échanges chromatide sœurs).

II.2.6.1. Mutagénicité

Les mutations (mutagénicité) proviennent d'effets ponctuels (modification d'un nucléotide entraînant le remplacement d'un seul acide aminé dans la protéine codée) ou de modification portant sur plusieurs bases à la fois. La détection des effets mutagènes repose sur trois principes généraux :

*Mise en évidence sélective des mutants

*Mise en œuvre des systèmes de réparation des altérations de l'ADN par la cellule vivante ;

*Addition de molécules exogènes sur la chaîne d'ADN

*Les résultats sont attendus au niveau de la structure des protéines d'inactivation ou modification de l'activité des enzymes, des hormones ou des récepteurs.

NB/Les tests de mutagénicité peuvent donner des indications précieuses sur les pouvoirs mutagènes et cancérigènes des micropolluants.

Exemples :

***Test d'Ames** : il est basé sur les travaux de B. Ames sur la biosynthèse de l'histidine. Ce chercheur a montré qu'une bactérie *Salmonella typhimurium* mutée (mutant histidine dépendant ou his-) ne peut se développer sur un substrat dépourvu d'histidine. L'adjonction d'une substance mutagène à une telle bactérie provoquera l'obtention de mutant reverse (his+) capable de synthétiser l'histidine.

***Test Drosophile** : *Drosophila melanogaster* a quatre paires de chromosome géant dans les glandes salivaires et il est facile de suivre les mutations sous l'effet d'un micropolluant.

***Tests cytogénétiques** : Ils sont notamment réalisés sur des cellules de moelle osseuse des rongeurs.

Exemple Effets Clastogènes du Methylmercure sur les poissons

« Skerfving a mis en évidence en 1971 chez des consommateurs de poissons très contaminés par du méthylmercure, les effets clastogènes de ce toxique dans des lymphocytes. Les clichés ci-dessus montrent la présence de cassures de chromosomes (à gauche), ainsi que l'absence de centromère (à droite) dans des lymphocytes » Skerfving et al. 1971 (**Figure 3**)

D'autre part, il a observé chez les mêmes personnes la présence de chromosomes surnuméraires (Skerfving et al. 1971)

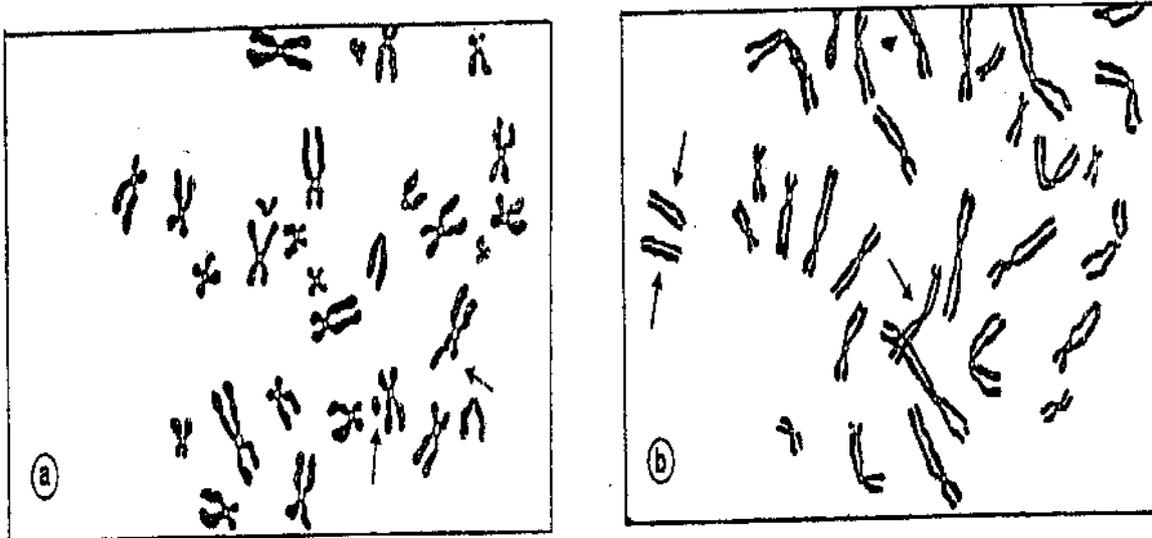


Figure 3 : Effets clastogènes du méthylmercure (Skerfving et al. 1971).

II.3. Impact des activités humaines sur les écosystèmes aquatiques

L'eau est agressée par différentes sources de pollutions à savoir : les rejets urbains, l'utilisation intensive des produits phytosanitaires, activités industrielles (métaux lourds), et aussi les déchets hospitaliers et produits pharmaceutiques influencent directement et présentent des altérations physiologiques sur les organismes dans différents milieux de vie (système endocrinien Ex : les hormones sexuelles).

II. 3.1 Impact des perturbateurs endocriniens sur les écosystèmes aquatiques

II.3.1.1. Définition d'un perturbateur endocrinien : Un perturbateur endocrinien (PE) désigne une substance ou un mélange exogène qui altère les fonctions du système endocrinien et induit en conséquence des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact (ou) de ses descendants... » (Voir le rapport State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012 - OMS)

II.3.1.2. Classification des perturbateurs endocriniens

On distingue souvent :

***Composés naturels:** Sont des hormones synthétisées par le Corps (progestérone, œstrogène, testostérone, insuline).

***Composés synthétiques :** sont la plupart du temps des hormones identiques aux hormones naturelles : elles comprennent :

- Les hormones utilisées dans les contraceptifs (progestérone et œstrogène) oraux
- Les hormones de traitement de la ménopause.

-Dans tous les cas, elles sont fabriquées et administrées à l'homme pour accomplir 2 tâches :

1. Pallier au manque ou déficit d'hormone du système endocrinien

2. Réguler le système endocrinien.

***Composés anthropique** : Sont des substances chimiques utilisées par les industries cosmétiques.

Remarque : Une liste des principales sources de PEs suspectées a pu être établie grâce à la liste SIN (Substitution immédiate nécessaire). Cette liste contient 46 substances, et elle est développée grâce à la collaboration de ChemSec avec les ONG, dont 14 sont utilisées dans le produit cosmétique: (**Tableau 4**) [16;17].

II.3.1.3. Effets des perturbateurs endocriniens : Au cours de ces dernières années, les scientifiques se sont mis d'accord pour se préoccuper des substances à action endocrine capables de perturber le système endocrinien et entraîner des effets néfastes sur :

- La reproduction
- La croissance et le développement
- Le système immunitaire
- Le système nerveux

*La littérature a en effet mis en évidence un grand nombre d'associations entre des expositions environnementales et des effets néfastes parmi lesquels des troubles du système nerveux, de la reproduction ou encore du développement embryonnaire.

*Effets du PCB sur les hormones thyroïdiennes des rats : diminution de la concentration des hormones circulantes T4, et une hyperplasie de la thyroïde a été mise en évidence après une exposition orale et sous-cutanée. Par la suite affectant le développement neurologique chez le rat [18;19].

*Les PE agissent sur le cerveau est générale c'est-à-dire tous le système nerveux (neurotransmetteur, neuromodulation, connections synaptique, glutaminergique, dopaminergique, ils interagissent sur le système base d'adrénaline et noradrénaline

Remarque 1: Les PCB et les pesticides se lient aux récepteurs des estrogènes (qui sont des récepteurs α et β nécessaires au développement du cerveau) perturbant leurs voies de signalisation dans les neurones.

Remarque 2 : sur les compartiments des PEs : les PE trouvent soit dans, cytoplasme, récepteurs membranaires, la membrane nucléaire, mitochondries, d'autres existent partout (toute la machinerie cellulaire) comme glutamate.

Tableau 4 : Liste non exhaustive des perturbateurs endocriniens reconnu ou potentiels utilisés dans les produits cosmétiques [16;17].

Substances	Modes d'emplois
Alkyphenol	Utilisé dans les nettoyeurs, mousse à raser
Benzophénone--1, 2 et 3	Utilisé dans les produits solaires en tant que Filtre UV
4,4--dihydrobenzophénone	
4--méthylbenzylidène camphor	
Éthylhexyle méthoxyciannamate	
3--Benzylidene camphor 3--BC	
Propylparabène	Utilisé comme conservateur
Butylparabène	Utilisé comme antioxydant et conservateur
Tert--butylhydroxyanisole (BHA)	
1,3--Dihydroxybenzene	Présent dans les teintures
Diéthyle phtalate(DEP)	Fixateur de parfum, solvant, durcissement des vernis
Dihexyle Phtalate (DHP)	
Triclosan	Utilisé comme conservateur
Triphenyl phosphate (TPHP)	Utilisé dans les vernis à ongles

II.3.1.4.Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens agissent selon trois mécanismes principaux [20;21], (Figure 4). Ils peuvent :

1. Imiter l'action d'une hormone et provoquer des réactions inopportunes de l'organisme,
2. Bloquer l'action d'une hormone en l'empêchant d'agir sur ses cellules cibles,
3. Perturber la production, le transport, l'élimination ou la régulation d'une hormone ou de son récepteur.

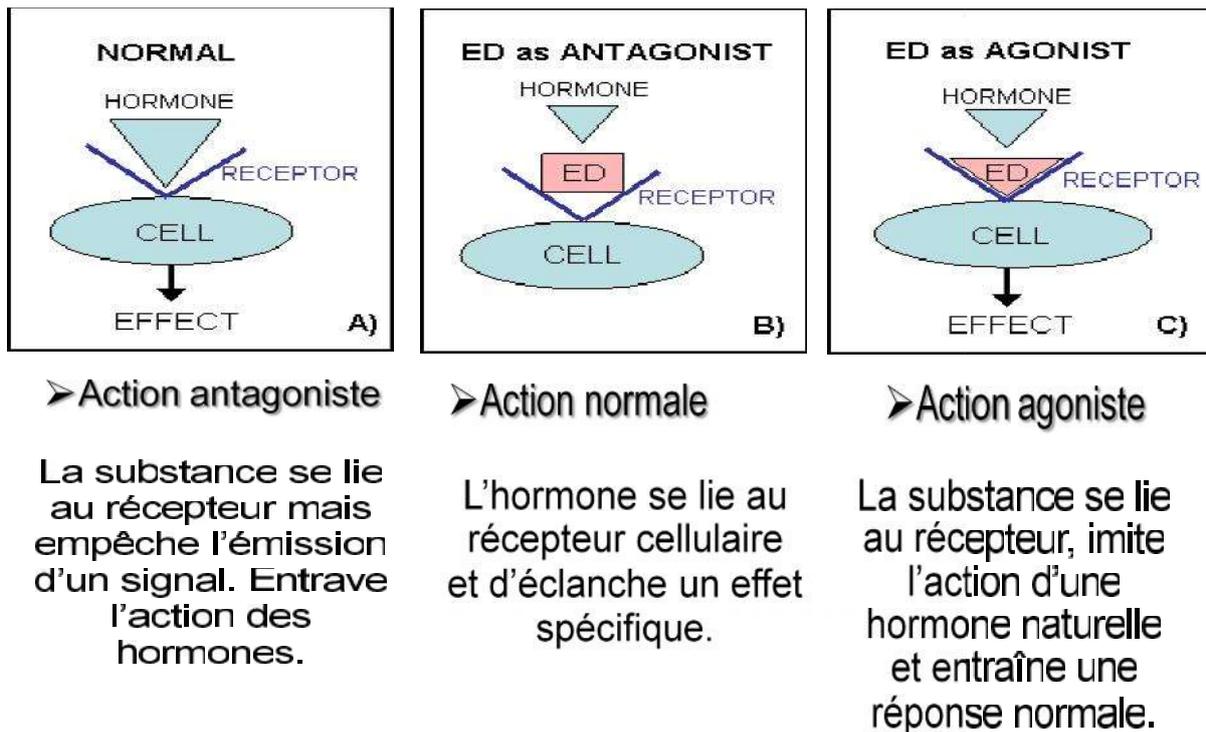


Figure 4 : Action des perturbateurs endocriniens.

II.4. Qualité écologique du milieu aquatique

*Règles d'évaluation de l'état des eaux

La directive cadre sur l'eau (DCE) définit « bon état d'une eau de surface » comme étant « l'état atteint par une masse d'eau de surface lorsque son état écologique et son état chimique sont au moins « bon » : le bon état est atteint lorsque l'état écologique et l'état chimique sont bons. Ainsi, l'état écologique « est déterminé par un ensemble de variables biologiques (algues, macrophytes, invertébrés, poissons), par comparaison à des états de « Référence », et de paramètres physico-chimiques (dont les substances dites « pertinentes »).

L'état chimique, quant à lui, « est établi sur la moyenne des concentrations des substances listées en annexe de la DCE. Il est bon si toutes les substances sont en concentration inférieure à leur Norme de Qualité Environnementale (NQE) » [22].

*Le bon état d'une eau souterraine

L'état d'une masse d'eau souterraine est déterminé par la plus mauvaise évaluation de son état quantitatif et de son état chimique.

1. **L'état quantitatif** est considéré comme bon lorsque les prélèvements de la nappe ne dépassent pas la capacité de renouvellement de la ressource disponible.
2. **L'état qualitatif** est déterminé par les paramètres chimiques les plus déclassants. Les valeurs seuils correspondent aux normes établies pour l'alimentation en eau potable, sauf pour les nappes alluviales qui doivent aussi respecter le principe de non dégradation des écosystèmes de surface.

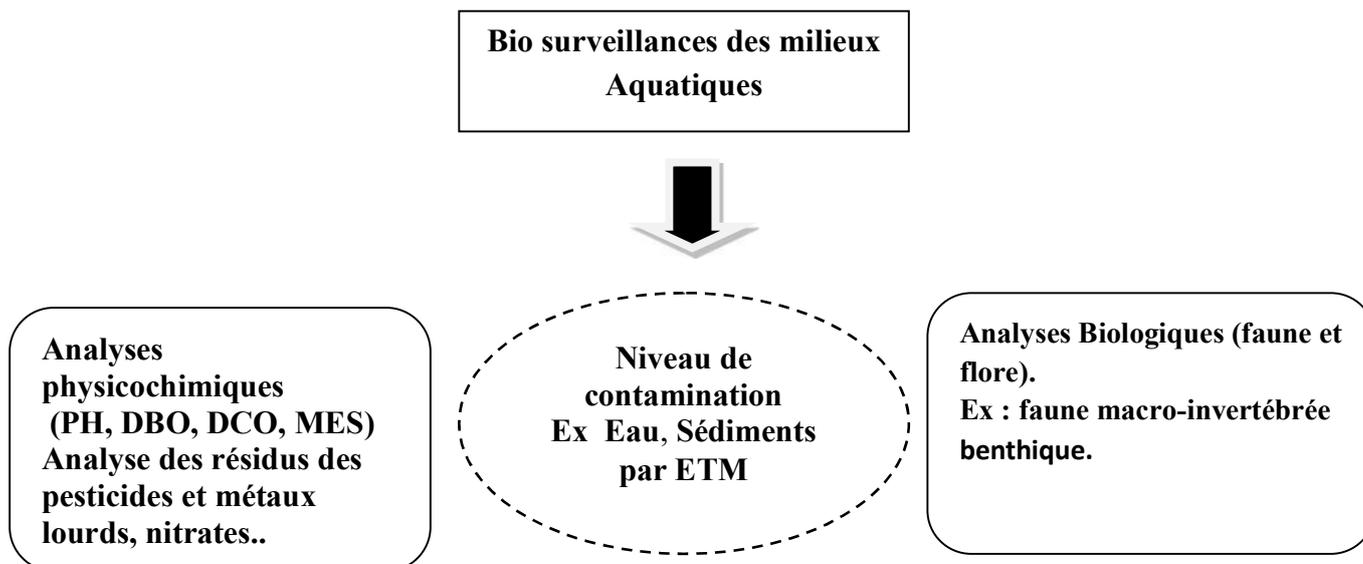


Figure 5 : Principe de l'évaluation de la qualité du milieu aquatique.

DBO : demande biochimique en oxygène, Les phénomènes d'auto-épuration dans les eaux superficielles résultent par la dégradation des charges organiques polluantes par les micro-organismes. L'activité de ces derniers tend à consommer de l'oxygène et c'est cette diminution de l'oxygène dans le milieu qui est mesurée par la DBO 5

DCO : demande chimique en oxygène, représente l'ensemble des matières oxydables

PH : potentiel hydrogène, cette mesure physico-chimique effectuée à l'aide d'un pH mètre, permet de savoir si l'échantillon d'eau est acide, basique ou neutre.

ETM : élément trace métallique

MEST : La teneur et la composition minérale ou organique des matières en suspension dans les eaux sont très variables. Cependant des teneurs élevées en MEST peuvent empêcher la pénétration de la lumière, diminuer l'oxygène dissous et limiter alors le développement de la vie aquatique et créer des déséquilibres entre diverses espèces.