



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE CELLULAIRE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Science Biologiques

Spécialité : Toxicologie Fondamentale et Appliquée

Intitulé

Impacts des facteurs environnementaux sur la toxicité potentielle des résidus médicamenteux

Présentée par : Mr. BELHAMZAOUI Khaled

Directeur de thèse : Pr. DJEBAR Med-Réda

(Centre de Recherche en Environnement)

Membres du jury :

Dr. KADRI Skander	Prof	Université Badji-Mokhtar Annaba	Président
Dr. ISSAAD Ghozlène	MCA	Université Badji-Mokhtar Annaba	Examinatrice
Dr. BENOSMANE Sana	MCA	Université du 08 Mai 1945 de Guelma	Examinatrice
Dr. ALAYAT Amel	MCA	Université Chadli Bendjedid El Tarf	Examinatrice

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

Cette thèse représente le fruit de plusieurs années de recherche intensive, et je suis profondément reconnaissant envers toutes les personnes qui ont contribué à son aboutissement.

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers **M. DJEBAR Mohammed Réda** Professeur à l'Université Badji-Mokhtar Annaba, et Directeur Adjoint au Centre de Recherche en Environnement à Annaba, pour son engagement sans faille en tant que directeur de cette thèse. Ses précieux conseils, son soutien indéfectible et son expertise ont été essentiels à chaque étape de ce travail de recherche.*

*Je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers **Mme. BERREBBAH Houria** Professeur à l'Université Badji-Mokhtar Annaba et Directrice du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Sa bienveillance, son soutien constant et son suivi attentif de mes recherches ont été d'une importance capitale. Je suis extrêmement reconnaissant pour ses précieux conseils qui ont grandement enrichi mon parcours de recherche.*

*Je suis profondément reconnaissant envers **M. KADRI Skander** Professeur à l'Université Badji-Mokhtar Annaba, pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Sa disponibilité et son intérêt pour mon travail ont été des éléments essentiels qui ont contribué à la réussite de cette soutenance.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Mme. ISSAAD Ghozlène** Maître de conférences à l'Université Badji-Mokhtar Annaba, pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Je suis profondément reconnaissant de sa contribution à l'évaluation de mon travail de thèse.*

*Je tiens également à remercier **Mme. BENOSMANE Sana** Maître de conférences à l'Université de Guelma, pour avoir pris sur son temps et accepter d'examiner ce travail et participer à ce jury.*

*Je présente mes sincères remerciements à **Mme. ALAYAT Amel** Maître de conférences à l'Université d'EL Tarf, pour avoir examiné mon travail. Je suis profondément reconnaissant de son engagement envers l'évaluation de ma thèse.*

*Je souhaite également exprimer ma gratitude à tous **mes professeurs** pour leur enseignement consciencieux et leur richesse d'informations. Leur dévouement à transmettre leur savoir a grandement contribué à mon développement académique et professionnel.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers **mes parents** et **mes Sœurs**. Leur amour, leur soutien indéfectible et leurs sacrifices ont été les piliers essentiels qui ont rendu possible la réalisation de ce travail. Leur encouragement constant et leur confiance en moi ont été une source inestimable de motivation tout au long de ce parcours. Je leur suis infiniment reconnaissant pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.*

*Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance envers **M. TICHATI Ladhari** et **M. DAHDOUH Faouzi** pour leur précieuse contribution à ce travail. Leur expertise, leur soutien et leurs conseils ont été d'une importance capitale tout au long de cette recherche.*

*Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à mes collègues et amis et surtout **Mme. LAOUABDIA SELLAMI Meriem** du laboratoire de toxicologie cellulaire ainsi qu'à ceux de l'université Badji-Mokhtar Annaba.*

Dédicaces

À MES CHERS PARENTS,

En ce moment solennel, je souhaite dédier ces quelques mots à vous, mes piliers, mes guides, mes soutiens inconditionnels. Chaque succès que je célèbre aujourd'hui porte votre empreinte, fruit de vos sacrifices, de votre dévouement et de votre constante présence à mes côtés. Vos encouragements ont nourri mes aspirations, vos conseils ont éclairé mon chemin, et votre confiance en moi a été le moteur de ma persévérance.

À vous, qui avez façonné mon être et nourri mes rêves, je vous offre cette humble dédicace avec tout mon amour et ma gratitude éternelle. Puissent ces mots témoigner de l'immensité de mon amour et de ma reconnaissance envers vous, mes chers parents.

Avec tout mon amour

À MES CHÈRES SŒURS,

À travers les hauts et les bas de ce voyage, votre amour indéfectible a été ma lumière dans l'obscurité, ma force dans les moments de doute et ma boussole morale dans les choix difficiles.

À MES DEUX NIECES,

« Misha & Yasmine »

À MES AMIS,

« Messaoud, Aymen, Khairou, Ramzi, Wael »

A true friend is forever a friend.

*« The measure of a man
is not how he behaves in moments
of comfort and convenience,
but how he stands at times
of controversy and challenges »*

Reymond Reddington

*« How many people get a chance to save a species ?
Ten thousand species go extinct every year
because of the greed of one »*

Résumé

L'augmentation de la présence de produits chimiques synthétiques dans les écosystèmes aquatiques constitue une préoccupation majeure en matière de santé environnementale. Parmi ces substances, les résidus médicamenteux, issus notamment de l'industrie pharmaceutique, sont des contaminants émergents dont les impacts sur les écosystèmes aquatiques et la santé humaine sont encore largement méconnus. Ces composés, provenant de diverses sources telles que les rejets industriels pharmaceutiques, les eaux usées domestiques et les pratiques agricoles, peuvent perturber de manière significative les équilibres biologiques des milieux aquatiques, affectant ainsi la biodiversité et la qualité des ressources en eau. Parmi les substances médicamenteuses présentes dans les milieux aquatiques, les hormones/stéroïdes synthétiques utilisées dans les pilules contraceptives représentent une préoccupation particulière en raison de leurs bioaccumulations dans l'environnement et, par conséquent, de leurs effets néfastes sur différents organismes non-cibles. En effet, les composés tels que l'estrogène éthinylestradiol (EE2) et le progestatif lévonorgestrel (LNG) sont largement répandus et persistent dans l'environnement, mettant en danger la santé des organismes aquatiques et terrestres, notamment les invertébrés et les mammifères mâles. L'objectif de cette thèse est donc d'explorer les effets toxiques potentiels des hormones synthétiques EE2 et LNG, sur la biodiversité des écosystèmes aquatiques, tant individuellement qu'en mélange. Nous avons utilisé une approche *in vitro* sur le microcrustacé d'eau douce *D. magna* pour examiner les effets toxiques de ces composés. Nos résultats mettent en évidence des altérations sur la physiologie, la reproduction, le comportement, et les biomarqueurs du stress oxydatif chez l'espèce étudiée. Nous avons étendu nos investigations à une étude *in vivo* sur des rats mâles de race *Wistar* afin d'évaluer les effets de ces perturbateurs endocriniens sur la santé reproductive masculine. Nos résultats révèlent des modifications sur les différents paramètres biochimiques/hormonaux sériques, histologiques, ainsi que sur les paramètres du stress oxydatif aux niveaux des organes responsables de la reproduction masculines des rats, les testicules, suivi d'une dégradation des spermatozoïdes (concentration/mobilité) à travers un spermogramme, traduisant ainsi, la qualité de la spermatogénèse.

Mots clés : Hormones synthétiques, *Daphnia magna*, Rats *Wistar*, Embryotoxicité, Infertilité masculine, Ecotoxicité

Abstract

The increase in the presence of synthetic chemical products in aquatic ecosystems is a major concern for environmental health. Among these substances, pharmaceutical residues, particularly those from the pharmaceutical industry, are emerging contaminants whose impacts on aquatic ecosystems and human health are still largely unknown. These compounds, originating from various sources such as pharmaceutical industrial discharges, domestic wastewater, and agricultural practices, can significantly disrupt the biological balances of aquatic environments, thus affecting biodiversity and the quality of water resources. Among the pharmaceutical substances present in aquatic environments, synthetic hormones/steroids used in contraceptive pills are of particular concern due to their concentrations in the environment and, consequently, their harmful effects on various organisms. Indeed, compounds such as ethinylestradiol (EE2) estrogen and levonorgestrel (LNG) progestin are widespread and persistent in the environment, endangering the health of aquatic organisms, particularly invertebrates and male mammals. The aim of this thesis is therefore to explore the potential toxic effects of the synthetic hormones EE2 and LNG, both individually and in mixtures, on the biodiversity of aquatic ecosystems. We used an *in vitro* approach on the freshwater microcrustacean *D. magna* to examine the toxic effects of these compounds. Our results highlight alterations in physiology, reproduction, behavior and biomarkers of oxidative stress in the species studied. We extended our investigations to an *in vivo* study on male *Wistar* rats to assess the effects of these endocrine disruptors on male reproductive health. Our results revealed changes in various biochemical/hormonal serum and histological parameters, as well as in oxidative stress parameters in the organs responsible for male reproduction in rats, the testes, followed by sperm degradation (concentration/mobility) through a spermogram, thus reflecting the quality of spermatogenesis.

Keywords : Synthetic hormones, *Daphnia magna*, *Wistar* rats, Embryotoxicity, Male infertility, Ecotoxicity

ملخص

يشكل الوجود المتزايد للمواد الكيميائية الاصطناعية في النظم الإيكولوجية المائية مصدر قلق كبير على الصحة البيئية. ومن بين هذه المواد، تعتبر مخلفات العقاقير، لا سيما من صناعة المستحضرات الصيدلانية، من الملوثات الناشئة التي لا يزال تأثيرها على النظم الإيكولوجية المائية وصحة الإنسان غير معروف إلى حد كبير. ويمكن لهذه المركبات، التي تأتي من مجموعة متنوعة من المصادر مثل النفايات الصناعية الصيدلانية ومياه الصرف الصحي المنزلية والممارسات الزراعية، أن تخل بالتوازن البيولوجي للبيئات المائية بشكل كبير، مما يؤثر على التنوع البيولوجي وجودة الموارد المائية. ومن بين المواد الطبية الموجودة في البيئات المائية، فإن الهرمونات/الستيرويدات الاصطناعية المستخدمة في حبوب منع الحمل تثير القلق بشكل خاص بسبب تركيزاتها في البيئة، وبالتالي آثارها الضارة على مختلف الكائنات الحية.

على نطاق واسع وتظل (LNG) والبروجستين ليفونورجيستريل (EE2) تنتشر مركبات مثل الإستروجين إيثينيل إستراديول موجودة في البيئة، مما يعرض صحة الكائنات المائية، وخاصة اللاقاريات وذكور الثدييات للخطر.

و EE2 ولذلك فإن الهدف من هذه الأطروحة هو استكشاف الآثار السمية المحتملة لهرمونات منع الحمل الاصطناعية، ولا سيما على التنوع البيولوجي للنظم الإيكولوجية المائية، سواءً بشكل فردي أو في مخاليط. سوف نستخدم مناهج مختبرية على LNG، ماجنا لفحص تأثيرات هذه المركبات على علم وظائف الأعضاء والتكاثر *D. magna* حيوان القشريات الدقيقة في المياه العذبة والسلوك والإجهاد التأكسدي في الأنواع المدروسة، وسنوسع نطاق تحقيقاتنا لتشمل دراسات في الجسم الحي على ذكور فئران ويستار لتقييم آثار هذه المواد المسببة لاضطراب الغدد الصماء على الصحة الإنجابية، استناداً إلى معايير كيميائية حيوية/هرمونية في المصل، ودراسة نسيجية، بالإضافة إلى تقييم الإجهاد التأكسدي في الأعضاء المسؤولة عن التكاثر الذكري في ذكور الجرذان، الخصيتين، متبوعاً بفحص الحيوانات المنوية لتقييم جودة تكوين الحيوانات المنوية، مع التركيز على الجانب الفسيولوجي للحيوانات المنوية.

الكلمات الدالة : الهرمونات الاصطناعية، *Wistar* , *Daphnia magna* فئران , السمية الجينية , عقم الذكور , السمية البيئية.

Table des Matières

Remerciements

Dédicaces

Résumés

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des planches

Liste des symboles

Introduction générale1

Chapitre 01 : Synthèse bibliographique

1	<i>Daphnia magna</i> , un organisme modèle pour l'évaluation des risques.....	3
1.1	Les tests de toxicité standard sur <i>D. magna</i>	4
1.2	Biologie de <i>D. magna</i>	5
1.3	Morphologie et métabolisme	5
1.4	Nutrition.....	9
1.5	Croissance, reproduction et cycle de vie	9
1.6	Écologie comportementale et locomotion	15
2	Système reproducteur masculin chez le mammifère rat <i>Wistar</i>	16
2.1	Testicules et tube séminifères	16
2.2	Stéroïdogénèse et cellules de Leydig.....	17
2.3	Les cellules de Sertoli.....	18
2.4	Spermatogenèse et cellules germinales	20
2.4.1	Définition	20
2.4.2	Processus de la spermatogenèse	20
2.4.3	Régulation de la spermatogenèse	22
2.5	Influence des lipides sur la stérilité masculine : quels liens ?	25

3	Généralités sur les substances pharmaceutiques	27
3.1	Les stéroïdes sexuels	27
3.2	Les stéroïdes synthétiques	29
3.2.1	Pharmacologie des stéroïdes synthétiques	29
3.2.2	Caractéristiques des stéroïdes synthétiques.....	30
3.3	La Pilule contraceptive	31
3.3.1	La pilule : Preuve d'une atteinte à l'environnement !	31
4	Hormones synthétiques utilisées.....	32
4.1	Structures et caractéristiques physicochimiques	32
4.1.1	Éthinylestradiol (EE2).....	32
4.1.2	Lévonorgestrel (LNG).....	33
4.2	Concentrations et voies de contamination environnementale	34
4.2.1	Cas de l'œstrogène EE2	34
4.2.2	Cas du progestatif LNG.....	38
4.3	Effets et mode d'action.....	39
4.3.1	Cas de l'œstrogène EE2	39
4.3.2	Cas du progestatif LNG.....	41
5	Stress oxydatif : définitions, sources et impacts ?	42
5.1	Définition.....	43
5.1.1	Stress oxydant	43
5.1.2	Oxydation	43
5.1.3	Le déséquilibre	43
5.1.4	Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	44
5.1.5	Antioxydants	46

Chapitre 02 : Etude *in vitro* : Toxicité potentielle des résidus d'hormones contraceptives féminines EE2 et/ou LNG sur *Daphnia Magna*

I.	Introduction.....	49
II.	Matériel et méthodes	52
1	Matériel chimique	52
2	Matériel biologique : <i>Daphnia magna</i>	53
2.1	Souche de daphnie utilisée	53
2.2	Classification taxonomique :	53
2.3	Source et zones de prélèvement.....	53
3	Méthodes.....	55
3.1	Conditions de culture des daphnies	55
3.2	Traitement des Daphnies	56
3.3	Etude physiologique	57
3.3.1	Test de toxicité aigüe.....	57
3.3.2	Calcul du taux d'immobilisation (24h/48h)	57
3.3.3	Détermination de la concentration inhibitrice médiane (CI50).....	58
3.3.4	Mesure du rythme cardiaque	58
3.4	Etude biochimique.....	58
3.4.1	Méthodes de dosage des métabolites	58
3.4.2	Dosage des protéines totales.....	59
3.4.3	Dosage des lipides totaux	59
3.5	Embryotoxicité et malformations	59
3.5.1	Test d'embryotoxicité.....	59
3.5.2	Taux de malformations néonatales	60
3.5.3	Détermination du sexe des néonates	60

3.5.4	Observation microscopique des anomalies embryonnaires	62
3.6	Etude comportementale	63
3.6.1	Suivi des trajectoires de déplacement	63
3.6.2	Calcul de la vitesse de déplacement	64
3.7	Etude du stress oxydatif.....	64
3.7.1	Préparation de l'homogénat	64
3.7.2	Evolution du taux de glutathion (GSH).....	64
3.7.3	Evolution de l'activité Catalase (CAT)	65
3.7.4	Evolution de l'activité glutathion-S-Transférase (GST)	65
3.7.5	Evolution du taux de malondialdéhyde (MDA)	66
3.8	Méthodes statistiques.....	67
3.8.1	Analyse en composante principale (ACP)	67
III.	Résultats	68
1	Paramètres physiologiques.....	68
1.1	Taux d'immobilisation de <i>D. magna</i> après exposition au EE2, LNG et EE2/LNG (24h/48h)	68
1.2	Détermination de la concentration inhibitrice médiane (CI ₅₀)	70
1.3	Mesure du rythme cardiaque	71
2	Etude biochimique	73
2.1	Variations du taux de protéines totales chez <i>D. magna</i>	73
2.2	Evolution de la teneur en lipides chez <i>D. magna</i>	75
3	Embryotoxicité et malformations	78
3.1	Détermination du sexe des néonates.....	78
3.2	Taux de malformations chez les nouveau-nés	79
3.3	Types de modifications morphologiques observées	80

4	Etude comportementale.....	87
4.1	Suivi des Trajectoires de déplacement.....	87
4.2	Calcul de la vitesse de nage.....	90
5	Etude du stress oxydatif.....	93
5.1	Evolution du taux de glutathion (GSH).....	93
5.2	Evolution de l'activité (GST).....	94
5.3	Evolution de l'activité Catalase (CAT).....	95
5.4	Evolution du taux de malondialdéhyde (MDA).....	96
6	Analyses statistiques.....	98
6.1	Analyse en composante principale (ACP).....	98
IV.	Discussion.....	101
V.	Conclusion.....	120

Chapitre 03 : étude *in vivo* : Reprotoxicité induite par les résidus d'hormones stéroïdiennes EE2 et/ou LNG chez le rat *Wistar* mâle

I.	Introduction.....	122
II.	Matériel et méthodes.....	125
1	Matériel chimique.....	125
2	Matériel biologique : Rat <i>Wistar</i>	125
3	Méthodes.....	126
3.1	Protocole expérimental.....	126
3.2	Paramètres physiologiques.....	126
3.3	Prélèvement des échantillons.....	126
3.3.1	Prélèvement sanguin.....	126
3.3.2	Prélèvement des organes.....	126
3.3.3	Prélèvement du sperme épидидymaire.....	127

3.4	Méthode de dosages.....	129
3.4.1	Analyses biochimiques.....	129
3.4.2	Evaluation de la physiologie des spermatozoïdes (Spermogramme).....	129
3.4.3	Dosage des antioxydants	130
3.4.4	Etude histopathologique	130
3.4.5	Analyses statistiques	130
III.	Résultats	132
1	Paramètres physiologiques.....	132
2	Etude biochimique	133
2.1	Profil lipidique sérique	133
2.2	Evaluation des taux d'hormones sexuelles sériques.....	134
3	Evaluation de la physiologie des spermatozoïdes.....	135
3.1	Impact du traitement sur la concentration et la mobilité des spermatozoïdes	135
4	Dosage des antioxydants.....	137
5	Etude histopathologique.....	140
5.1	Au niveau des testicules	140
5.2	Au niveau de l'épididyme.....	143
IV.	Discussion	147
V.	Conclusion	160
	Conclusion générale et perspectives.....	163
	Références bibliographiques.....	164

Liste des tableaux

TABLEAU 01 : CONDITION DE L'ESSAI DE TOXICITE STANDARD AVEC D. MAGNA	4
TABLEAU 02 : CLASSES DE STEROÏDES SEXUELLES AVEC DES EXEMPLES DE COMPOSES ET DES REFERENCES A LEUR PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE.	28
TABLEAU 03 : PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUE D'ETHINYLESTRADIOL (EE2).....	32
TABLEAU 04 : PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUE DU LEVONORGESTREL (LNG).	33
TABLEAU 05 : CARACTERISATIONS PHYSICOCHIMIQUES DES DEUX HORMONES EE2 ET LNG.	52
TABLEAU 06 : LES VALEURS DE LA CONCENTRATION INHIBITRICE MEDIANE (CI ₅₀) QUI CAUSENT L'IMMOBILISATION DES NEONATES ONT ETE CALCULEES POUR UNE EXPOSITION DE 24 HEURES ET 48 HEURES A L'EE2 ET AU LNG (N = 3) SONT REGROUPEES DANS LE TABLEAU SUIVANT :	71
TABLEAU 07 : TAUX DE L'APPARITION DES MALES DANS LA DESCENDANCE DES DAPHNIES FEMELLES EXPOSEES AUX CONCENTRATIONS CROISSANTES DE EE2, LNG ET EE2/LNG.	78
TABLEAU 08 : POIDS CORPOREL, POIDS RELATIF DES ORGANES (TESTICULE, EPIDIDYME ET VESICULE SEMINALE) ET CONSOMMATION ALIMENTAIRE MOYENNE CHEZ LES RATS TEMOINS ET TRAITES PAR L'EE2, LNG ET LEUR MIXTURE EE2/LNG.....	132
TABLEAU 09 : LES VARIATION DE LA CONCENTRATION ET LA MOBILITE DES SPERMATOZOÏDES CHEZ LE GROUPE TEMOIN ET LES RATS TRAITES PAR EE2, LNG ET LEUR MIXTURE PENDANT 4 SEMAINES D'EXPOSITION.	136
TABLEAU 10 : LES VARIATIONS DE L'ACTIVITE CAT AINSI QUE LES CONCENTRATIONS DE GSH ET MDA DANS LES TESTICULES DES RATS TEMOINS ET TRAITES PAR EE2, LNG ET EE2/LNG APRES 4 SEMAINE.....	138

Liste des figures

FIGURE 1 : TAXONOMIE DE DAPHNIA MAGNA ET IMAGE D'UNE FEMELLE ADULTE ENCEINTE PRISE DE NOTRE CULTURE	5
FIGURE 2 : FEMELLE D. MAGNA DE 21 JOURS ISSUE DE NOTRE CULTURE. PHOTOGRAPHIE REALISEE AVEC UNE CAMERA D'UN SAMSUNG GALAXY S20+ MONTE SUR UN MICROSCOPE OPTIQUE (LEICA ATC 2000 MICROSCOPE, WETZLAR, ALLEMAGNE)	6
FIGURE 3 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UNE FEMELLE ADULTE DE D. MAGNA, BARRE D'ECHELLE 100 μM, IMAGE ISSUE DE (CHEVALIER, 2014).	7
FIGURE 4 : DESCRIPTION PHYSIQUE DE D. MAGNA A L'ETAPE ADULTE (EBERT, 2005).	8
FIGURE 5 : IMAGE D'UN NEONATE DE D. MAGNA DE 72 H PHOTOGRAPHIER DE NOTRE CULTURE ET LES DIFFERENTS STADES PRECOCES DE DEVELOPPEMENT PRESENT DE (WANG ET AL., 2011).	11
FIGURE 6 : DIFFERENCE ENTRE LA FEMELLE (A GAUCHE) ET LE MALE (A DROITE) DE D. MAGNA. (A) ANTENNE PRIMAIRE PLUS LONG CHEZ LE MALE. (B) LA FEMELLE PRESENTE UNE FORME SYMETRIQUE DE LA CARAPACE, TANDIS QUE CELLE DU MALE EST ASYMETRIQUE. (C) LA PRESENCE D'UNE POCHE INCUBATRICE DORSALE CHEZ LA FEMELLE. (PHOTO FEMELLE PRISE DANS NOTRE LABORATOIRE, CELLE DU MALE PRISE DE (EBERT, 2005).	12
FIGURE 7 : EN HAUT, CYCLE DE VIE PARTHENOGENETIQUE CYCLIQUE ET SEXUEL DE D. MAGNA (DESSINE PAR DITA B. VIZOSO, UNIVERSITE DE FRIBOURG, REPRIS DE EBERT, 2005) ; A DROITE, UNE PHOTO D'UNE FEMELLE ADULTE AVEC DES EPHIPPES, PRISE DE NOTRE CULTURE ; A GAUCHE, ŒUFS DORMANTS DE D. MAGNA IMMEDIATEMENT APRES LA DECAPSULATION : (A) L'EPHIPPIUM ; (B) LA MEMBRANE INTERNE DE L'ŒUF ; (C) LES ŒUFS DORMANTS (PHOTOGRAPHIES PAR CUENCA CAMBRONERO ET ORSINI, 2018).	14

FIGURE 8 : STRUCTURE DES TESTICULES ET L'EPIDIDYME CHEZ L'HOMME (BONNES ET AL., 1998),	
PRISE DE (KONAN, 2019).....	17
FIGURE 9 : OBSERVATION MICROSCOPIQUE D'UN TISSU TESTICULAIRE IMPLIQUANT LES TUBES	
SEMINIFERES ET LES DIFFERENTES CELLULES DE « SOUTIEN »	19
FIGURE 10 : ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DU PROCESSUS SPERMATOGENIQUE (PRISE DU SITE	
HTTP://WWW.EMBRYOLOGY.CH)	22
FIGURE 11 : REGULATION PHYSIOLOGIQUE DE L'AXE HORMONAL DE LA REPRODUCTION MASCULINE	
(SCHEMA DESSINE PAR SEBASTIEN VIGIER, ISSU DU SITE HTTPS://SVT.AC-DIJON.FR).....	24
FIGURE 12 : SCHEMA REPRESENTATIF DU MAINTIEN DE L'EQUILIBRE INTRACELLULAIRE DU	
CHOLESTEROL (LOBACCARO ET AL., 2018).	25
FIGURE 13 : ANOMALIES DE LA FERTILITE MASCULINE PROVOQUEES PAR LA PERTURBATION DE	
L'HOMEOSTASIE INTRACELLULAIRE DU CHOLESTEROL DANS LES ORGANES CIBLES	26
FIGURE 14 : STRUCTURE DES MEMBRES REPRESENTATIFS DES CLASSES D'HORMONES	
STEROÏDIENNES, LES NUMEROS DE CARBONE ETANT INDICUES POUR L'ESTRADIOL ET LA	
PROGESTERONE.....	29
FIGURE 15 : STRUCTURE CHIMIQUE D'ETHINYLESTRADIOL (EE2).....	32
FIGURE 16 : STRUCTURE CHIMIQUE DU LEVONORGESTREL (LNG)	33
FIGURE 17 : SOURCE, DEVENIR ET TRANSPORT DE L'EE2 DANS L'ENVIRONNEMENT AQUATIQUE.	
IMAGE PRISE DE (ARIS ET AL., 2014).....	37
FIGURE 18 : SOURCES ET VOIES DE CONTAMINATION DES SYSTEMES AQUATIQUES PAR LES HORMONES	
SYNTHETIQUES.....	39
FIGURE 19 : PROCESSUS DE GENERATION DE RADICAUX LIBRE (ROS) AU NIVEAU DE LA CHAINE	
RESPIRATOIRE MITOCHONDIRALE (PRISE DU SITE : HTTPS://WWW.IDROGEN.FR).....	44
FIGURE 20 : SCHEMA SIMPLIFIE EXPLIQUANT L'ACTION DES ANTIOXYDANTS SUR LES ROS.....	46

FIGURE 21 : DAPHNIA MAGNA (IMAGE PERSONNELLE)	53
FIGURE 22 : SITUATION GEOGRAPHIQUE DES SITES DE PRELEVEMENT DE D. MAGNA.....	54
FIGURE 23 : ELEVAGE DE D. MAGNA (A), CHAMBRE DE CROISSANCE (B) ET MICROCLIMAT (C).....	55
FIGURE 24 : DIFFERENCE ENTRE NEONATE FEMELLE (A GAUCHE) ET NEONATE MALE (A DROITE) AGES DE 12 H. PHOTOGRAPHIE ISSUE DE NOTRE CULTURE	61
FIGURE 25 : PROCEDURE EXPERIMENTALE DU TEST D'EMBRYOTOXICITE ET OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES DEFORMATIONS NEONATALES DETAILLEE PAR MASSARIN, (2010).....	62
FIGURE 26 : TRAJECTOIRE ET DISTANCE PARCOURUE PAR UNE DAPHNIE EN FONCTION DU TEMPS (1 MIN) OBTENUE VIA LE LOGICIEL (KINOVEA 0.9.5)	63
FIGURE 27 : TAUX D'IMMOBILISATION ENREGISTRES CHEZ D. MAGNA EXPOSEES AUX CONCENTRATIONS CROISSANTES D'EE2 (A), DE LNG (B) ET DE LA MIXTURE EE2/LNG (C) APRES 24 ET 48 H.....	70
FIGURE 28 : IMPACT DES CONCENTRATIONS CROISSANTE D'EE2, LNG ET EE2/LNG SUR LE RYTHME CARDIAQUE DE D. MAGNA APRES 24 ET 48 H D'EXPOSITION	72
FIGURE 29 : EFFET DES CONCENTRATIONS CROISSANTES D'EE2 (A), DE LNG (B) ET EE2/LNG (C) SUR LE TAUX DE PROTEINES CHEZ D. MAGNA APRES 48 H D'EXPOSITION.....	75
FIGURE 30 : EFFET DES CONCENTRATIONS CROISSANTES D'EE2 (A), DE LNG (B) ET EE2/LNG (C) SUR LA TENEUR EN LIPIDES CHEZ D. MAGNA APRES 48 H D'EXPOSITION.....	77
FIGURE 31 : TAUX DES ANOMALIES MORPHOLOGIQUES INDUITES PAR EE2, LNG ET LA MIXTURE EE2/LNG CHEZ LES NEONATES DURANT LEUR STADE EMBRYONNAIRE.....	80
FIGURE 32 : NEONATES TEMOINS DE D. MAGNA, GR X100	81
FIGURE 33 : NEONATES DE D. MAGNA MONTRANT : - RETRECISSEMENT DES ANTENNES PRIMAIRES (A2) ; - DES DEFORMATIONS OU RETRECISSEMENT AU NIVEAU DE L'EPINE CAUDALE (E1), GR x100	82

FIGURE 34 : NOUVEAU NES MALES DE <i>D. MAGNA</i> PRESENTANT : - DESORIENTATION DES ANTENNES SECONDAIRES VERS LE BAS (A3) ; - UN COURBEMENT PLUS OU MOINS IMPORTANT DE L'EPINE CAUDALE (EC2) ; - INFECTION INTENSE DU TUBE DIGESTIF (TD), GR x100.....	83
FIGURE 35 : NEONATES DE <i>D. MAGNA</i> INDIQUANT : - UN RETRECISSEMENT ET/OU ABSENCE TOTALE DES ANTENNES SECONDAIRES (A1) ; - DEVELOPPEMENT D'ANTENNES SECONDAIRES AU NIVEAU DE L'EPINE POST-ABDOMINALE (A5) ; - ABSENCE TOTALE DE L'EPINE CAUDALE (EC3) ; - DEFORMATION OU DETERIORATION DE LA CARAPACE (C1)	84
FIGURE 36 : JUVENILES DE <i>D. MAGNA</i> INDIQUANT : - L'APPARITION DE NOUVEAUX BRANCHEMENTS AU NIVEAU DES ANTENNES SECONDAIRES, DES MANDIBULES ET L'EPINE POST-ABDOMINALE (A4) ; - INFECTION SEVERE AU NIVEAU DU TUBE DIGESTIF (TD)	85
FIGURE 37 : DEFORMATION ET/OU DESTRUCTION TOTALE ET/OU PARTIELLE DES CARAPACES DES NEONATES DE <i>D. MAGNA</i> (C1) ; - UN COURBEMENT PLUS OU MOINS IMPORTANT DE L'EPINE CAUDALE (EC2)	86
FIGURE 38 : TRAJECTOIRES ENREGISTREES PAR LES TEMOINS DE <i>D. MAGNA</i>	87
FIGURE 39 : TRAJECTOIRES DE NAGES IRRÉGULIÈRES ENREGISTREES CHEZ <i>D. MAGNA</i> EXPOSEES AUX CONCENTRATIONS D'EE2 (5 - 25 µg/L) ET LNG (25 - 125 µg/L).....	88
FIGURE 40 : TRAJECTOIRES DE NAGES CIRCULAIRES ET ROTATIVES (A) ET EN ZIGZAG (B) CHEZ <i>D. MAGNA</i> EXPOSEES AUX CONCENTRATIONS FAIBLES D'EE2 (0,1 – 0,5 µg/L), ET LES PLUS ELEVEES DE LA COMBINAISON EE2/LNG (C3 ET C4)	89
FIGURE 41 : MOUVEMENTS DE NAGES EN SPIRALES NOTES CHEZ <i>D. MAGNA</i> EXPOSEES AUX FAIBLES CONCENTRATIONS (0,1 – 0,5 µg/L) ET (C1 – C2) D'EE2 ET LA MIXTURE EE2/LNG, RESPECTIVEMENT	90
FIGURE 42 : IMPACT DES CONCENTRATIONS CROISSANTES D'EE2, LNG ET EE2/LNG SUR LA VITESSE DE NAGE DE <i>D. MAGNA</i> APRES 24 ET 48H.....	92

FIGURE 43 : EFFET DES CONCENTRATIONS CROISSANTES D'EE2 (A), LNG (B) ET EE2/LNG (C) SUR LE TAUX DE GSH CHEZ D. MAGNA	93
FIGURE 44 : EFFET DES CONCENTRATIONS CROISSANTES D'EE2 (A), LNG (B) ET EE2/LNG (C) SUR L'ACTIVITE GST CHEZ D. MAGNA	95
FIGURE 45 : EFFET DES CONCENTRATIONS CROISSANTES D'EE2 (A), LNG (B) ET EE2/LNG (C) SUR L'ACTIVITE CAT CHEZ D. MAGNA.....	96
FIGURE 46 : EFFET DES CONCENTRATIONS CROISSANTES D'EE2 (A), LNG (B) ET EE2/LNG (C) SUR LES NIVEAUX DE MDA CHEZ D. MAGNA	97
FIGURE 47 : ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES (ACP) REALISEE SUR 04 VARIABLES DE BIOMARQUEURS DU STRESS OXYDATIF ET LE TAUX D'IMMOBILISATION CHEZ D. MAGNA EXPOSEE AUX CONCENTRATIONS CROISSANTES DE LA MIXTURE EE2/LNG. (A) PLAN FACTORIEL F1 (70,18 %), F2 (13,78 %) ; (B). RESULTATS DU BIPLLOT, PROJECTION DES VARIABLES DU STRESS OXYDATIF ET DU TAUX D'IMMOBILISATION DANS LES GROUPES DES TEMOINS ET LES GROUPES TRAITES AU CONCENTRATIONS CROISSANTES DE LA MIXTURE EE2/LNG SUR LES DEUX PREMIERS AXES PRINCIPAUX.....	99
FIGURE 48 : SCHEMA RECAPITULATIF REPRESENTANT LE DISPOSITIF EXPERIMENTAL	128
FIGURE 49 : NIVEAUX DU CHOLESTEROL, HDL, LDL ET TRIGLYCERIDES CHEZ LES RATS TEMOINS ET TRAITES PAR L'EE2, LNG ET LEUR MIXTURE EE2/LNG. LES VALEURS SONT PRESENTEES SOUS FORME DE MOYENNE ± ERREUR STANDARD DE LA MOYENNE (N = 6). LES VALEURS AVEC DES INDICES SONT STATISTIQUEMENT DIFFERENTES AVEC UNE VALEUR DE (*P < 0.01, **P < 0.001)	133
FIGURE 50 : NIVEAUX SERIQUES DE FSH, LH ET TESTOSTERONE CHEZ LES RATS TEMOINS ET TRAITES PAR L'EE2, LNG ET LA COMBINAISON EE2/LNG. LES VALEURS SONT PRESENTEES SOUS FORME DE MOYENNE ± ERREUR STANDARD DE LA MOYENNE (N = 6). LES VALEURS AVEC DES INDICES	

SONT STATISTIQUEMENT DIFFERENTES AVEC UNE VALEUR DE (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$;
*** $p < 0,0001$) 135

FIGURE 51 : CHANGEMENT DE LA CONCENTRATION DES SPERMATOZOÏDES CHEZ LES GROUPES
TEMOINS ET TRAITES PAR EE2, LNG ET EE2/LNG APRES 4 SEMAINES D'EXPOSITION 136

FIGURE 52 : POURCENTAGE DE MOBILITE TOTALE DES SPERMATOZOÏDES CHEZ LES RATS TEMOINS ET
TRAITES PAR L'EE2, LNG ET LA COMBINAISON EE2/LNG APRES 4 SEMAINES D'EXPOSITION 137

FIGURE 53 : ACTIVITE DE LA CAT, NIVEAU DE GSH ET TAUX DE MDA DANS LES TESTICULES DES
RATS TEMOINS ET TRAITES PAR EE2, LNG ET LEUR MIXTURE EE2/LNG PENDANT 4 SEMAINE
..... 139

FIGURE 54 : RECAPITULATIF DES IMPACTS INDUITS PAR LES HORMONES SYNTHETIQUES EE2, LNG ET
LEUR MIXTURE SUR LA FERTILITE MASCULINE DES RATS MALES *Wistar* 159

Liste des planches

PLANCHE 1 : HISTOLOGIE DES TESTICULES DE RATS TEMOINS ET TRAITES PAR EE2, LNG ET EE2/LNG. (A) COUPE DE TESTICULE D'UN RAT TEMOIN MONTRANT DES TUBES SEMINIFERES BIEN SAINS AVEC UNE SPERMATOGENESE ACTIVE ET UNE CELLULARITE INTERSTITIELLE DISTINGUEE. (B) COUPE DE TESTICULE DE RATS TRAITES PAR EE2, (C) COUPE DE TESTICULE DE RATS TRAITES PAR LNG, ET (D) COUPE DE TESTICULE DE RATS TRAITES PAR LA MIXTURE EE2/LNG MONTRANT UNE VACUOLISATION. COLORATION A L'HEMATOXYLINE ET A L'EOSINE DES TISSUS TESTICULAIRES (Gr 40X). BARRE D'ECHELLE : 50 μ M..... 143

PLANCHE 2 : HISTOLOGIE DE L'EPIDIDYME DES RATS TEMOINS ET TRAITES PAR EE2, LNG ET EE2/LNG. (A) COUPE D'EPIDIDYME D'UN RAT TEMOIN MONTRANT UNE STRUCTURE HISTOLOGIQUE INTACTE ET UNE DENSITE NORMALE DE SPERMATOZOÏDES. (B) COUPE D'EPIDIDYME D'UN RAT TRAITÉ PAR EE2. (C) COUPE D'EPIDIDYME D'UN RAT TRAITÉ PAR LNG. (D) COUPE D'EPIDIDYME D'UN RAT TRAITÉ PAR LA MIXTURE EE2/LNG. COLORATION A L'HEMATOXYLINE ET A L'EOSINE DES TISSUS TESTICULAIRES (40X). BARRE D'ECHELLE : 50 μ M. 146

Liste des abréviations

- ABC** : ATP binding cassette transporter
- ACP** : Analyse en composante principale
- ASS** : Acide sulfosalicylique
- BCF** : Facteur de bioconcentration
- BHT** : Barrière hémato-testiculaire
- BPS** : Bisphénol S
- BSA** : Albumine sérique bovine
- CAT** : Catalase
- CHH** : Complexe hypothalamo-hypophysaire
- CI50** : Concentration inhibitrice médiane
- COCs** : Contraceptifs oraux combinés
- CYP17A1** : Cytochrome P450 17A1
- EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique
- Dhh** : Desert Hedgehog protein
- DHT** : Dihydrotestostérone
- DTNB** : Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
- EcR** : Récepteur des écdystéroïdes
- ERE** : Espèces réactives de l'oxygène
- FSH** : Hormone Folliculostimulante
- GnRH** : Hormone de libération des gonadotrophines
- GPx** : Glutathion peroxydase
- GSH** : Glutathion réduit
- GST** : Glutathion-S-Transférase
- H2O2** : Peroxyde d'hydrogène
- HDL** : Lipoprotéines de haute densité
- HMGCR** : 3- Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A Reductase
- HPG** : Hypothalamo-hypophyso-gonadique
- HSP** : Heat Shock Proteins
- HYP** : Hypothalamus

K_{oc} : Coefficient de partage carbone organique/eau

K_{ow} : Coefficient de partage Octanol / Eau

LA : Cellules de Leydig Adultes

LDL : Lipoprotéines de basse densité

LF : Cellules de Leydig Fœtales

LH : Hormone lutéinisante

LHR : Récepteur de l'hormone lutéinisante

IDOL : Ubiquitine ligase

LXR : Liver X Receptors

MDA : Malondialdéhyde

MF : Hormone juvénile méthyl farnesoate

mPR γ : Membrane progesterone receptor gamma

MR : Récepteur des minéralocorticoïdes

P450_{scc} : P450 side-chain cleavage enzyme

pc : Poids corporel

pf : Post-fécondation

PGMRC1 : Composant 1 du récepteur membranaire de la progestérone

PNEC : Concentration prévue sans effet

ROS : Reactive oxygen species

SODs : Superoxydes dismutases

SREBP2 : Sterol Response Element Binding Protein 2

StAR : Protéine régulatrice aiguë stéroïdogéniques

STEPS : Les stations d'épuration des eaux usées

TBA : Acide Thiobarbiturique

TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloroacétique

TU : Undécanoate de testostérone

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'augmentation de la présence de produits chimiques synthétiques dans les écosystèmes aquatiques constitue une préoccupation majeure en matière de santé environnementale. Parmi ces substances, les résidus médicamenteux, issus notamment de l'industrie pharmaceutique, sont des contaminants émergents dont les impacts sur les écosystèmes aquatiques et la santé humaine sont encore largement méconnus. En outre, ces composés ne sont pas destinés à des applications environnementales directes, et l'on sait donc peu de choses sur leurs effets écologiques, en particulier sur les organismes non ciblés (Su *et al.*, 2019 ; Rodrigues *et al.*, 2021). Ces composés, provenant de diverses sources telles que les rejets industriels pharmaceutiques, les eaux usées domestiques et les pratiques agricoles, peuvent perturber de manière significative les équilibres biologiques des milieux aquatiques, affectant ainsi la biodiversité et la qualité des ressources en eau (Adeel *et al.*, 2017).

Parmi les substances médicamenteuses présentes dans les milieux aquatiques, les hormones/stéroïdes synthétiques utilisées dans les pilules contraceptives représentent une préoccupation particulière en raison de leurs concentrations dans l'environnement et, par conséquent, de leurs effets néfastes sur différents organismes. Aujourd'hui, les mécanismes d'action des œstrogènes et des progestatifs synthétiques sont bien compris. Ils sont absorbés par les cellules du système reproducteur, de l'hypophyse, des os, du foie et d'autres tissus et se lient aux récepteurs des œstrogènes et de la progestérone, déclenchant des augmentations ou des diminutions de l'expression des gènes régulés par ces hormones, contrôlant à leur tour, le développement sexuel et la reproduction. Lorsqu'ils sont pris correctement dans la pilule contraceptive, ils interfèrent avec le cycle menstruel normal d'une femme, empêchant la grossesse (Jobling et Owen, 2011).

Bien que la plupart des études toxicologiques soient encore menées sur la base d'expositions à des stéroïdes uniques à des doses supérieures aux niveaux d'exposition humaine, la nécessité d'examiner le risque associé à leurs mélanges à de faibles doses et dans des scénarios pertinents pour l'environnement, similaires à celles trouvées chez l'homme, est évidente (Carvalho *et al.*, 2014).

En effet, les composés tels que l'estrogène éthinylestradiol (EE2) et le progestatif lévonorgestrel (LNG) sont largement répandus et persistent dans l'environnement, mettant en danger la santé des organismes aquatiques, notamment les invertébrés et les mammifères mâles.

Introduction générale

Dans ce contexte, il est crucial de comprendre les mécanismes d'action et les effets écotoxicologiques de ces substances sur les organismes aquatiques et mammifères. Pour ce faire, l'utilisation de bioindicateurs s'avère être une approche précieuse dans l'évaluation de la qualité environnementale. Parmi les bioindicateurs couramment utilisés, le microorganisme aquatique *D. magna*, en tant que consommateur primaire, et les rats *Wistar* mâles, en tant que modèles de mammifères mâles. Ces organismes présentent une résistance relativement élevée aux xénobiotiques, car ils possèdent des mécanismes de défense oxydative, de biotransformation et d'excrétion qui fonctionnent bien. Ils se prêtent donc parfaitement à l'étude des changements physiologiques dus à leur capacité à survivre dans des environnements contaminés (Contardo-Jara *et al.*, 2011). Par conséquent, ces modèles bioindicateurs offrent des opportunités uniques pour étudier la toxicité des résidus médicamenteux sur les organismes aquatiques et les impacts potentiels sur la santé humaine.

L'objectif de ce travail est donc d'explorer les effets toxiques potentiels des hormones contraceptives synthétiques, en particulier l'EE2 et le LNG, sur la biodiversité des écosystèmes aquatiques. Nous utiliserons des approches *in vitro* sur le microcrustacé d'eau douce *D. magna* pour examiner les effets de ces composés sur la physiologie, la reproduction, le comportement, et le stress oxydatif chez l'espèce étudiée, et nous étendrons nos investigations à des études *in vivo* sur les rats *Wistar* mâles pour évaluer les effets de ces perturbateurs endocriniens sur la santé reproductive, en se basant sur les paramètres biochimiques/hormonaux sériques, une étude histologique, ainsi que l'évaluation du stress oxydatif aux niveaux des organes responsables de la reproduction masculines des rats, les testicules, suivi d'un spermogramme afin d'évaluer la qualité de la spermatogénèse, en faisant une mise au point sur l'aspect physiologiques des spermatozoïdes.

Cette recherche vise à fournir des données cruciales pour mieux comprendre les risques associés à l'exposition aux stéroïdes synthétiques à des concentrations environnementales pertinentes, notamment dans les écosystèmes aquatiques et à contribuer ainsi à l'élaboration de stratégies de gestion et de prévention de la pollution par les produits pharmaceutiques émergents.

CHAPITRE 01 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 *Daphnia magna*, un organisme modèle pour l'évaluation des risques

La Daphnie, en conjonction avec les poissons et les algues, occupe une place fondamentale en tant qu'espèce de test dans les évaluations de risques environnementaux des produits chimiques, tant dans les tests aigus que chroniques. Le crustacé d'eau douce *D. magna* a été au centre de nombreuses études dans divers domaines de la biologie et est devenu un organisme privilégié pour les bio essais en écotoxicologie (Fernando *et al.*, 1987).

Le choix d'une espèce comme bioindicateur repose souvent sur des critères tels que sa facilité de culture, sa sensibilité aux stress et sa capacité à réagir de manière prévisible à ces stress (Goodsell *et al.*, 2009). Cette espèce présente diverses réponses naturelles au stress environnemental, qu'elles soient physiologiques, biochimiques ou comportementales. Son élevage peut être réalisé dans un espace restreint, et son cycle de vie court ainsi que sa forte fécondité en font une espèce facile et économique à cultiver en laboratoire.

La carapace transparente de la daphnie facilite l'observation des organes internes. Grâce à sa reproduction parthénogénétique, les descendants de chaque femelle sont génétiquement identiques à leur mère, réduisant ainsi la variabilité des résultats, notamment au niveau du comportement, qui peut être soumis à des variations importantes. La daphnie joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre écologique des écosystèmes aquatiques (Riddell *et al.*, 2005), elle est considérée comme représentative des organismes d'eau douce (Mark et Solbe, 1998). Ce crustacé cladocère occupe une position centrale dans le réseau trophique aquatique et est fréquemment l'une des espèces de zooplancton dominantes dans les lacs ou les étangs d'eau douce (Duquesne et Küster, 2010).

D. magna présente une sensibilité élevée à un large éventail de substances chimiques (Mark et Solbe, 1998), bien qu'il n'existe pas de règles générales déterminant que la daphnie soit plus sensible que d'autres espèces telles que les poissons ou d'autres invertébrés. En réalité, la sensibilité de cette espèce dépend fortement du type de substance chimique testée. Par exemple, l'analyse des bases de données de toxicité aiguë a révélé que *D. magna* réagit à une gamme plus étendue de substances chimiques avec une sensibilité accrue par rapport au poisson-zèbre *Danio rerio* (Martins *et al.*, 2007). Il en est de même par rapport aux poissons dans les tests comportementaux. Il est important de noter que le comportement des poissons est grandement influencé par des facteurs externes tels que la disponibilité de la nourriture, la température et la lumière, ce qui rend leur

comportement beaucoup plus variable et difficile à contrôler. Pour toutes ces raisons, la daphnie apparaît comme une espèce modèle fiable pour les études écotoxicologiques et comportementales, sa sélection permettant ainsi une comparaison étendue avec la base de données d'évaluation des risques environnementaux.

1.1 Les tests de toxicité standard sur *D. magna*

Deux types de tests de toxicité sur *D. magna* peuvent être distingués : aigu et chronique, cependant, notre étude est basée uniquement sur le test de toxicité aiguë (voir Tableau 1).

Le test de toxicité aiguë est réalisé sur une courte période par rapport à la durée de vie de l'organisme et consiste à observer l'immobilisation à 24 et 48 heures d'exposition. Le test d'immobilisation sur *D. magna* (ISO 6341 2012, OCDE 2004) est l'un des tests normalisés les plus utilisés pour évaluer l'impact des produits chimiques et surveiller la qualité de l'eau, car ce test est simple, rapide et rentable. La concentration inhibitrice médiane induisant 50% d'immobilisation (CI₅₀) est calculée à partir de la courbe dose-réponse. Cependant, les concentrations produisant des effets aigus sont généralement élevées et dépassent les concentrations environnementales.

Tableau 01 : Condition de l'essai de toxicité standard avec *D. magna*

Test Standard	Durée	Condition expérimentale	Nutrition	Paramètre observé	Point final	Normes
Aigu	24 h 48 h	Obscurité Statique	Non	Immobilisation	CI ₅₀	(ISO 6341 2012, OECD 2004)

Le stade de vie joue un rôle important dans la détermination de la toxicité : le stade de vie juvénile est plus sensible aux substances chimiques toxiques que le stade de vie adulte, en raison de leur rapport surface-volume plus élevé et donc un taux d'absorption des substances toxiques plus rapides. Par exemple, les nouveau-nés ont une sensibilité plus élevée que les organismes âgés de 7 jours (Muysen et Janssen 2007). C'est pourquoi, les tests aigus et chroniques sont effectués sur des daphnies nouveau-nés (âgés de moins de 24 heures). Le test chronique est beaucoup plus sensible que le test aigu, mais plus long et plus coûteux, raison pour laquelle nous avons opté pour le test aigu. Ainsi, pour étudier les effets des mélanges, le test aigu semble particulièrement adapté car il permet de tester un grand nombre de conditions dans un temps relativement court compatible avec un grand nombre de conditions à tester et un nombre de réplicats important.

1.2 Biologie de *D. magna*

D. magna est un microcrustacé appartenant aux Branchiopodes, généralement connu pour produire un courant d'eau à partir de son appareil de filtration (Manar, 2008) (voir Figure 1).

Taxonomie :

Règne : Animalia

Phylum : Arthropoda

Sous-phylum : Crustacea

Classe : Branchiopoda

Sous-classe : Phyllopoda

Ordre : Diplostraca

Sous-ordre : Cladocera

Famille : Daphniidae

Genre : *Daphnia*

Espèce : *Daphnia magna* (Straus, 1820)



Figure 1 : Taxonomie de *Daphnia magna* et image d'une femelle adulte enceinte prise de notre culture

Ce cladocère planctonique est fréquemment retrouvé dans les eaux douces stagnantes des zones de climat tempéré (Chevalier, 2014) : on peut le trouver en Algérie dans les rivières et les lacs, les étangs et les cours d'eau, les mares temporaires méditerranéennes ou dans les eaux saumâtres, tel est le cas de notre récolte qui provient du golfe d'Annaba, qui est un vaste golfe de la mer Méditerranée, avec des températures optimales variant de 18 à 22°C (Belhamzaoui et *al.*, 2023 ; WoRMS 2012), bien qu'ils puissent tolérer une gamme de températures beaucoup plus large (Ebert, 2005).

1.3 Morphologie et métabolisme

La longueur du corps de *D. magna* varie de 3 à 5 mm à l'âge adulte ; son anatomie est illustrée dans les Figures 02, 03 et 04. Le corps est divisé en deux parties : une tête antérieure et le thorax, comme décrit (Ebert, 2005).

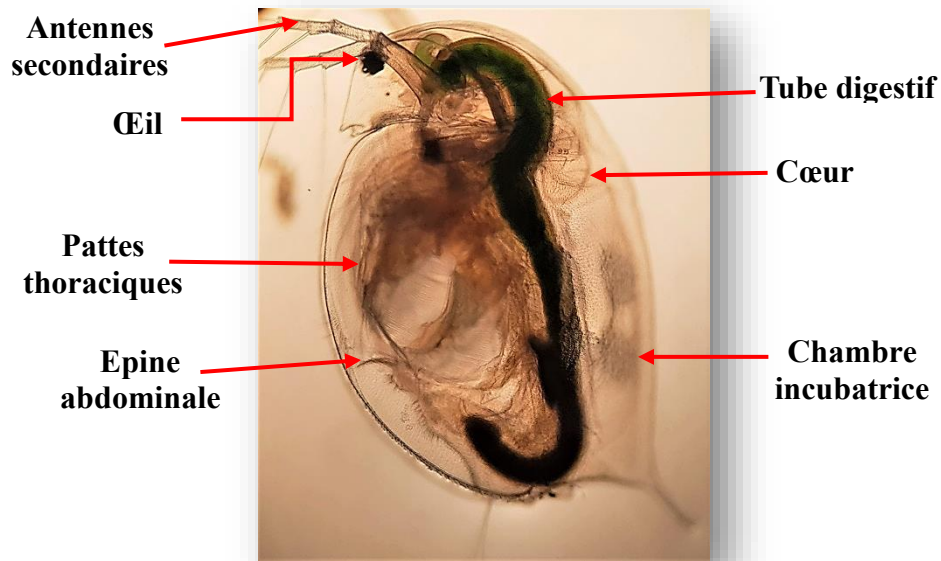


Figure 2 : Femelle *D. magna* de 21 jours issue de notre culture. Photographie réalisée avec une caméra d'un Samsung Galaxy S20+ monté sur un microscope optique (Leica ATC 2000 Microscope, Wetzlar, Allemagne)

- **La tête**, lisse et arrondie, est inclinée ventralement et comprend l'ocelle, c'est-à-dire une paire de yeux latéraux fusionnés, la bouche et 2 antennes qui émergent de chaque côté de la tête, qui servent à la locomotion. Chaque antenne se compose d'un seul pédoncule basal, contrôlé par des muscles, et de deux rameaux partant de l'extrémité distale du pédoncule. Les deux rameaux portent de grandes soies natatoires plumeuses (Ebert, 2005).
- **Le thorax**, qui constitue la majeure partie du reste du corps, contient six appendices thoraciques, qui filtrent l'eau à travers des soies pour transporter la nourriture et l'oxygène jusqu'à leur bouche et leurs branchies. Les particules alimentaires sont arrêtées par ce filtre de soies et retenues dans la rainure alimentaire ventrale pour être ensuite dirigées vers la bouche. Le cœur se trouve dans la partie dorsale du thorax antérieur. Les gonades sont situées de chaque côté du tube intestinal ; ce dernier traverse tout le corps de haut en bas. Chez les femelles, l'ovaire s'ouvre dorsalement, via un oviducte, dans la chambre incubatrice. Les femelles

possèdent une grande poche incubatrice située sous la carapace dorsale dans laquelle les œufs sont incubés jusqu'à ce qu'ils achèvent leur développement embryonnaire et deviennent des cladocères juvéniles. L'abdomen se compose de l'anus à l'extrémité postérieure et d'une paire de griffes abdominales qui visent à nettoyer les appendices thoraciques (Ebert, 2005).

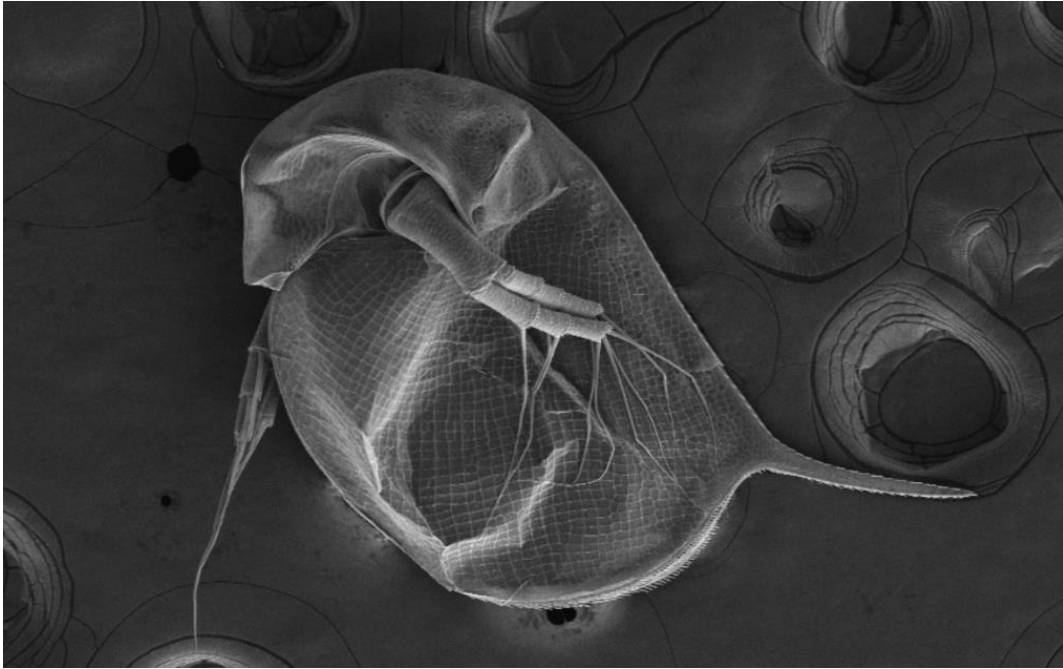


Figure 3 : Microscopie électronique à balayage d'une femelle adulte de *D. magna*, barre d'échelle 100 μm , image issue de (Chevalier, 2014).

Une carapace transparente qui lui sert de protection, est principalement composée de chitine et renouvelée à chaque mue (Chevalier, 2014). À l'âge adulte, les daphnies muent tous les 2 ou 3 jours. À l'âge juvénile, la croissance est très importante et les mues sont beaucoup plus fréquentes, car la croissance se produit après chaque mue lorsque la carapace est encore élastique (Manar, 2008 ; Toumi, 2013). La partie inférieure de la carapace se termine par une épine apicale dont la fonction peut être d'entraver la prédation (Hazanato, 1999). Le système nerveux des daphnies se compose du cerveau et des nerfs ventraux, qui relient le cerveau aux appendices et au corps de la daphnie (Zemen, 2008). Le cerveau est composé de trois parties différentes, chacune étant dédiée à une partie particulière du corps : le "protocérébron" (pour les yeux, les neuropiles optiques), le "deutocérébron" (antenne sensorielle) et le "tritocérébron" connecté aux antennes, aux nerfs

dorsaux et aux intestins (Weiss *et al.* 2012). Les daphnies ont une circulation sanguine ouverte, des protéines respiratoires extracellulaires et l'hémoglobine (Hb), afin d'assurer le transport de l'oxygène. Elles sont capables d'absorber des ions via des glandes absorbantes de chlorure, où l'excrétion et l'osmorégulation sont contrôlées par la glande coquillière (Chevalier, 2014) (Figure 04).

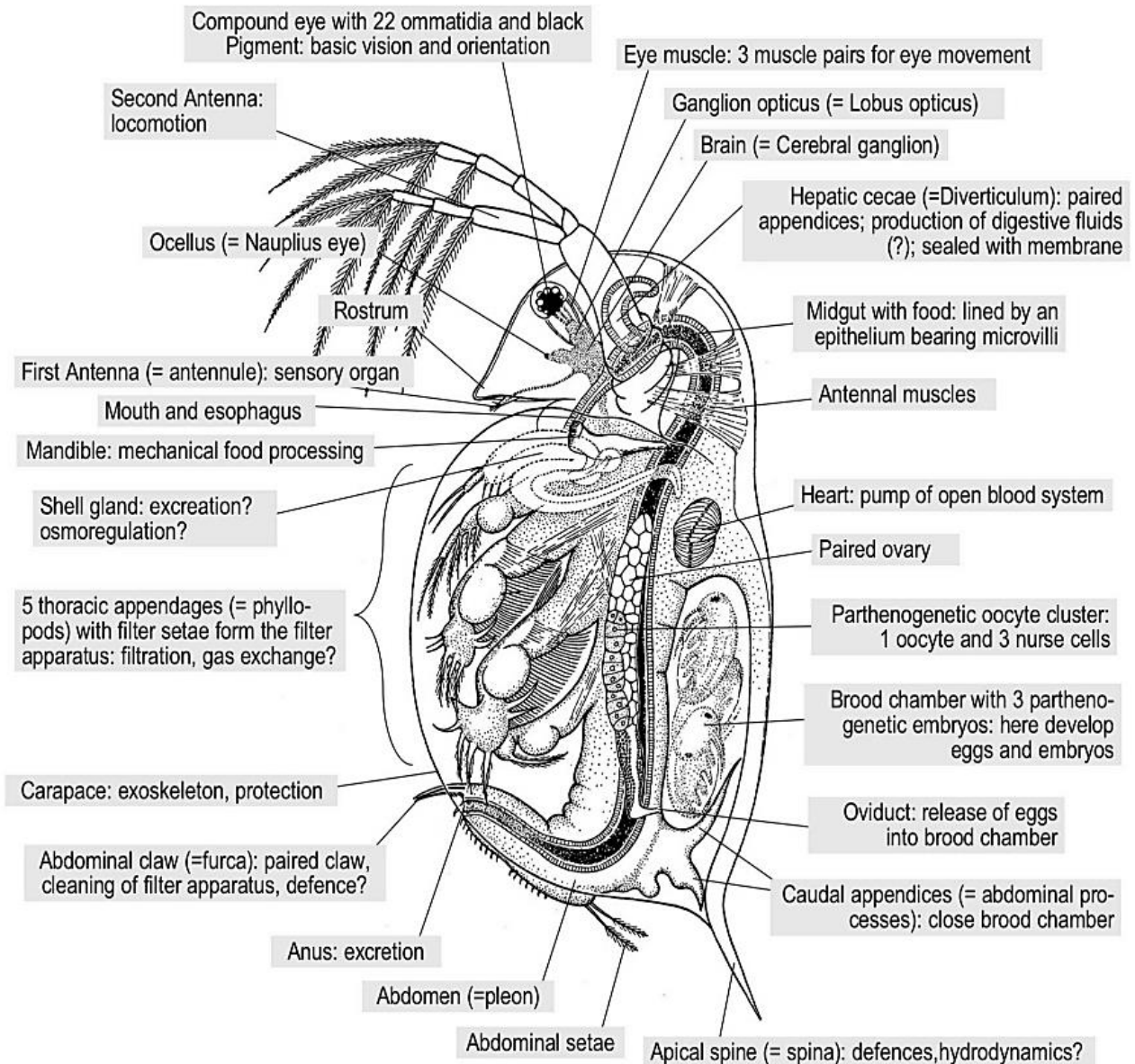


Figure 4 : Description physique de *D. magna* à l'étape adulte (Ebert, 2005).

1.4 Nutrition

Ce petit cladocère planctonique est un filtreur se nourrissant de petites particules en suspension dans l'eau (<50 µm de diamètre), principalement composées de producteurs primaires (c'est-à-dire d'algues, de levures et de bactéries). *D. magna* est consommé par les poissons zooplanctivores et par d'autres invertébrés (Poissons) (Chevalier, 2014).

1.5 Croissance, reproduction et cycle de vie

L'histoire de vie d'une daphnie peut se distinguer en quatre périodes distinctes :

(1) embryonnaire, (2) néonate ou juvénile, (3) jeune et (4) adulte. La croissance d'un embryon issu de la reproduction parthénogénétique suit 6 étapes distinctes de développement, qui se déroulent dans la chambre de reproduction maternelle (Ebert, 2005 ; Chevalier, 2014) (voir Figure 05) :

- **Étape 1** : 6 heures après la fécondation ou post-fécondation (pf), l'embryon est parfaitement sphérique, sans différenciation embryonnaire.
- **Étape 2** : 12 h pf, une différenciation cellulaire précoce se produit et l'embryon devient asymétrique.
- **Étape 3** : 24 h pf, la surface du corps et l'ocelle (c'est-à-dire, une paire composée de 2 yeux latéraux fusionnés) se forment progressivement.
- **Étape 4** : 36 h pf, maturation embryonnaire précoce, avec différenciation de la tête et de l'antenne secondaire, et formation de l'épine caudale sans se détacher de l'extrémité de la queue.
- **Étape 5** : 48 h pf, le tube de Malpighi a mûri avec une épine caudale droite et la deuxième membrane embryonnaire est rompue.
- **Étape 6** : croissance à 60 h, les première et deuxième antennes nouvellement nées se sont développées complètement, les embryons se développent à 72h en zoïdes matures et le corps commence à nager.

La mère libère les nouveau-nés par flexion ventrale du postabdomen, elle est capable à produire des œufs tous les 2 jours jusqu'à sa mort lorsque les conditions environnementales sont favorables. En général, la poche incubatrice de la femelle adulte peut contenir entre 6 à 12 œufs, mais ce nombre peut aller jusqu'à 60 œufs. La phase juvénile est marquée par une forte croissance

des organismes, et la taille du corps peut augmenter de manière significative (en double) après chaque étape marquée par la fin de la mue, étant donné l'élasticité de la nouvelle coquille. Ensuite, la phase juvénile est très courte car la daphnie devient sexuellement mature après 5 à 10 jours (premier cycle de reproduction). En laboratoire, la daphnie peut vivre pendant 6 à 8 semaines (Pietrzak *et al.*, 2010). Cependant, la durée de vie se prolonge en fonction de la baisse de la température en raison de l'inhibition du métabolisme : de 40 jours à 25 °C jusqu'à 56 jours à 20 °C. *D. magna* a généralement entre 6 et 22 cycles de reproduction à l'âge adulte, mais le nombre de descendants par cycle de reproduction est très variable en fonction des conditions environnementales (Ebert, 2005 ; Manar, 2008 ; Toumi, 2013 ; Chevalier, 2014 ; Moumeni, 2016).

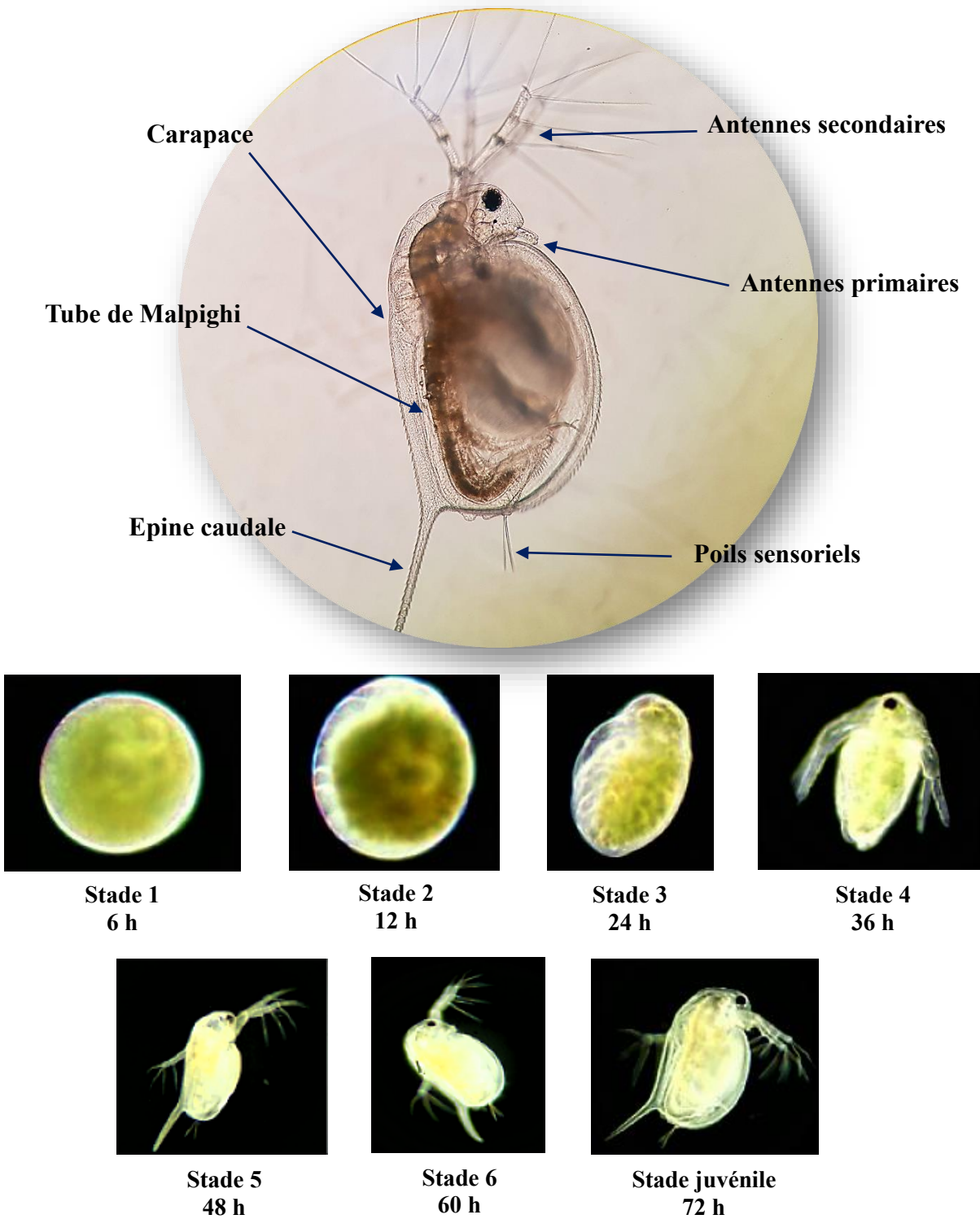


Figure 5 : Néonate de *D. magna* de 72 h (photo personnelle) et les différents stades précoces de développement présent de (Wang *et al.*, 2011).

D'après (Olmstead et LeBlanc, 2001), les mâles et les femelles peuvent être distingués principalement par leur taille, leur couleur et leur vitesse de déplacement. En effet, les mâles ont une taille plus réduite que celle des femelles, une paire de premières antennes plus grandes et plus développées, sont oranges et nagent beaucoup plus rapidement que les femelles, et sont généralement reconnus à travers l'absence de la poche incubatrice (Manar, 2008) (voir figure 06).

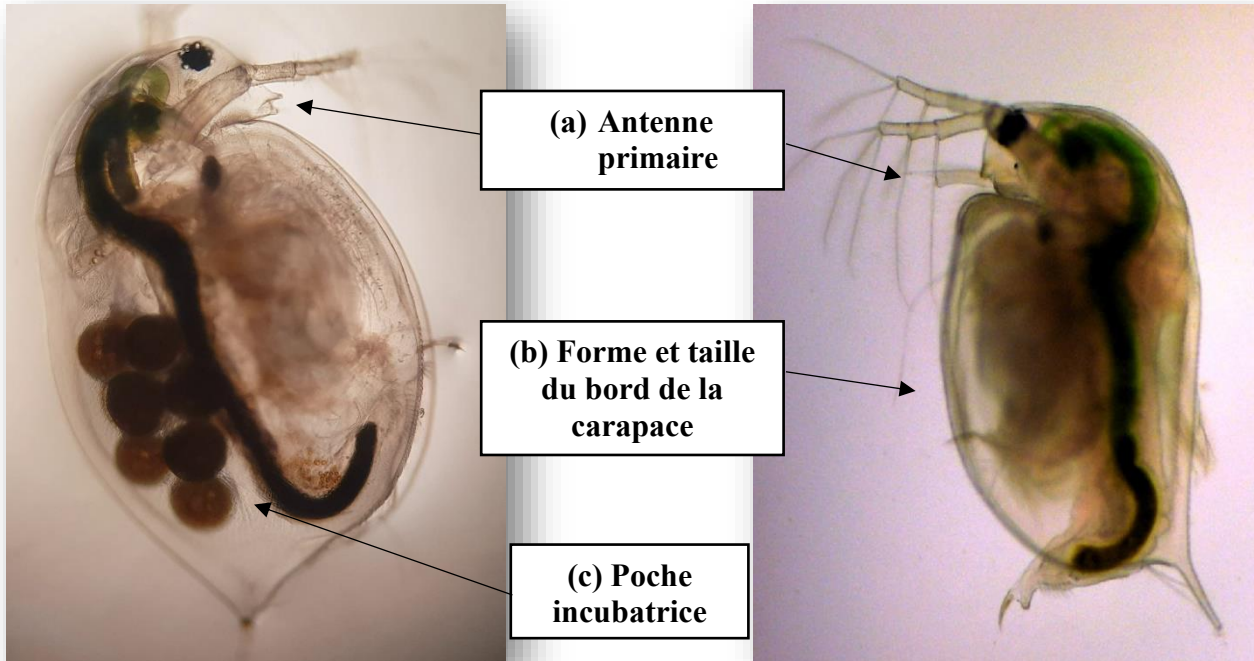


Figure 6 : *D. magna* femelle (à gauche) et mâle (à droite). (a) Antenne primaire plus long chez le mâle. (b) La femelle présente une forme symétrique de la carapace, tandis que celle du mâle est asymétrique. (c) La présence d'une poche incubatrice dorsale chez la femelle. (Photo femelle prise dans notre laboratoire, celle du mâle prise de (Ebert, 2005))

La reproduction de *D. magna* suit une parthénogenèse cyclique, qui implique l'alternance de deux phases différentes en fonction des conditions environnementales, à savoir des phases asexuée et sexuée (voir Figure 07) (Olmstead et LeBlanc, 2001 ; Ebert, 2005). Dans des conditions favorables, les femelles se reproduisent selon un mode asexué (par parthénogenèse) en produisant des clones exacts de femelles (œufs diploïdes qui se développent directement dans la chambre de reproduction de la mère). En laboratoire, les femelles se reproduisent par parthénogenèse

(reproduction asexuée) dans des conditions favorables et peuvent vivre pendant 6 à 8 semaines (Zeman, 2008).

En revanche, la reproduction sexuée se produit pendant les conditions défavorables (faible disponibilité alimentaire, températures extrêmes, assèchement ou contamination chimique du milieu, la diminution de la quantité en oxygène ou forte densité de population) (Zeman, 2008 ; Chevalier, 2014). Ce mode de reproduction est initié par la production de mâles et la production d'œufs de repos par les femelles (œufs haploïdes) toujours produits par paires qui, après fécondation par les mâles, entrent en diapause embryonnaire enfermés dans des « éphippies » (membranes protectrices très résistantes composées de deux cavités) (voir Figure 07). Typiquement, chaque cavité renferme deux grands œufs, et ceux-ci engendrons une lignée de daphnies génétiquement distincte de leurs mères après que les conditions environnementales se stabilisent à nouveau (Kleiven *et al.*, 1992 ; Chèvre, 2000 ; Zeman, 2008).

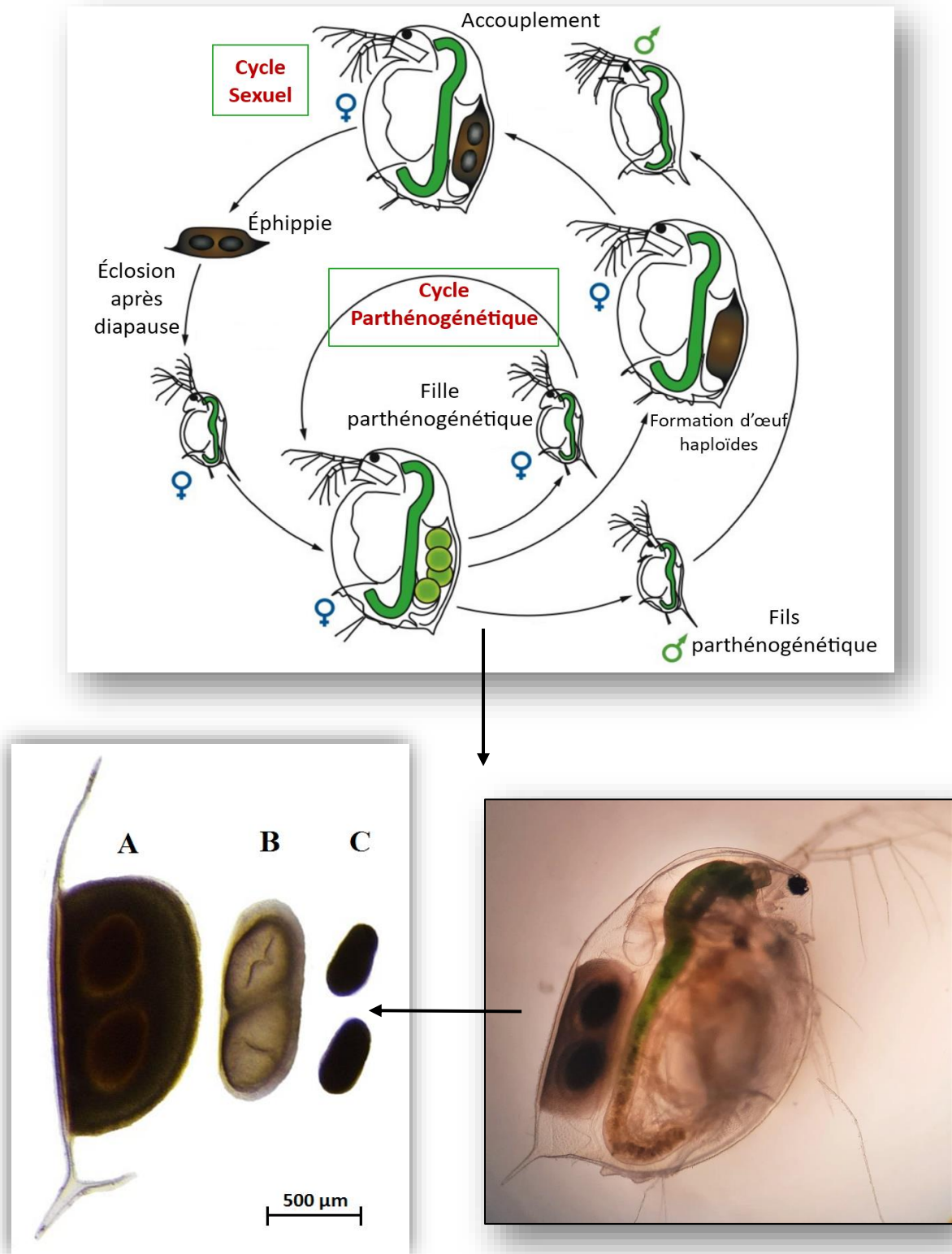


Figure 7 : En haut, cycle de vie parthénogénétique cyclique et sexuel de *D. magna* (dessiné par Dita B. Vizoso, Université de Fribourg, repris de Ebert, 2005) ; A droite, une photo d'une femelle

adulte avec des éphippies, prise de notre culture ; A gauche, œufs dormants de *D. magna* immédiatement après la décapsulation : (A) L'éphippium ; (B) la membrane interne de l'œuf ; (C) les œufs dormants (photographiés par Cuenca Cambronero et Orsini, 2018).

1.6 Écologie comportementale et locomotion

Les Daphnies sont couramment appelés puces d'eau en raison de leur comportement de saut qui induit une nage saccadée (Toumi, 2013). Leur locomotion est caractérisée par de petits battements d'antennes qui permettent un mouvement rapide vers le haut, mais lorsque les daphnies cessent de nager, ils coulent rapidement vers le fond (Ebert, 2005). Cet organisme est principalement pélagique (c'est-à-dire qu'il se trouve dans la colonne d'eau) (Chevalier, 2014). Cependant, le comportement des daphnies est régi par la migration verticale diurne : une migration vers les niveaux supérieurs de la colonne d'eau pendant la nuit, puis vers le bas tôt le matin et pendant la journée. La migration verticale diurne est induite par la phototaxie (Ringelberg, 1964), mais reflète également les effets combinés de l'évitement des prédateurs et de la famine (Dawidowicz et Loose, 1992, Stirling et Roff, 2000). En effet, pendant la journée, les daphnies se cachent des poissons dans les niveaux d'eau inférieurs, car elles sont moins détectables visuellement par les prédateurs en raison de l'intensité lumineuse faible. Cependant, l'offre alimentaire est faible dans les niveaux d'eau inférieurs, donc pendant la nuit, les daphnies profitent de la nourriture plus abondante (algues planctoniques) dans les niveaux d'eau supérieurs (Chevalier, 2014).

Un autre comportement typique peut être observé lorsque la nourriture est limitée : les daphnies peuvent s'accrocher aux substrats ou aux plantes à la surface ou au fond pour rechercher de la nourriture. Elles peuvent ajuster leur vitesse de nage par rapport à la quantité d'algue contenue dans le milieu (diminution de la vitesse de nage à des concentrations élevées en algues). Les daphnies semblent posséder des sens olfactifs permettant d'éviter les prédateurs (Rozen et Lüring, 2001). Les défenses chimiques induites par les prédateurs sont bien connues chez les organismes planctoniques, diverses réponses morphologiques, comportementales et de l'histoire de vie ont été observées et induites par la présence chimique de prédateurs potentiels (Lass et Spaak, 2003). Les daphnies ont été signalées comme capables de détecter la présence de prédateurs potentiels grâce à la kairomone, un signal chimique induisant généralement une réaction comportementale ou physiologique (De Meester, 1993). Par exemple, des changements comportementaux

phototactiques rapides ont été observés chez *D. magna* exposée aux kairomones des poissons (Boersma et Spaak, 1998, De Meester et Cousyn, 1997). Ces réponses sont supposées être une réaction adaptative pour réduire le risque de prédation. Selon (Szulkin *et al.*, 2006), l'uniformité du comportement de nage peut être un mécanisme de défense important chez le zooplancton, visant à ne pas attirer l'attention parmi les membres du groupe et ainsi réduire le risque de prédation.

2 Système reproducteur masculin chez le mammifère rat *Wistar*

Le système reproducteur masculin est composé d'une paire de testicules responsables de la production de spermatozoïdes et d'hormones sexuelles, ainsi que des voies spermatiques comprenant l'épididyme, le canal déférent, l'urètre, le pénis et les glandes annexes (bulbo-urétrales, la prostate et la vésicule séminale), assurant la maturation, la circulation et la libération des spermatozoïdes. Les glandes annexes quant à eux, sécrètent les fluides de transport et de nutrition qui, une fois associés aux spermatozoïdes, forment le sperme (Figure 08) (Fawcett, 1993).

2.1 Testicules et tube séminifères

Les testicules et les tubules séminifères sont des organes complexes et compartimentés qui jouent deux fonctions importantes dans le processus de reproduction : la production d'hormones sexuelles stéroïdes et la production de gamètes mâles, les spermatozoïdes (Wilhelm *et al.* 2007), à travers les deux processus : spermatogenèse et spermiogenèse (Carreau et Hess, 2010). Ces fonctions testiculaires sont contrôlées par des gonadotrophines et divers facteurs synthétisés localement, tels que des stéroïdes, des facteurs de croissance et des cytokines (Konan, 2019) (Figure 08).

Le tissu testiculaire est divisé en deux compartiments : les tubules séminifères qui sont le siège de la production des spermatozoïdes, et le tissu interstitiel qui se trouve entre ces tubules, constitué de tissu conjonctif lâche, de cellules de Leydig, de fibroblastes, de lymphocytes, de macrophages et de vaisseaux sanguins et lymphatiques (Leeson, 1963).

Les tubules séminifères fournissent un environnement propice au développement des cellules germinales, et sont considérés comme l'unité fonctionnelle du testicule, où la production de gamètes a lieu, l'épithélium étant constitué de cellules de Sertoli entourées de cellules germinales, qui se différencient par méiose en spermatozoïdes (Goncalves, 2018). L'épithélium séminifère est entouré de cellules pérítubulaires ou myoïdes, qui sont en contact avec la partie basale des

spermatogonies et des cellules de Sertoli (Tung *et al.*, 1984a). Les contractions provoquées par ces cellules sont essentielles pour le déplacement des spermatozoïdes tout au long de la lumière des tubules séminifères (Krawetz *et al.*, 2009). Les cellules de Sertoli, quant à elles, sont considérées comme le principal composant structural de l'épithélium séminifère car elles jouent un rôle central dans le développement fonctionnel du testicule (Rato *et al.*, 2012) (Figure 08).

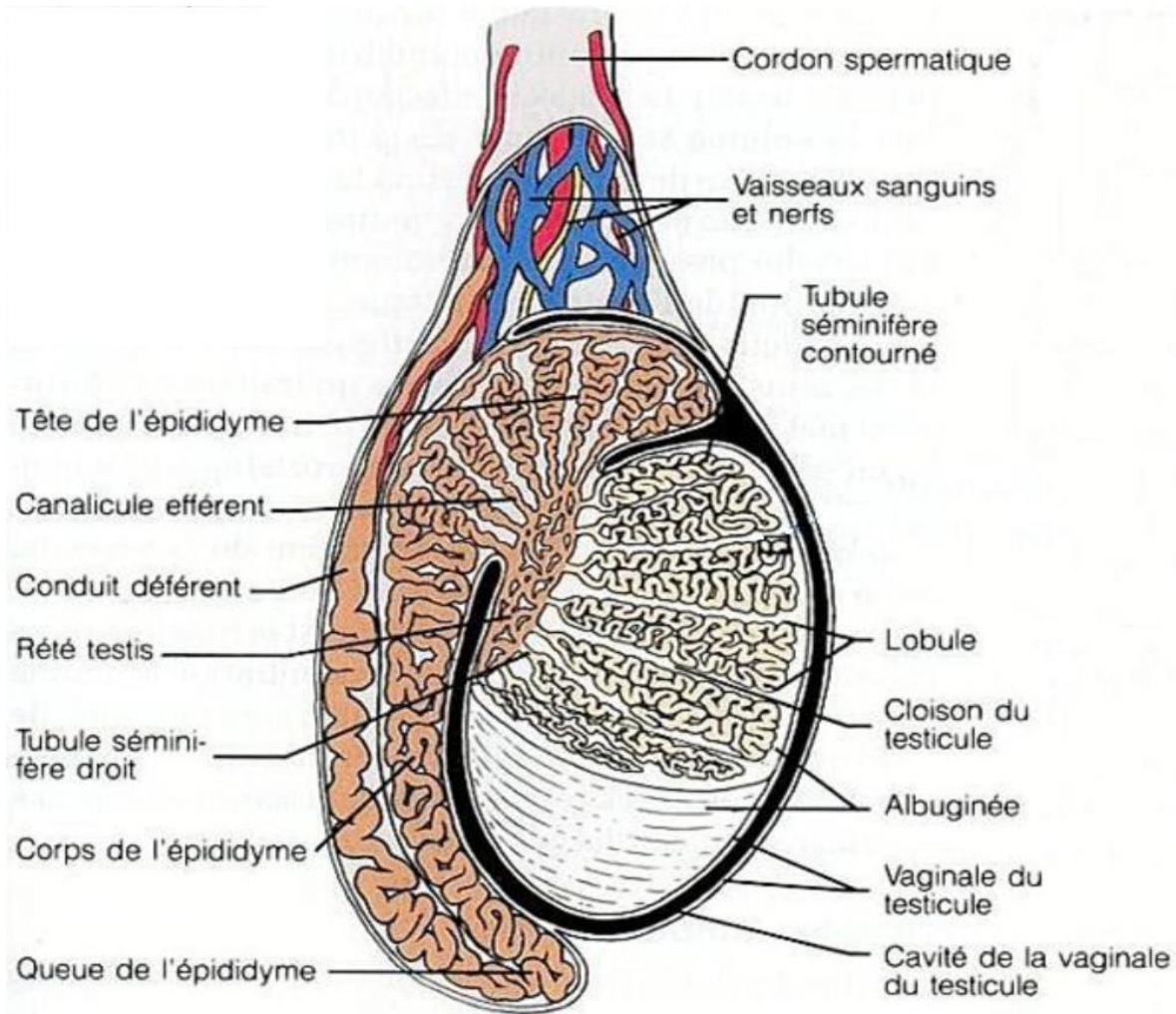


Figure 8 : Structure des testicules et l'épididyme chez l'homme (Bonnes *et al.*, 1998), prise de (Konan, 2019)

2.2 Stéroïdogénèse et cellules de Leydig

Les cellules de Leydig se trouvent dans le compartiment interstitiel du testicule. Ces cellules se regroupent autour des capillaires présents entre les tubules séminifères. Elles sont responsables de la synthèse et de la sécrétion d'hormones androgéniques (Ewing et Zirkin, 1983) et de facteurs

importants pour la différenciation, le développement et la maturation du système reproducteur masculin (Holstein et al., 2003 ; Ludwig, 2011).

Chez le rat, on peut distinguer deux types de cellules de Leydig qui peuvent être différenciées en : cellules de Leydig fœtales (**LF**) et adultes (**LA**). Au niveau des cellules adultes, les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la testostérone augmentent (Goncalves, 2018).

L'une des principales fonctions des cellules de Leydig est la synthèse du stéroïde androgène : la testostérone (Schulze, 1984), dont la production et la sécrétion sont contrôlées par l'hormone lutéinisante (LH) (Haider, 2004). Par le biais de la stéroïdogénèse, le cholestérol est converti en testostérone par une série de réactions enzymatiques (Tostain *et al.*, 2004), impliquant des enzymes telles que la StAR (protéine régulatrice aiguë de la stéroïdogénèse), la 3 β -HSD et la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD) (Stocco, 1997). La synthèse des androgènes par les cellules de Leydig est essentielle pour la différenciation du tractus génital masculin, la masculinisation et la différenciation sexuelle du système nerveux central pendant le développement sexuel masculin, ainsi que pour le maintien de la spermatogenèse à l'âge adulte (Konan, 2019 ; Ge et Hardy, 2007).

L'activité des cellules de Leydig, ainsi que des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, est régulée par divers facteurs. Parmi eux, on peut citer des hormones telles que la LH, les androgènes et œstrogènes, l'hormone antimüllérienne, et des facteurs de croissance comme les interleukines, l'inhibine et le facteur de croissance transformant β (Haider, 2004).

2.3 Les cellules de Sertoli

Ces cellules sont l'élément structural principal de l'épithélium séminifère. Souvent appelées "cellules nourricières", car elles sont responsables de la régulation du flux de nutriments et de facteurs de croissance vers les cellules germinales en développement (Ludwig, 2011) (voir figure 09). Les cellules de Sertoli forment des jonctions serrées près de la membrane basale entre les cellules adjacentes, créant ainsi la barrière hémato-testiculaire (BHT) qui sert de barrière physique, immunologique et physiologique, régulant le flux de molécules, de nutriments, de cellules du système immunitaire et de cytokines entre les compartiments basal et luminal du tubule séminifère (Petersen et Soder, 2006 ; Rato *et al.*, 2012). Ainsi, ces cellules fournissent des facteurs nécessaires

au métabolisme des cellules germinales, et sont également responsables de la production de facteurs de croissance des cellules souches (Skinner, 2005) (Figure 09).

Dans les testicules des mammifères, les cellules de Sertoli sont considérées comme élément clé dans l'initiation de la spermatogenèse ainsi que son maintien. La prolifération des cellules de Sertoli est plus active avant la naissance, et chez les rats, elle se poursuit jusqu'à trois semaines après la naissance, et une fois passé par le processus de maturation, ces cellules deviennent adultes et leur nombre par testicule est considéré comme stable tout au long de la vie du rat, déterminant ainsi la taille de ses testicules et leur production quotidienne en sperme (Petersen et Soder, 2006).

Plusieurs hormones, ainsi que des facteurs paracrines et autocrines agissent en ciblant les cellules de Sertoli, parmi eux, l'hormone folliculostimulante (FSH), la testostérone, les œstrogènes, les hormones thyroïdiennes, les facteurs de croissance, l'inhibine B et les cytokines inflammatoires. Ces derniers agissent en régulant des fonctions cellulaires telles que la sécrétion, la prolifération, la différenciation et l'activité enzymatique (Silva *et al.*, 2002 ; Sharpe *et al.*, 2003).

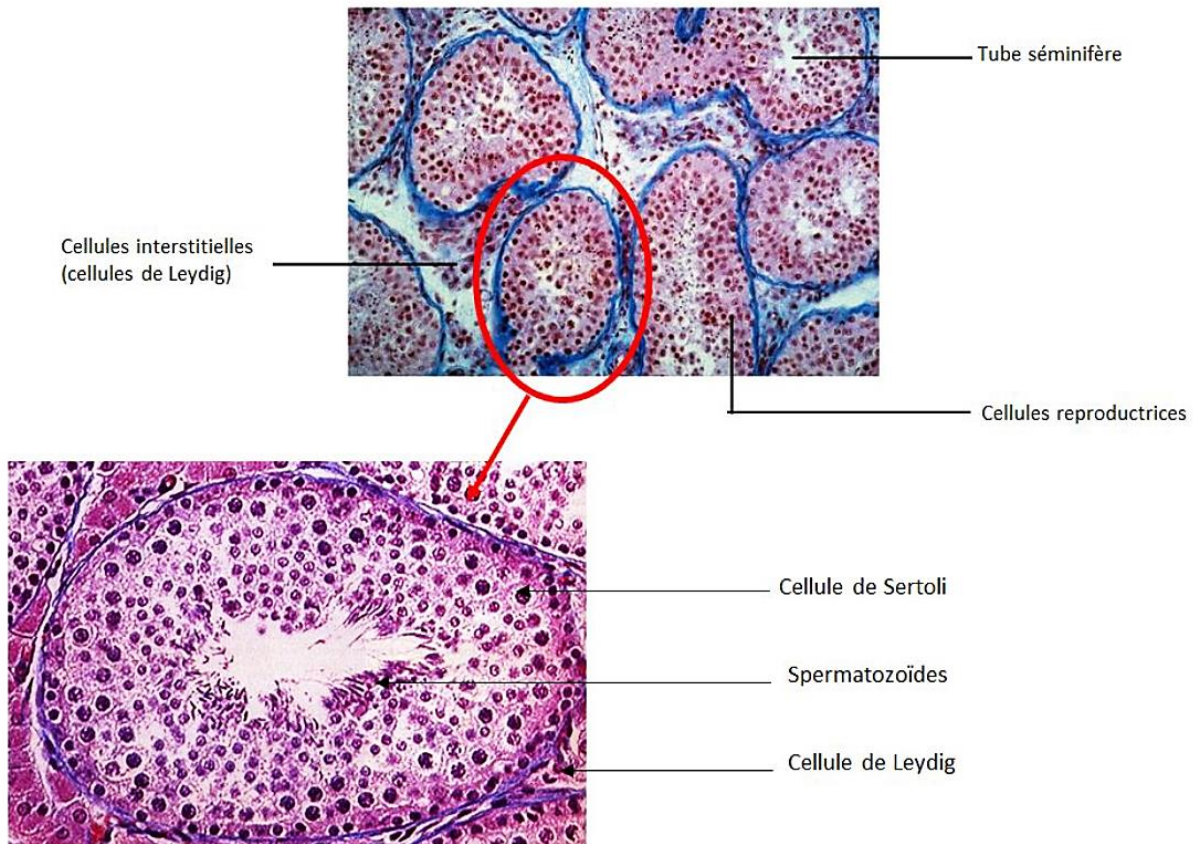


Figure 9 : Observation microscopique d'un tissu testiculaire impliquant les tubes séminifères et les différentes cellules de « soutien »

2.4 Spermatogenèse et cellules germinales

2.4.1 Définition

La spermatogenèse désigne le mécanisme de développement des gamètes mâles : les spermatozoïdes, subissant une différenciation complexe et impliquant diverses modifications morphologiques (Faure, 2007). Les testicules sont le siège principal de ce processus, précisément, aux niveaux des parois des tubes séminifères. Chez l'homme, la spermatogenèse dure environ 74 jours, tandis que chez les rats, elle se déroule pendant 52 jours (Clermont, 1972).

Les cellules germinales sont présentes dans les tubules séminifères, entre les cellules de Sertoli. Le processus de développement et de différenciation de ces cellules comporte différents stades, au cours desquels elles peuvent être classées en spermatogonies, spermatocytes primaires et secondaires, et spermatides (sphériques et allongées) (Holstein *et al.*, 2003 ; Hermo *et al.*, 2010).

2.4.2 Processus de la spermatogenèse

Les différentes phases de maturation d'une génération de cellules germinales suivent une succession chronologique à un point fixe du tubule séminifère, dans un processus appelé cycle de spermatogenèse (Bittman, 2015). Chez le rat, ce cycle peut être divisé en 14 étapes, où varient le type de cellule germinales prédominante et l'association entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales (Leblond et Clermont, 1952).

D'après (Walker, 2010), trois phases chronologiques principales caractérisent la spermatogenèse (voir Figure 10) :

- La mitose - prolifération mitotique des spermatogonies ;
- La méiose - maturation et différenciation des spermatocytes ;
- La spermiogenèse - processus morphologique où la spermatide haploïde est convertie en spermatozoïde (Leblond et Clermont, 1952).

2.4.2.1 Mitose - prolifération mitotique des spermatogonies

La spermatogenèse débute par la réplication mitotique des cellules souches spermatogéniques (spermatogonies de type A) situées à la membrane basale du tube séminifère afin d'assurer la lignée des cellules germinales et initier de nouvelles populations. Une des cellules filles se différencie en spermatogonie de type B, qui peut être identifiée par des critères morphologiques.

2.4.2.2 La méiose - maturation et différenciation des spermatocytes

La spermatogonie de type B se différencie en spermatocyte primaire, qui traverse la BHT (barrière hémato-testiculaire) et entre dans la première phase de la division méiotique, donnant naissance à des spermatocytes de type B. Lors de la deuxième division méiotique, des spermatides sphériques sont produites.

2.4.2.3 La spermiogenèse

Une fois les spermatides formées, la division cellulaire cesse et le processus de spermiogenèse commence, donnant naissance à des spermatides allongées (De Rooij, 2001). Ce processus se termine par la libération des spermatides allongées de l'épithélium germinatif dans la lumière du tubule séminifère (Hess et França, 2008). La première phase (prophase) de méiose s'achève entre le 24^e et le 25^e jour postnatal, où des spermatides de formes sphériques commencent à apparaître. Ensuite, et après environ 36 jours, un développement des premières cellules libres est remarqué, étant appelées spermatozoïdes matures (Holstein *et al.*, 2003).

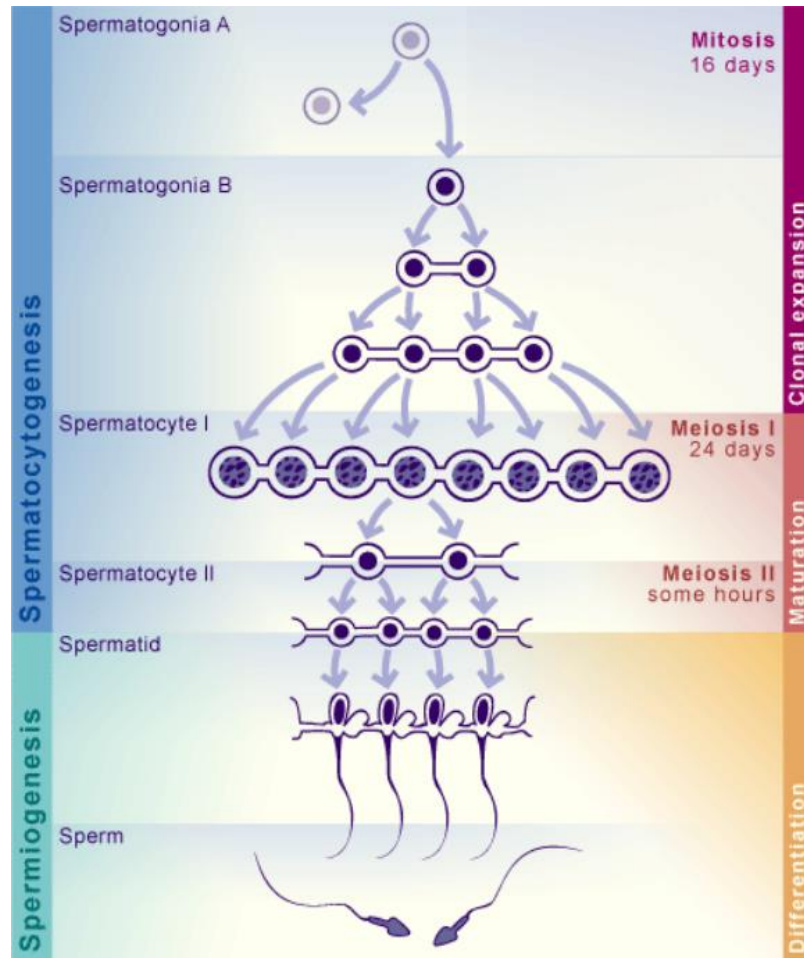


Figure 10 : Illustration schématique du processus spermatogénétique (prise du site <http://www.embryology.ch>)

2.4.3 Régulation de la spermatogénèse

La spermatogénèse est régulée par le complexe hypothalamo-hypophysaire (axe CHH) (voir figure 11), principalement par deux hormones hypophysaires : FSH et LH, qui relient fonctionnellement le cerveau aux testicules, et la dysfonction de cet axe conduit à l'infertilité (Holstein *et al.*, 2003). Dans l'hypothalamus, la sécrétion pulsatile de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) déclenche la libération de la LH à travers l'hypophyse, stimulant les cellules de Leydig à former de la testostérone. Cette dernière est distribuée dans tout l'organisme, fournissant un contrôle de rétroaction négative à l'hypophyse lié à l'activité sécrétoire des cellules de Leydig. Au niveau des tubules séminifères, la testostérone agit sur le processus de spermatogénèse. La stimulation des cellules de Sertoli par la FSH sécrétée par l'hypophyse est

essentielle à la maturation des cellules germinales (Ruwanpura *et al.*, 2010). En réponse à ce processus, un mécanisme de rétroaction négative dirigé vers l'hypophyse à travers la sécrétion de l'inhibine B par les cellules de Sertoli dans le but de diminuer la sécrétion de la FSH (Petersen et Soder, 2006).

La testostérone et la FSH sont indispensables dans le contrôle et le maintien de la spermatogenèse (Ruwanpura *et al.*, 2010). Chez les rongeurs, la FSH agit principalement sur le développement des spermatogonies, tandis que la testostérone semble avoir un effet négatif sur la prolifération. La testostérone soutient partiellement la maturation des spermatocytes, mais chez les rats, elle est essentielle à la progression des spermatides rondes vers les spermatides allongées. Tant la testostérone que la FSH sont nécessaires à la libération des spermatides des cellules de Sertoli (Shetty *et al.*, 2002).

La régulation de la spermatogenèse ne dépend pas uniquement des hormones du CHH, mais également de diverses molécules synthétisées localement par les cellules somatiques et germinales, telles que les stéroïdes (Goncalves, 2018). Outre les androgènes, les œstrogènes ont un impact direct dans la régulation de la spermatogenèse, stimulant des fonctions telles que la motilité, la production de lactate et le métabolisme de divers substrats chez les spermatozoïdes. D'autres facteurs de croissance sont également libérés par divers types de cellules germinales et des cellules de Sertoli, formant un système régulateur complexe des fonctions cellulaires et des processus de développement des cellules germinales (Alves *et al.*, 2013).

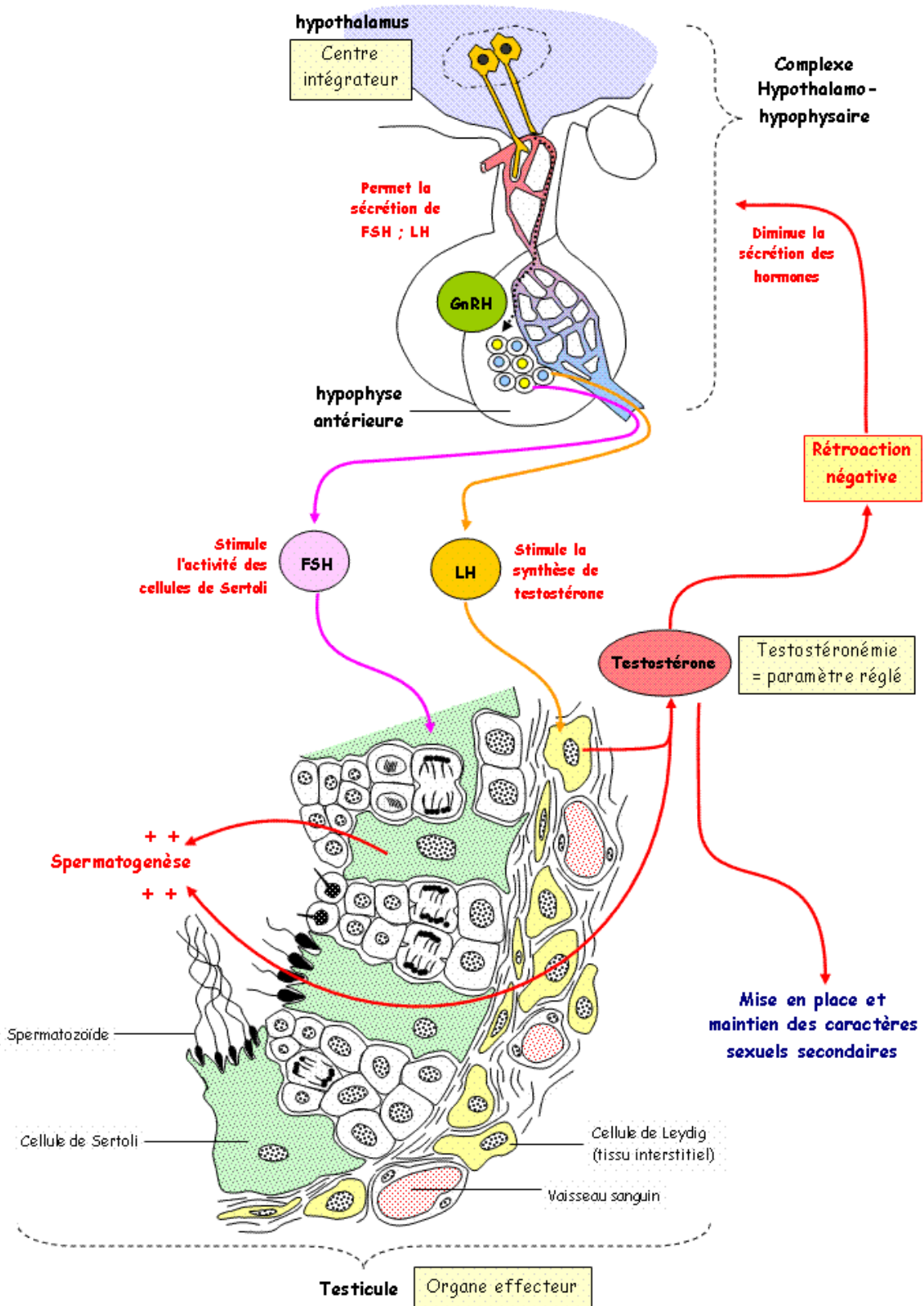
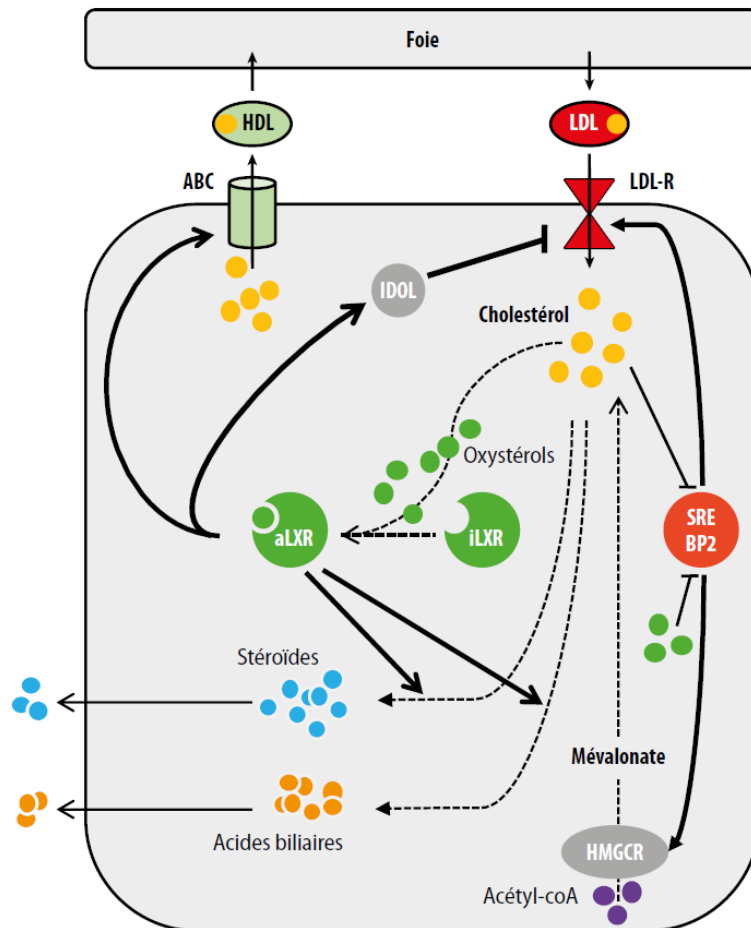


Figure 11 : Régulation physiologique de l'axe hormonal de la reproduction masculine (schéma dessiné par Sébastien Vigier, issu du site <https://svt.ac-dijon.fr>)

2.5 Influence des lipides sur la stérilité masculine : quels liens ?

Plusieurs études montrent un lien puissant entre la dyslipidémie et l'infertilité masculine (Lobaccaro *et al.*, 2018). En théorie, l'homéostasie du cholestérol est maintenue en trois stades : la synthèse intrinsèque initié via la "voie du mévalonate" (Goldstein JL et Brown, 1990), le passage cellulaire du cholestérol par les transporteurs membranaires ABC (ATP binding cassette transporters), et le flux plasmatique du cholestérol par les récepteurs membranaires, ou après métabolisation en acides biliaires et stéroïdes (Figure 12) (Lobaccaro *et al.*, 2018).



ABC : ATP-Binding Cassette ; *IDOL* : Inducible Degrader Of low density Lipoprotein receptor ; *aLXR* : LXR actifs ; *iLXR* : LXR inactifs ; *LDL-R* : Low-Density Lipoprotein Receptor ; *LDL* : Low-Density Lipoprotein ; *HDL* : High-Density Lipoprotein ; *HMGR* : 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A Reductase.

Figure 12 : Schéma représentatif du maintien de l'équilibre intracellulaire du cholestérol (Lobaccaro *et al.*, 2018).

Quand le cholestérol intracellulaire est bas, le facteur de transcription SREBP2 (Sterol Response Element Binding Protein 2) se met en action en amplifiant les niveaux des séquences codantes d'ARNm, notamment le récepteur membranaire des lipoprotéines de basse densité (LDL), ainsi que la HMGCR, une enzyme limitante essentielle dans la production de mévalonate et cible des statines hypocholestérolémiantes qui diminuent le taux de cholestérol.

Contrairement, en cas d'augmentation des niveaux de cholestérol, deux processus se produisent : les SREBP2 sont inactivés par le cholestérol et les oxystérols (dérivés oxydés du cholestérol). En même temps, les oxystérols entraînent l'activation de deux récepteurs nucléaires connu sous le nom de LXR (Liver X Receptors) α et β (Maqdasy *et al.*, 2016). Ces récepteurs agissent de trois manières différentes : l'accumulation des protéines ABC qui favorisent le passage des lipoprotéines de haute densité (HDL), ce qui entraîne un inversement du transport vers le foie ; l'accroissement de l'IDOL (ubiquitine ligase), dégradant ainsi le récepteur LDL (réduit en conséquence l'entrée de cholestérol) ; la biotransformation du cholestérol en stéroïdes (Volle et Lobaccaro, 2007), ou en acides biliaires (Baptissart *et al.*, 2014) en fonction des tissus (voir figure 12).

Par conséquent, les perturbations intracellulaires du cholestérol ont un impact sur : la fonction des tissus stéroïdogènes et la formation de stéroïdes, donnant naissances à des anomalies de la stérilité masculine ; le rôle des cellules somatiques (cellules de Leydig et Sertoli), ou appelées cellules "de soutien" pour la différenciation des spermatozoïdes, ainsi que l'influence direct sur la différenciation des spermatozoïdes et leur survie au niveau des gonades ou lors de leur déplacement à travers les canaux séminifères (principalement celle de l'épididyme) (Figure 13).

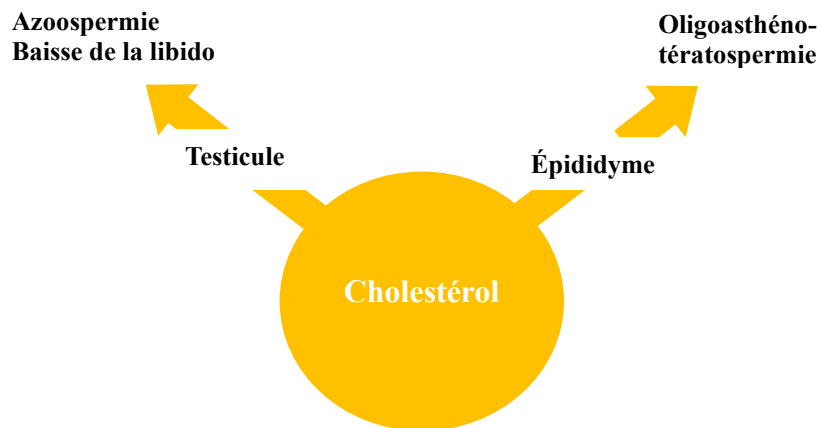


Figure 13 : Anomalies de la fertilité masculine provoquées par la perturbation de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol dans les organes cibles

3 Généralités sur les substances pharmaceutiques

Les produits pharmaceutiques, en tant que molécules synthétiques, sont considérés comme des composés complexes en raison de leurs multiples caractéristiques impliquées dans diverses fonctions (Kermiche, 2016). Ces ingrédients médicamenteux sont souvent spécifiques, connues pour leurs propriétés biologiques et physicochimiques, ce qui leur permet de produire l'effet souhaité du médicament (Giri et Pal, 2014). Cependant, ces substances sont également qualifiées de produits émergents (Miller *et al.*, 2018), et leur présence bioactive dans les milieux aquatiques suscite des préoccupations en raison des effets nocifs potentiels sur la santé humaine et les écosystèmes (Zhang *et al.*, 2022). Les processus et mécanismes d'élimination de ces composés sont complexes, ce qui explique leur résistance à la photo-dégradation, à la biodégradation, à la phytoremédiation et à la sorption (Dave, 2012 ; Zhang *et al.*, 2022).

3.1 Les stéroïdes sexuels

Parmi les classes de composés pharmaceutiques les plus courants en termes d'usage et influence sévère sur la majorité des organismes vivants, les hormones sexuelles (Santos *et al.*, 2010), révélées en trois types essentiels (Voir Figure 14, Tableau 02) :

- **Les Androgènes**, également appelés hormones sexuelles masculines, dont la testostérone qui est la principale responsable du phénotype masculin (apparences et comportements).
- **Les Œstrogènes et Progestatifs**, issus d'une source naturelle ou synthétiques, sont considérées comme des hormones sexuelles féminines assurant la régulation du cycle féminin et la préservation de la grossesse. Par conséquent, ces hormones sont utilisées dans la contraception orale par les femmes, en prenant des stéroïdes sexuels produites chimiquement contenues dans les pilules contraceptives.

Toutes ces hormones sexuelles sont synthétisées à partir du cholestérol dans un processus appelé stéroïdogénèse (Goncalves, 2018).

Tableau 02 : Classes de stéroïdes sexuelles avec des exemples de composés et des références à leur présence dans l'environnement aquatique.

Classes	Description	Exemples	Références
Androgènes	Ces composés sont communément appelés hormones sexuelles mâles, car ils contrôlent le développement et le maintien des caractéristiques sexuelles chez les vertébrés mâles. Ils sont toutefois également produits à de faibles niveaux chez les femelles. La synthèse naturelle de ces composés a lieu dans les glandes surrénales, les testicules et les ovaires. Des analogues synthétiques de ces composés ont été développés et utilisés en médecine vétérinaire et en médecine humaine.	<p>Naturel: Testostérone, androstérone et dihydrotestostérone</p> <p>Synthétique: Méthyltestostérone</p>	Havens et al., 2020 ; Ankley et al., 2018
Œstrogènes	Les œstrogènes sont un groupe de composés chimiquement similaires qui jouent un rôle clé dans le développement du système reproducteur féminin et dans la régulation des caractéristiques sexuelles secondaires de la femme. Communément appelés hormones sexuelles féminines, ils sont également présents chez les mâles, mais à des niveaux plus faibles que chez les femelles. Le 21 ^e siècle a vu une augmentation significative de l'utilisation de ces composés en médecine humaine et vétérinaire.	<p>Naturel: Estrone (E1), Estradiol (E2) et Estriol (E3)</p> <p>Synthétique: Éthinylestradiol (EE2)</p>	Hu <i>et al.</i> , 2019 ; Aris <i>et al.</i> , 2014
Progestérones	Les progestatifs sont une classe d'hormones stéroïdiennes qui jouent un rôle important dans le cycle œstral et menstruel et dans le maintien de la grossesse. Comme les autres classes de stéroïdes, plusieurs formes synthétiques de progestatifs ont été développées et utilisées en médecine humaine et vétérinaire.	<p>Naturel: Progéstérone</p> <p>Synthétique: noréthistérone, Lévonorgestrel (LNG)</p>	Ojogoro <i>et al.</i> , 2017 ; Ojogoro <i>et al.</i> , 2021

Stéroïdes sexuels

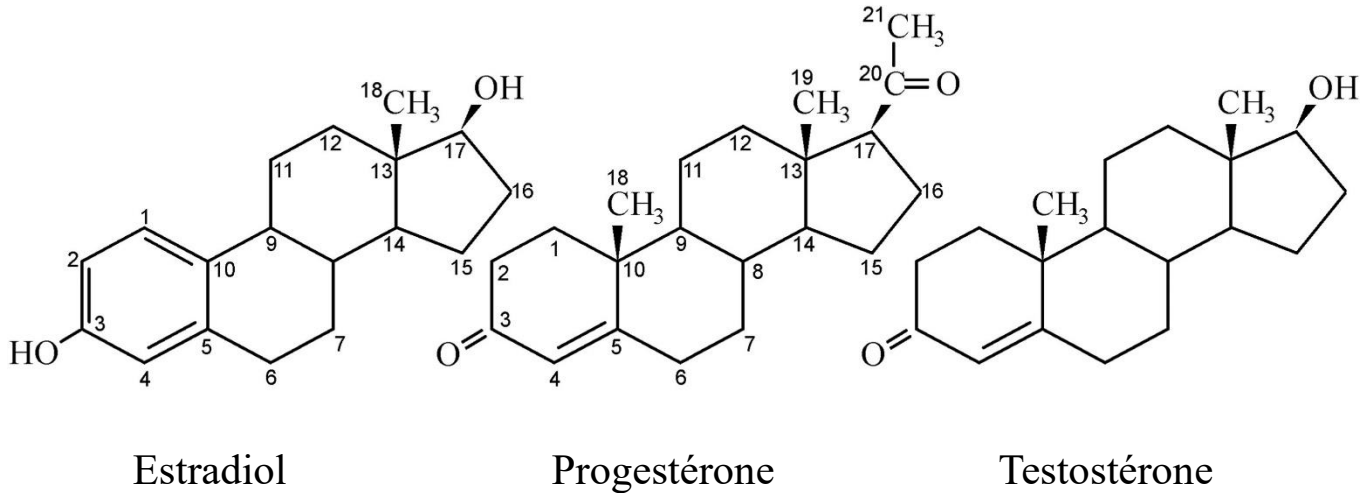


Figure 14 : Structure des membres représentatifs des classes d'hormones stéroïdiennes, les numéros de carbone étant indiqués pour l'estradiol et la progesterone

3.2 Les stéroïdes synthétiques

Les hormones synthétiques contenues dans les pilules contraceptives sont des composés chimiques créés pour reproduire les effets des hormones naturellement produites par le corps (Steinbach *et al.*, 2023). Les deux types d'hormones synthétiques les plus couramment utilisées dans les pilules contraceptives sont les œstrogènes et les progestatifs, tel que l'éthinylestradiol (EE2) et le lévonorgestrel (LNG), respectivement.

3.2.1 Pharmacologie des stéroïdes synthétiques

Les stéroïdes sexuels synthétiques où appelé également contraceptifs oraux, agissent chez les femmes en interférant avec le fonctionnement du cycle ovarien (Bouchard *et al.*, 2021), ils inhibent l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) libérée par l'hypothalamus, inhibant ainsi la libération d'hormones hypophysaires qui stimulent l'ovulation et réduire par conséquence la mobilité des spermatozoïdes (Dericks-Tan *et al.*, 1983 ; Endrikat *et al.*, 2011 ; Teal et Edelman, 2021). Plus précisément, c'est les œstrogènes qui améliorent l'efficacité contraceptive en supprimant les (GnRH) (Teal et Edelman, 2021), et les progestatifs réduisent la réceptivité de l'endomètre et la survie et le transport des spermatozoïdes vers la trompe de Fallope (Critchley *et al.*, 1998).

Ces produits chimiques peuvent ne pas avoir d'effets catastrophiques évidents tels que ceux observés par les perturbateurs endocriniens, qui a dévasté des populations d'organismes aquatiques (Gee, 2006), ils peuvent toutefois avoir des effets moins évidents, mais qui causent néanmoins des dommages irréversibles à des organismes individuels, et d'induire une toxicité aux niveaux de plusieurs espèces aquatiques et mammifères à des concentrations infimes de l'ordre du ng/l (Desbrow *et al.*, 1998 ; Jobling et Owen, 2011).

3.2.2 Caractéristiques des stéroïdes synthétiques

Une raison de s'inquiéter de la présence d'hormones stéroïdes synthétiques dans l'environnement est qu'elles sont susceptibles d'être considérablement plus résistantes à la dégradation, et seront donc plus persistantes, que les hormones stéroïdes naturelles. Les hormones stéroïdes synthétiques ont été conçues pour être plus résistantes au métabolisme chez les patients, ce qui leur permet d'être prises moins fréquemment, à des doses plus faibles, et d'être plus biodisponibles, donc plus puissantes (Ojogoro *et al.*, 2021).

Pour le cas des œstrogènes synthétiques, prenons l'exemple de l'éthinylestradiol (EE2) dont la biodisponibilité est considérablement améliorée et qui résiste mieux au métabolisme, lorsqu'il est pris par voie orale par les patients par rapport à l'œstradiol (E2) (Ojogoro *et al.*, 2021). C'est le groupe éthinyle au carbone 17 (C17) qui bloque l'oxydation du groupe C17-hydroxy, une caractéristique structurelle que l'on trouve sur un nombre important d'autres hormones stéroïdes synthétiques. Cet obstacle stérique du métabolisme est le principal facteur responsable de l'augmentation spectaculaire de la puissance de l'EE2 par rapport à l'E2 (Hamid et Eskicioglu, 2012 ; Adeel *et al.*, 2017). Cette puissance accrue se produit également chez les poissons, probablement pour la même raison : Thorpe *et al.* (2003) ont rapporté que l'EE2 était entre 11 et 27 fois plus puissante que l'E2 pour stimuler la synthèse de la vitellogénine chez les poissons lorsqu'elle est présente à des concentrations d'eau similaires.

Aussi, de nombreuses hormones stéroïdes synthétiques, notamment les progestatifs, contiennent des groupes halogènes, le plus souvent inséré est le fluor (Wang *et al.*, 2014). Plusieurs facteurs expliquent la forte prévalence de l'inclusion de fluor dans les hormones stéroïdes synthétiques. La première est que l'incorporation du fluor, le deuxième plus petit atome après l'hydrogène, dans la structure stéroïdienne ne modifie pas radicalement la structure mère, maintenant ainsi l'activité biologique de la molécule. Mais peut-être que le facteur le plus pertinent

pour la présence environnementale d'hormones stéroïdes fluorées est que le métabolisme est souvent ralenti par rapport au composé parent non fluoré, en raison du fait que la liaison C-F est la liaison la plus forte que le carbone peut former (Ojogoro *et al.*, 2021).

3.3 La Pilule contraceptive

En 2011, Jobling et Owen ont rapporté qu'il existe 32 types de pilules contraceptive à leur époque, mais aujourd'hui, on considère deux grands types :

- **La pilule oestro-progestative (ou minidosée)** : comprend 1 œstrogène de synthèse (l'éthinylestradiol) et un progestatif de synthèse en combinaison, comme le cas de celle de 2^{ème} génération qui contient le lévonorgestrel.
- **La pilule microprogestative (ou microdosée)** : contient 1 progestatif de synthèse seulement.

Notant qu'il existe différents dosages (μg) et différents types de progestatifs suivant la pilule.

3.3.1 La pilule : Preuve d'une atteinte à l'environnement !

L'efficacité de la pilule varie en fonction de la dose, de la puissance et de la demi-vie du progestatif ou de l'œstrogène ainsi que de facteurs dépendants de l'utilisateur, tels que le respect du calendrier de prescription (Teal et Edelman, 2021), qui nécessite l'apport journalier de la dose pendant au minimum 21 jours et plus. Depuis le début de cette industrie, Certains scientifiques affirment que l'utilisation de la pilule contraceptive pouvait causer des problèmes environnementaux (Tabak et Bunch, 1970 ; Ojogoro *et al.*, 2011, 2021). Ils ont réalisé que les médicaments administrés par voie orale, y compris les contraceptifs, sont en fait des méthodes plutôt inefficaces pour administrer des médicaments à l'organisme, puisqu'il faut une grande quantité de médicament administré par voie orale pour en faire passer une petite quantité dans la circulation sanguine (Jobling et Owen, 2011). Le reste du médicament traverse le corps et se retrouve dans les eaux usées sous forme d'urine et de fèces (Adeel *et al.*, 2017). Les stations d'épuration des eaux (STEPs) et des déchets n'étant pas conçues pour éliminer les produits pharmaceutiques (ni d'ailleurs d'autres produits chimiques fabriqués par l'homme) (Auriol *et al.*, 2020), il est probable que le contenu de nos armoires à pharmacie soit involontairement transféré directement dans l'environnement et, à terme, même dans les réserves d'eau potable.

4 Hormones synthétiques utilisées

4.1 Structures et caractéristiques physicochimiques

Dans le cadre de notre recherche, nous nous concentrons sur l'étude de deux hormones sexuelles synthétiques qui figurent parmi les médicaments les plus prescrits, notamment les pilules contraceptives, à savoir l'œstrogène éthinylestradiol (EE2) et le progestatif lévonorgestrel (LNG).

4.1.1 Éthinylestradiol (EE2)

L'éthinylestradiol ou 17 α -éthinylestradiol (EE2), un œstrogène synthétique et ingrédient actif de la pilule contraceptive. Développé pour la première fois en 1938, il est rejeté dans l'environnement aquatique par les stations d'épuration des eaux usées (Jobling et Owen, 2011). C'est une hormone synthétique féminine artificielle avec une action œstrogénique assez élevée qui, même à des concentrations extrêmement faibles, a un fort impact biologique, environ 10 fois plus élevé que les œstrogènes produits naturellement par le corps humain (Thomas *et al.*, 2001 ; Johnson et Williams, 2004 ; Zagalo *et al.*, 2020), avec une PNEC (concentration prévue sans effet) de 0,1 ng/L pour la toxicité chronique en milieu aquatique (Laurenson *et al.*, 2014) (Figure 15, Tableau 03).

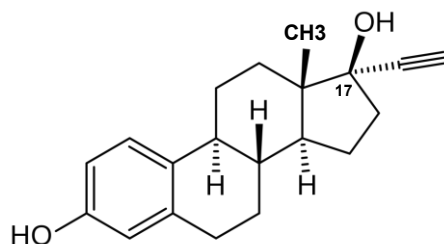


Figure 15 : Structure chimique d'éthinylestradiol (EE2)

Tableau 03 : Propriétés physicochimique d'éthinylestradiol (EE2).

Nom commun	Éthinylestradiol
Masse moléculaire	296,41 g/mol
Formule moléculaire	C ₂₀ -H ₂₄ -O ₂
Solubilité dans l'eau	4.8 mg/l à 20°C ; 11.3 mg/l à 27°C
Solubilité dans les solvants organiques	Ethanol (1 partie sur 6), acétone (1/5), chloroforme (1/20), éther et dioxane (1/4)
Koc	192 - 2955 l/kg

log Kow	4.14
Pression de vapeur/Constante de la loi de Henry	4.50×10^{-10} mmHg à 25°C / 8.04×10^{-7} Pa.m ³ /mol
Facteur de bioconcentration (BCF)	123

4.1.2 Lévonorgestrel (LNG)

Le lévonorgestrel (LNG) est un progestatif synthétique utilisé comme moyen de contraception et considéré comme un agoniste de la progestérone (Ríos-Sossa *et al.*, 2022). Ce stéroïde possède une formule chimique très proche de la progestérone, dont il diffère essentiellement par la nature des groupements chimiques branchés sur le noyau stérol : ce sont des analogues structuraux, sa fixation sur le récepteur permet de l'activer ; ce qui lui permet de « mimer » ainsi les effets de la progestérone (Figure 16, Tableau 04).

Cette substance est connue pour interagir non seulement avec les récepteurs de la progestérone, mais aussi avec un autre récepteur d'œstrogène, ce qui peut déclencher des voies complexes dans les organismes non ciblés (Africander *et al.*, 2011).

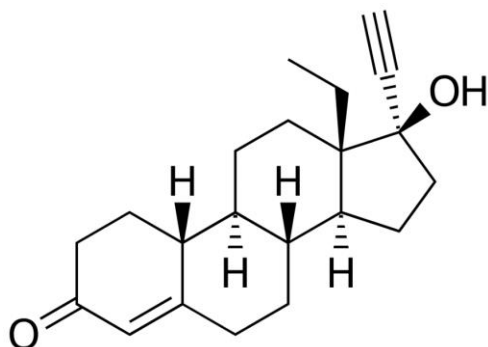


Figure 16 : Structure chimique du lévonorgestrel (LNG)

Tableau 04 : Propriétés physicochimique du lévonorgestrel (LNG).

Nom commun	Lévonorgestrel
Masse moléculaire	312.45 g/mol
Formule moléculaire	C ₂₁ -H ₂₈ -O ₂
Solubilité dans l'eau	2.05 mg/l
Solubilité dans les solvants organiques	Ethanol (1/120), chloroforme (1/15), éther diéthylique (1/400) et le dioxane

Koc	5353 l/kg
log Kow	3.48
Pression de vapeur/Constante de la loi de Henry	3.92 x 10 ⁻¹⁰ mmHg à 25°C / 7.7 x 10 ⁻¹⁰ atm-cu m/mol
Facteur de bioconcentration (BCF)	92

4.2 Concentrations et voies de contamination environnementale

Outre les nombreuses hormones stéroïdiennes naturelles présentes dans l'environnement aquatique, de nombreuses hormones stéroïdiennes synthétiques sont également présentes (Ojogoro *et al.*, 2021), notamment les œstrogènes et les progestatifs synthétiques, qui sont largement utilisés, et il est très probable que de nombreuses hormones stéroïdiennes synthétiques soient présentes dans les effluents d'eaux usées, et donc dans toutes les rivières recevant des effluents (Shen *et al.*, 2018).

4.2.1 Cas de l'œstrogène EE2

La présence d'hormones œstrogéniques synthétiques tel que l'EE2 à des concentrations minimales dans l'environnement a été examinée par de nombreux scientifiques et constitue un problème de contamination émergent. Les informations concernant la PNEC de l'EE2 pour la faune aquatique sont rares, cependant, certains auteurs ont indiqué des valeurs entre 0,1 et 0,5 ng/L (Caldwell *et al.*, 2012 ; Laurenson *et al.*, 2014). Néanmoins, la forte stabilité chimique, associée à une longue demi-vie, une faible PNEC et sa tendance à s'accumuler et à se concentrer dans les biotes, en raison de son caractère lipophile relativement élevée (Log Kow 3,67), font de la présence de cette hormone dans l'environnement aquatique une grande préoccupation (Aris *et al.*, 2014 ; Adeel *et al.*, 2017 ; Almeida *et al.*, 2020).

À l'échelle mondiale, l'eau est polluée par les substances d'EE2, dont beaucoup sont rejetés par les stations d'épuration des eaux usées et les effluents des élevages de bétail, que ce soit sous sa formule chimique mère ou conjuguée (Mazotto *et al.*, 2008) (Voir Figure 17).

4.2.1.1 Pollution industrielle et agricoles

- L'industrie laitière a depuis longtemps utilisé divers stéroïdes de régulation de la croissance pour améliorer les taux de croissance des bovins, l'efficacité alimentaire et pour obtenir une masse musculaire maigre (Adeel *et al.*, 2017) (Figure 17).

- Une autre source d'EE2 dans l'eau et d'autres environnements provient des eaux usées des animaux d'élevage, car l'EE2 est utilisé pour améliorer la productivité et traiter certaines maladies chez le bétail (Gadd *et al.*, 2010).
- Les élevages de type intensif ont des implications de risque pour l'environnement, impliquant à la fois des stéroïdes naturels et synthétiques, ont un effet boule de neige car les fumiers animaux se sont infiltrés dans l'environnement aquatique (Adeel *et al.*, 2017).
- Les fumiers d'animaux constituent la plus grande source d'hormones œstrogéniques dans l'environnement naturel (Almeida *et al.*, 2020). Des traces d'EE2 utilisés dans les installations d'élevages de type intensif ont été détectés dans les excréments, les lisiers liquides et les déchets solides collectés auprès des bovins, dans les effluents des lagunes et dans les engrais appliqués directement sur les terres agricoles. Certainement, les fumiers de volaille, de vache et de cheval peuvent contenir la plus grande quantité d'œstrogènes stéroïdiens. Selon (Adeel *et al.*, 2017), Les pratiques d'élevage pourraient entraîner des valeurs de rejet de ce médicament proche de 800 tonnes/an, et environ 49 tonnes d'œstrogènes ont été excrétées seulement par les animaux de ferme aux États-Unis en 2002.
- La contamination de l'environnement par l'EE2 peut également se produire par ruissellement des lisiers et des boues d'épuration qui ont été utilisés dans les champs agricoles (Chen *et al.*, 2010 ; Dutta *et al.*, 2012 ; Aris *et al.*, 2014).
- Les œstrogènes utilisés en aquaculture comme additifs alimentaires sont directement rejetés dans la rivière et il est estimé qu'environ 70% des œstrogènes administrés finissent dans l'environnement environnant la ferme, en raison d'une suralimentation et d'une perte d'appétit chez les poissons malades (Ojogoro *et al.*, 2011 ; Bevacqua *et al.*, 2011 ; Aris *et al.*, 2014).

4.2.1.2 Pollution humaine et pharmaceutique

- L'urine humaine est considérée comme la principale source d'EE2 (Vethaak *et al.*, 2005 ; Pauwels *et al.*, 2008).
- L'EE2 est utilisé dans les contraceptifs oraux combinés (Adeel *et al.*, 2017). Il est également inclus dans d'autres médicaments sur ordonnance tels que les thérapies hormonales substitutives, les traitements palliatifs du cancer du sein chez les femmes ménopausées, le cancer de la prostate, et les lotions utilisées pour prévenir la perte de cheveux dépendante

des androgènes chez les femmes (Aris *et al.*, 2014). La contribution de l'EE2 à l'environnement aquatique est estimée à 700 kg/an par rapport à son utilisation dans les contraceptifs oraux (Aris *et al.*, 2014).

- Selon un rapport de l'OPECST (Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques) en 2011, les femmes en âge de reproduction excrètent au moins 50 µg/jour d'hormones œstrogènes dans leurs urines. Ce taux peut excéder 5 mg/j pour une femme enceinte.
- Les hôpitaux ont été identifiés comme une autre source majeure de pollution par les œstrogènes stéroïdiens. En effet, quelques investigations ont révélé que des œstrogènes stéroïdiens, en particulier des niveaux élevés d'estriol, ont été trouvés dans tous les échantillons d'effluents hospitaliers (Avberšek *et al.*, 2011).

4.2.1.3 Station d'épuration (STEPs)

- Les STEPs contribuent à l'EE2 dans l'environnement aquatique, avec des efficacités de suppression variables (Belhaj *et al.*, 2015 ; Zhou *et al.*, 2012). Cela est dû au fait que les STEPs peuvent ne pas éliminer complètement les estrogènes dans les effluents, et donc les boues résiduelles et les effluents d'eaux usées contenant des concentrations significatives d'estrogènes tel que l'EE2 peuvent être directement rejetés dans l'environnement naturel (Pal *et al.*, 2010 ; Andaluri *et al.*, 2012 ; Pessoa *et al.*, 2014 ; Adeel *et al.*, 2017).
- Les décharges municipales sont également des sources de contaminants organiques et peuvent contenir des lixiviats avec des quantités significatives de matière organique dissoute constituée en partie d'hormones stéroïdiennes et d'autres contaminants, qui sont capables de s'infiltrer dans les eaux souterraines (Li, 2014).

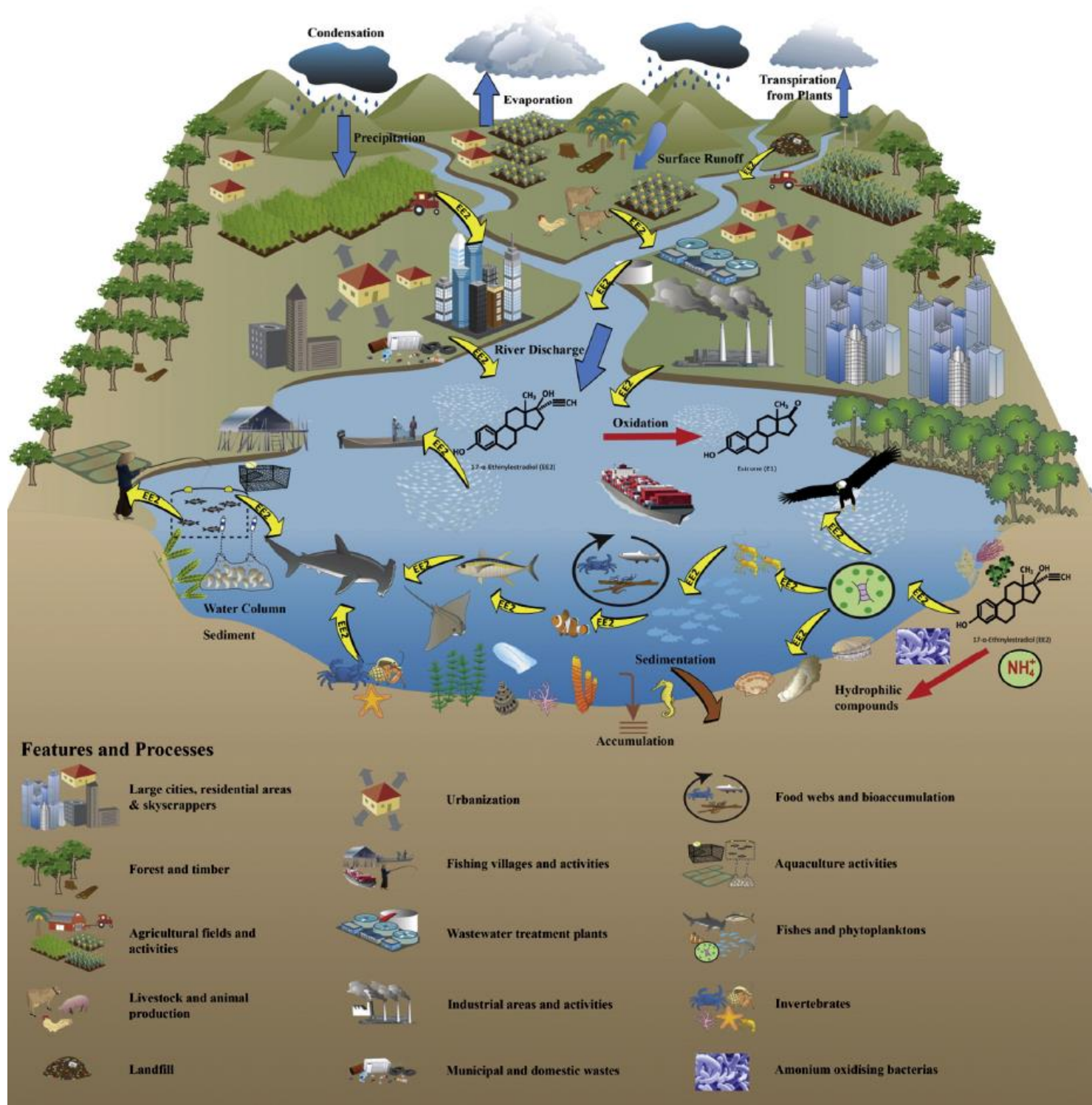


Figure 17 : Source, devenir et transport de l'EE2 dans l'environnement aquatique. Image prise de (Aris *et al.*, 2014)

4.2.2 Cas du progestatif LNG

De nombreuses études ont signalé la présence massive de progestatifs synthétiques dans l'environnement aquatique (Oropesa *et al.*, 2020). Parmi eux, une importance particulière a été accordée au LNG, qui est couramment utilisé dans la médecine humaine et vétérinaire dans le monde entier (Narváez *et al.*, 2019). En raison d'une élimination incomplète par les méthodes conventionnelles appliquées dans les STEPs, de faibles concentrations de ces composés hautement bioactifs sont continuellement rejetées dans l'environnement aquatique, notamment les systèmes d'eau douce dans le monde entier (Yarahmadi *et al.*, 2018 ; Yu *et al.*, 2019) (Figure 18).

Les concentrations mesurées sont généralement de l'ordre du ng/L, signalées particulièrement dans les eaux usées, de surface et souterraines ont été respectivement de 79, 38 et 11 ng/l, et de 19 ng/l dans les sédiments aquatiques, ainsi que dans les effluents des STEPs (18 ng/l) (Contardo-jara *et al.*, 2011 ; Al-Odaini *et al.*, 2013 ; Oropesa et Guimaraes, 2021).

Cette molécule, bien que stable et persistante (Narváez *et al.*, 2019), peut provenir de plusieurs sources industrielles pharmaceutiques :

- Le LNG est l'un des progestatifs synthétiques couramment utilisés dans les pilules contraceptives, les pilules contraceptives d'urgence et les implants contraceptifs (Besse et Garric, 2009).
- De nombreux produits pharmaceutiques et produits de soins personnels, y compris le LNG, sont éliminés dans les décharges (industrielles et domestiques), ce qui pourrait être une source de pollution de l'eau par lixiviation (Ríos-Sossa *et al.*, 2022).
- Les pratiques d'élevage de bétail (généralement comme facteurs de croissance) (Kuster *et al.*, 2004).
- Les humains et le bétail excrètent une quantité considérable de progestérones (Aris *et al.*, 2014). Ces hormones pénètrent dans les systèmes d'eau de surface et souterraine par le biais des STEPs des eaux usées, des systèmes septiques et par le ruissellement agricole lorsque les eaux usées et le fumier sont utilisés comme engrais (Mazotto *et al.*, 2008).

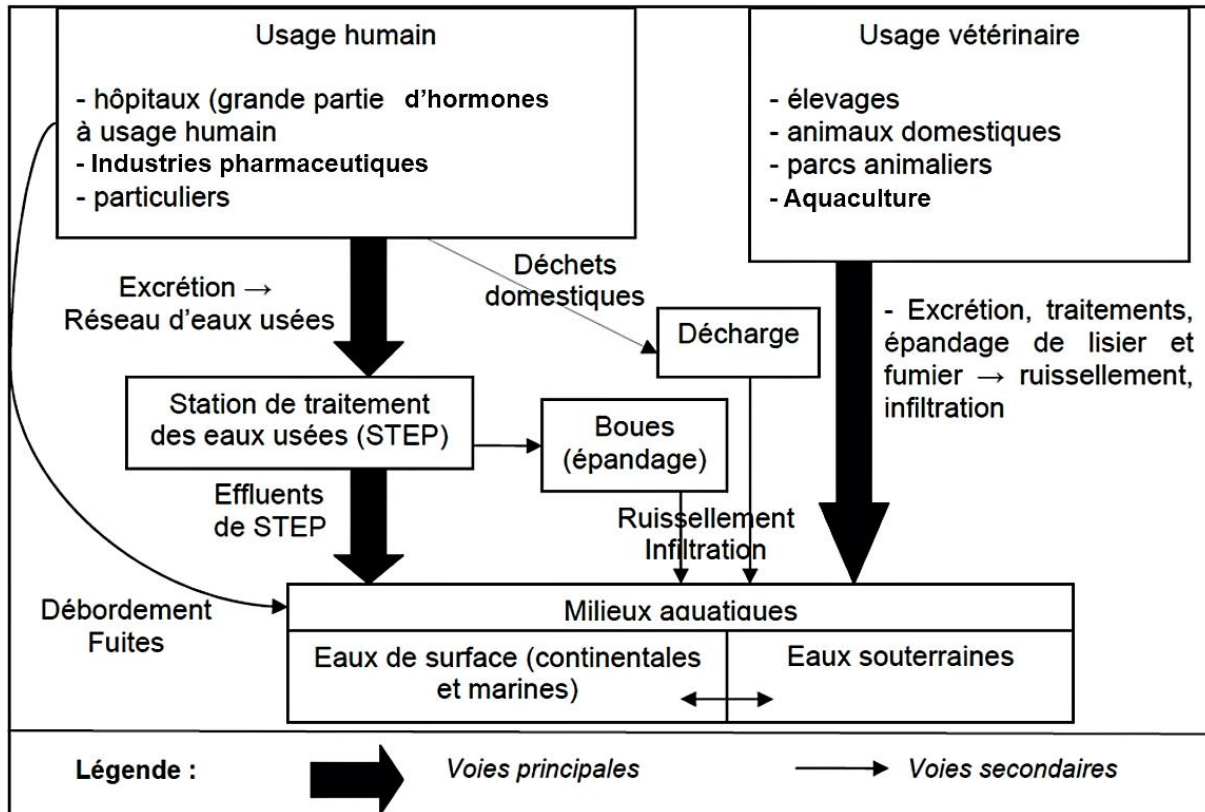


Figure 18 : Sources et voies de contamination des systèmes aquatiques par les hormones synthétiques (schéma personnel)

4.3 Effets et mode d'action

4.3.1 Cas de l'œstrogène EE2

L'EE2 est excrété sous forme de conjugués de sulfates et de glucuronides, tout comme les hormones stéroïdes naturelles œstrogènes (E1), 17 β -œstradiol (E2) et œstriol (E3) qui existent naturellement chez l'homme. L'EE2 synthétique partage un mode d'action hormonal commun avec ces œstrogènes naturels, ce qui signifie également que, lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement, les effets perturbateurs endocriniens œstrogéniques de l'EE2 et des œstrogènes stéroïdiens naturels en combinaison sont considérés comme additifs. L'EE2, l'œstrogène synthétique, est cependant de loin le plus puissant des quatre (Jobling et Owen., 2011).

4.3.1.1 *Chez les crustacés aquatiques*

Plusieurs études ont prouvé la présence d'EE2 dans les effluents et les eaux naturelles, et ont établi qu'il est très probable qu'il contribue de manière significative aux effets dommageables observés chez les espèces aquatiques sauvages, notamment sur les invertébrés (Caldwell *et al.*, 2009).

Dans ce sens, des affirmations selon lesquelles les invertébrés réagissent aux œstrogènes continuent d'être publiées (Jones *et al.*, 2017). De nombreuses enzymes clés nécessaires à la biosynthèse des hormones stéroïdes des vertébrés, telles que l'enzyme aromatasase, ne semblent pas être présentes chez les crustacés, leur absence remet donc en question les résultats de nombreuses études affirmant que les concentrations d'hormones stéroïdes endogènes sont associées aux cycles de reproduction (Scott, 2018).

Cependant, en raison des similitudes structurales avec l'ecdysone (une hormone stéroïdienne intervenant dans le processus de la mue des daphnies et dans le contrôle de leur reproduction (Kato *et al.*, 2007)); il a été suggéré que les stéroïdes vertébrés pourraient éventuellement interférer avec le système endocrinien des invertébrés, tels que les crustacés, en compétition avec l'ecdysone au niveau du récepteur des écdystéroïdes (EcR), en influençant sa sécrétion et sa libération, ou en limitant sa transformation en 20-hydroxyecdysone (20HE) (Maes, 2011). Bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore bien compris, certaines relations potentielles ont déjà été envisagées entre les hormones vertébrées et l'inhibition de la mue, l'immobilisation des juvéniles, le retard de croissance et les anomalies de reproduction chez *D. magna* (Maes 2011 ; Rodrigues *et al.*, 2021 ; Belhamzaoui *et al.*, 2023) Par ailleurs, Svirghu *et al.* (2020) suggèrent que le possible site d'action pourrait, par exemple, se produire via les récepteurs mPR γ (Membrane progesterone receptor gamma) identifiés chez les daphnies, ou des réponses non médiées par les hormones/interactions non spécifiques (par exemple, avec des récepteurs multifonctionnels anciens ou des récepteurs pour d'autres composés).

4.3.1.2 *Chez les mammifères*

Chez les mammifères, les hormones stéroïdiennes agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques qui agissent comme des facteurs de transcription, se liant à des gènes contenant les éléments de réponse appropriés (Su *et al.*, 2019). Ainsi, par exemple, les œstrogènes se lient au

récepteur des œstrogènes (RE) qui est ensuite transloqué vers le noyau, où il se lie aux éléments de réponse aux œstrogènes (Estrogen Element Response) (ERE) et régule la transcription des gènes. Il existe des récepteurs spécifiques pour les œstrogènes naturels (RE), les progestérones (PR), les androgènes (AR), les glucocorticoïdes (GR) et les minéralocorticoïdes (MR). Ces récepteurs se trouvent dans tous les vertébrés (Baker, 2011, 2019), et donc les hormones stéroïdes naturelles et synthétiques présentes dans l'environnement aquatique agissent presque certainement via ces récepteurs (Ojogoro *et al.*, 2021).

Les œstrogènes sont nécessaires au développement normal des spermatozoïdes. Cependant, il a été démontré que les œstrogènes exercent des effets contraceptifs chez les mâles (Liu *et al.*, 2012). Les récepteurs des œstrogènes et l'aromatase du cytochrome P450 sont exprimés dans les cellules de Sertoli, de Leydig et germinales des testicules. Physiologiquement, l'estradiol synthétisé localement dans les testicules peut participer au processus de spermatogenèse (Van Pelt *et al.*, 1999). Toutefois, un excès d'œstrogènes produit ou exogène peut nuire au processus de spermatogenèse, et interrompre donc la fertilité masculine en supprimant la synthèse des gonadotrophines (GnRH), en perturbant l'axe neuroendocrinien, en désorganisant l'architecture cellulaire des tubules séminifères et en induisant une azoospermie (D'Souza *et al.*, 2005).

4.3.2 Cas du progestatif LNG

4.3.2.1 Chez les invertébrés aquatiques

En ce qui concerne la progestérone, des séquences homologues des récepteurs membranaires gamma de la progestérone (mPR γ) et du composant 1 du récepteur membranaire de la progestérone (PGMRC1) sont présentes chez les crustacés (Ren *et al.*, 2019). Bien que la capacité de liaison à la progestérone de ces molécules n'ait pas été étudiée, elles peuvent être une cible potentielle dans la voie des changements induits par les progestatifs et ainsi les effets pourraient être médiés par une voie non génomique (Svigruha *et al.*, 2021). Cela inclurait l'activation de seconds messagers et de diverses cascades de protéines kinases qui peuvent éventuellement conduire à des changements indirects dans l'expression génique en raison de la phosphorylation de facteurs de transcription (Svigruha *et al.*, 2021). Un mode d'action similaire a été proposé dans le cas des altérations induites par les œstrogènes chez les mollusques (Tran *et al.*, 2019).

4.3.2.2 *Chez les mammifères*

De manière générale, le LNG est connu pour son mécanisme d'action chez les femelles en se liant aux récepteurs de la progestérone et des androgènes, ce qui peut retarder la libération de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) par l'hypothalamus (HYP) (Su *et al.*, 2019). Cette action atténue la poussée d'hormone LH qui se produit pendant la phase de pré-ovulation (Vrettakos et Bajaj, 2023). En fin de compte, il peut retarder ou bloquer l'ovulation en empêchant la fécondation en inhibant la rupture folliculaire et en libérant un ovule viable des ovaires afin de prévenir la grossesse (Kahlenborn *et al.*, 2015). Le LNG induit également un épaissement de la glaire cervicale, ce qui contribue à entraver la mobilité et le passage des spermatozoïdes vers la trompe de Fallope (Lewis *et al.*, 2010).

Concernant le système de reproduction masculin, le LNG est considéré comme inhibant la fonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG) via une boucle de rétroaction (Kamischke *et al.*, 2000), et donc l'inhibition de la production de la testostérone, ainsi que pour atténuer l'activité intra testiculaire de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase et l'expression du récepteur LH (Anderson and Baird, 2002 ; Liu *et al.*, 2012).

5 Stress oxydatif : définitions, sources et impacts ?

L'oxygène a été découvert par le scientifique suédois Carl Wilhelm Scheele et rapporté dans sa thèse *Luft und dem Feuer* (Air et Feu) en 1777. Plus tard, il a été réalisé que chez les animaux supérieurs, la respiration fournit aux cellules de l'oxygène et sert à éliminer le dioxyde de carbone formé par le métabolisme cellulaire. La réaction bien connue entre l'oxygène et le carburant (par exemple, le carbone dans le bois) nécessite des températures élevées. Cependant, il a été découvert que des protéines spéciales dans les cellules - les enzymes - sont capables de catalyser cette combustion à la température corporelle. Le truc, c'est que les enzymes peuvent lier à la fois l'oxygène et le substrat et les rapprocher suffisamment pour que la réaction chimique puisse se produire et que l'énergie libérée puisse être stockée sous forme d'ATP pour une utilisation ultérieure dans la cellule (Haliwell et Poulsen, 2006).

L'oxygène est considéré comme quelque chose de bénéfique. Cependant, l'expérience de l'exposition à des concentrations élevées d'oxygène chez les plongeurs en haute mer et les bébés

prématurés a montré que des lésions organiques pourraient être le résultat d'une exposition à trop d'oxygène.

Au fur et à mesure que les chercheurs ont appris à mesurer mieux les dommages oxydatifs, ils ont réalisé qu'ils se produisaient *in vivo* même aux niveaux normaux d'O₂ atmosphérique. (Haliwell et Poulsen, 2006).

5.1 Définition

5.1.1 Stress oxydant

Appelé également stress oxydatif, est initialement défini par Sies (1985, 1986) comme un déséquilibre sérieux entre l'oxydation et les antioxydants, "une perturbation dans l'équilibre pro oxydant-antioxydant en faveur du premier, conduisant à des dommages potentiels". La définition semble simple ; cependant, elle repose sur des définitions concernant l'oxydation, les antioxydants et l'équilibre.

5.1.2 Oxydation

La définition de l'oxydation semble également simple : perte d'électrons par une espèce, gain d'oxygène ou perte d'hydrogène. Comme le suggère Buettner (1993), il existe une hiérarchie des oxydants. En biologie, les substances très élevées dans la hiérarchie (par exemple, le radical hydroxyle (OH \cdot) seront presque toujours un oxydant ; d'autres substances (par exemple, NO \cdot ou H₂O₂) peuvent agir comme des oxydants ou des réducteurs, selon qu'elles réagissent avec des substances de rang inférieur ou supérieur dans la hiérarchie.

5.1.3 Le déséquilibre

L'équilibre ou le déséquilibre est mal défini. En général, notre environnement est oxydatif, et cela est probablement vrai pour les surfaces externes du corps (Haliwell et Poulsen, 2006). Cependant, en ce qui concerne les conditions intracellulaires, elles sont généralement réductrices, mais avec quelques variations subcellulaires (par exemple, le réticulum endoplasmique est plus oxydé que les mitochondries). Même dans le cytosol, il pourrait y avoir des différences considérables entre les emplacements proches de la membrane cellulaire et proches de la membrane nucléaire. Il se pourrait qu'il y ait un équilibre entre les oxydants et les antioxydants, mais cela

semble plutôt improbable. La cellule doit moduler rapidement et transitoirement son état redox pour envoyer des signaux.

Comme il a été déjà défini par Sies (1985), le stress oxydatif est désigné comme "une perturbation dans l'équilibre pro oxydant-antioxydant en faveur du premier, conduisant à des dommages potentiels". Cet état peut être engendré par une défaillance au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, conduisant à l'activation de systèmes enzymatiques (NADPH oxydase, glucose oxydase et monoamine oxydase), de l'oxydation de certaines molécules, ou de la libération de fer libre depuis la ferritine ou la transferrine, dites protéines chélatrices (Michelson, 1982), induisant la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Figure 19).

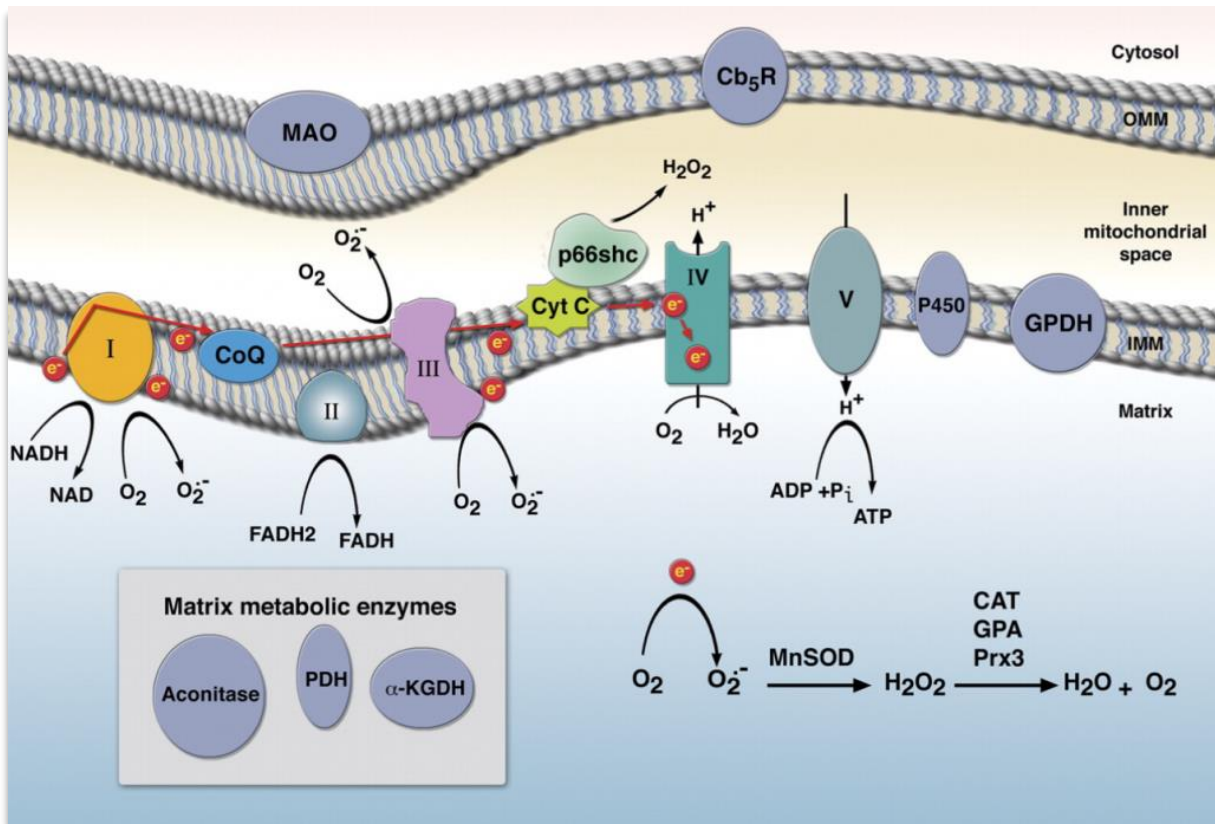


Figure 19 : Processus de génération de radicaux libre (ROS) au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (prise du site : <https://www.idrogen.fr>)

5.1.4 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Pour une meilleure compréhension de la notion de ces espèces, il est crucial de déterminer tout d'abord qu'est-ce qu'un radical libre ?

D'après Haliwell (2006), le concept de radical libre désigne toute entité chimique capable d'exister de manière autonome et caractérisée par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés, qui se réfère à un électron occupant une orbitale atomique ou moléculaire de manière isolée, sans être associé à un autre électron. Ils sont donc électrophiles, et tentent d'agresser toutes molécules capables de céder un électron, ce qui désigne leur durée de vie très courte. Ces molécules agressées deviennent par la suite des espèces radicalaires, débutant ainsi un processus de réactions en chaîne (Lehucher-Michel *et al.*, 2001) (Figure 20).

5.1.4.1 Sources de production des ROS

Les ROS ou ERO sont des composés dérivés de l'oxygène où certains électrons sont excités, les rendant très réactifs, et constituent la classe prédominante d'espèces réactives produites dans les organismes vivants et sont la principale cause du stress oxydatif dans ceux-ci (Valko *et al.*, 2007). La formation accrue des ROS est prévisible car elle se produit comme un effet secondaire de tout type de processus cellulaire, mais elle augmente dans des conditions de stress dues après exposition aux xénobiotiques.

Plusieurs espèces radicalaires issues de l'oxygène par des réactions monoelectroniques, comme l'anion Superoxyde (O_2^-), l'hydroxyle (OH^\cdot), les alkoxydes (RO^\cdot) et les peroxydes (ROO^\cdot), et d'autres non radicalaires de l'oxygène mais peuvent être précurseurs de radicaux libre, telles que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'Ozone (O_3) (Noguchi, 2002 ; Garrel *et al.*, 2007). Ils sont également produits par diverses voies enzymatiques dont les plus importants sont les NAD(P)H-oxydase et les NOSynthase.

Il est maintenant bien établi que la chimie des ROS se produit en biologie, et il devient également de plus en plus clair que ces entités fonctionnent non seulement dans la respiration cellulaire, en tant qu'espèces destructives, mais aussi en tant que messager dans les systèmes de signalisation à l'intérieur des cellules, et participent également à l'homéostasie vasculaire (Harman, 2002 ; Haliwell et Gutteridge, 2006).

5.1.4.2 Impacts des ROS sur les structures moléculaires

L'interaction des ROS est capable d'engendrer plusieurs dommages aux niveaux des constituants cellulaires et moléculaires, induisant des modifications irréversibles pour les cellules (Moumeni, 2016). Parmi les cibles fréquentes des ROS, les **protéines** qui subissent une

dénaturation par oxydation, généralement à travers des attaques sur les acides aminés soufrés et ceux ayant des chaînes aromatiques latérales (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

L'atteinte des acides nucléiques provoque des lésions et des modifications de leurs bases puriques et pyrimidiques, ainsi que la rupture des brins d'ADN, particulièrement par les radicaux hydroxyles (OH \cdot). L'activation des systèmes de protection de l'ADN peut aussi entraîner des dégâts lorsqu'ils sont atteints par l'oxydation radicalaire, engendrant des mutations génique, provoquant de multiples pathologies : cancer, Alzheimer, athérosclérose, maladies cardiovasculaires, Parkinson, etc. (Moumeni, 2016).

Lorsque le niveau de ROS dépasse un certain seuil au niveau des membranes cellulaires, ceci peut initier une **peroxydation lipidique**, considérée comme le processus le plus nuisible chez tous les organismes vivants (Benhamdi, 2014), générant non seulement le dysfonctionnement cellulaire normal, mais aggrave aussi le stress oxydatif à travers la surproduction des ROS dérivés de lipides (Yadav *et al.*, 2010).

5.1.5 Antioxydants

D'après Halliwell et Gutteridge (2006) : un antioxydant est toute substance qui, lorsqu'elle est présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche significativement l'oxydation de ce substrat (Figure 20).

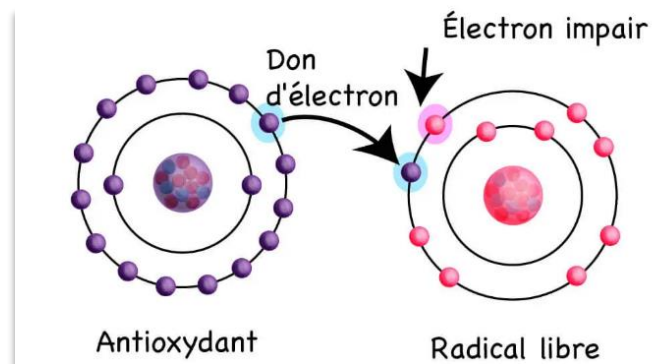


Figure 20 : Schéma simplifié expliquant l'action des antioxydants sur les ROS

(www.dreamstime.com)

Parmi ces antioxydants, on distingue deux principaux types chez les organismes vivants en général : des antioxydants **enzymatiques** et **non enzymatiques** (Konan, 2019) :

- **Les systèmes enzymatiques** principaux comprennent les superoxydes dismutases (SODs), la catalase et multiples formes de glutathion peroxydase (GPx), ainsi que le couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase... capables de piéger les ROS et d'autres espèces radicalaires (Konan, 2019, Garrel *et al.*, 2007). Il a été démontré que les enzymes essentiellement impliquées dans la prévention du stress oxydatif servent de biomarqueurs dans la surveillance de l'environnement (Livingstone, 2001 ; van der Oost *et al.*, 2003).
- D'autres antioxydants **non enzymatiques** incluant : le glutathion (GSH réduit), l'acide ascorbique, l' α -tocophérol (vitamine E), caroténoïdes, vitamine C, acide urique. Ainsi, certains oligo-éléments tels que la manganèse, le zinc, le cuivre et le sélénium, indispensables pour l'activité de certaines enzymes antioxydantes (MnSOD, Cu,Zn-SOD et SeGPx).

Chez les mammifères mâles, exactement dans le liquide séminal, les antioxydants jouent un rôle crucial dans la protection des spermatozoïdes en agissant en tant que piègeurs de ROS (Konan, 2019).

**CHAPITRE 02 : ETUDE *IN VITRO* : TOXICITE POTENTIELLE
DES RESIDUS D'HORMONES CONTRACEPTIVES FEMININES
EE2 ET/OU LNG SUR *DAPHNIA MAGNA***

I. Introduction

La quantité de produits chimiques émergents actuellement présents dans l'environnement, seuls ou en mélange, est encore en cours de détermination (Wang *et al.*, 2020). Parmi ces polluants émergents, les hormones stéroïdiennes synthétiques humaines et/ou vétérinaires largement utilisées, sont rejetées dans les écosystèmes aquatiques sous différentes formes chimiques (Weizel *et al.*, 2018). Ces molécules sont toutes biologiquement actives et, par conséquent, pourraient potentiellement avoir un impact sur des espèces non ciblées lorsqu'elles y sont exposées. (Runnalls *et al.*, 2010). L'éthinylestradiol (EE2) et le lévonorgestrel (LNG) sont les plus couramment utilisés dans les contraceptifs oraux. Ce sont des versions synthétiques d'hormones naturelles présentes dans le corps féminin (Gunnarsson *et al.*, 2019) en raison de leur capacité à imiter les hormones naturelles et endogènes à des concentrations minimales (Dzieweczynski et Hebert, 2013) en interférant avec les processus homéostatiques hormonaux nécessaires à la croissance et au développement de différents tissus (Sharma et Chadha, 2021).

L'EE2 et le LNG sont couramment trouvés dans les surfaces aquatiques à des concentrations nanométriques et sont excrétés en particulier par les femmes enceintes (Laurenson *et al.*, 2014). Ces deux composés sont bien plus persistants et redoutables que les hormones naturelles dans l'environnement (Adeel *et al.*, 2017), et peuvent se bioaccumuler et se bioamplifier dans les organismes aquatiques en raison de leur caractère hydrophobe élevé, de leur lipophilie et de leur résistance à la dégradation (Olivera et Luengo, 2019). La concentration d'EE2 dans l'eau douce et les rivières peut varier de 1 à 22 ng/L avec une demi-vie prédite entre 2 et 81 jours dans des conditions aérobies, qui n'est pas dégradée mais diminue de 1 à 0,62 µg/g très lentement sous les conditions naturelles (Adeel *et al.*, 2017). Cependant, le LNG est détecté dans les stations d'épuration municipales, les eaux de surface et les eaux souterraines à des concentrations allant de 11 à 79 ng/L (Steinbach *et al.*, 2023), elles sont résistantes à la dégradation même sous rayonnement d'énergie naturelle, qui ne réduit que 80 % de cette substance (Narváez *et al.*, 2019).

Ces composés synthétiques agissent comme des hormones naturelles ; ainsi, ils n'ont pas d'effet dose-réponse sur les invertébrés (Vandenberg *et al.*, 2012). À cet égard, Luna *et al.* (2015) ont montré que l'exposition à de faibles concentrations d'EE2 réduisait le nombre de néonates produites par femelle chez *D. magna* à des faibles concentrations (0,1 - 1 µg/L). De manière similaire, le LNG peut sérieusement affecter le développement embryonnaire et les fonctions

reproductrices à de faibles concentrations (Hua *et al.*, 2015). Cependant, des concentrations élevées de stéroïdes peuvent altérer le comportement, féminiser complètement les poissons mâles et réduire la reproduction (Aris *et al.*, 2014 ; Furuhaugen *et al.*, 2014 ; Rodrigues *et al.*, 2021).

De nombreuses recherches se sont concentrées sur l'effet d'un seul polluant ; cependant, les mélanges de stéroïdes et les mécanismes associés sont des préoccupations éco-toxicologiques cruciales (Aris *et al.*, 2014). Certains polluants sont présents indépendamment à des concentrations trop faibles pour nuire à l'écosystème, tandis que d'autres le font lorsqu'ils sont combinés avec d'autres substances (Carvalho *et al.*, 2014). Par conséquent, leur prévalence dans les aliments et l'eau potable représente un risque sérieux pour la santé humaine et animale (Adeel *et al.*, 2017 ; Sharma et Chadha, 2021). Ces perturbateurs endocriniens présents dans l'environnement suscitent des inquiétudes, car ils peuvent influencer les populations de la faune vertébrée et invertébrée (Scott *et al.*, 2018), en induisant des altérations des niveaux d'hormones endogènes notamment chez *D. magna* (Svigruha *et al.*, 2021), une réduction de la fertilité et de la fécondité (Segner *et al.*, 2003), une super-masculinisation des femelles, ainsi qu'une féminisation des mâles (Caldwell *et al.*, 2008, 2012 ; Runnalls *et al.*, 2015).

Dans le but d'approfondir notre compréhension de l'impact de ces hormones synthétiques sur ces organismes aquatiques, nous les avons exposés à l'éthinylestradiol (EE2), au lévonorgestrel (LNG) et à leurs mixtures, à des concentrations considérées comme pertinentes sur le plan environnemental. Nous avons également maintenu un ratio de 1 : 5 (EE2 : LNG) pour refléter la proportion présente dans les pilules contraceptives combinées. L'objectif étant d'analyser les éventuelles fluctuations et perturbations métaboliques, en mettant particulièrement l'accent sur différents aspects physiologiques, comportementaux, biochimiques, embryologiques et anatomiques. Ainsi, l'exposition aux stéroïdes sexuels induit des modifications des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques chez diverses espèces aquatiques non ciblées (Belhaj *et al.*, 2018 ; Rodrigues *et al.*, 2021), qui à leurs tours, montrent un fort indice de dommages oxydatifs chez *D. magna* lorsqu'ils se dégradent (Yisa *et al.*, 2023). Pour cette raison, les biomarqueurs du stress oxydatif (catalase, GSH, GST et MDA) ont été quantifiés, pour leurs caractère bioindicateurs afin d'évaluer l'état de santé des organismes aquatiques (Maharajan *et al.*, 2018 ; Rodrigues *et al.*, 2021 ; Yisa *et al.*, 2023). Par conséquent, nous avons utilisé *D. magna*, une puce d'eau zooplanctonique, qui est couramment utilisés en tant que modèle bioindicateur

considérée en étant un organisme crucial dans les études écotoxicologiques et environnementales (Svigruha *et al.*, 2021) en raison de sa grande sensibilité à divers facteurs, notamment aux interactions entre les facteurs de stress et les polluants, en particulier les hormones stéroïdiennes (Luna *et al.*, 2015), qui peuvent avoir un impact sur leurs schémas de survie dans les environnements aquatiques et nécessitent des recherches supplémentaires (Yisa *et al.*, 2023).

II. Matériel et méthodes

L'étude expérimentale a été effectuée au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC), à l'Université de Badji Mokhtar - Annaba.

1 Matériel chimique

Les hormones synthétiques utilisées sont des principes actifs dérivées de trois contraceptifs oraux de 2^{ème} génération à dose minime : **a)** Un médicament contenant 50 µg de l'estrogène éthinylestradiol (EE2) seul (laboratoire Effik) ; **b)** Une pilule microprogestative qui contient 30 µg le progestatif lévonorgestrel (LNG) seulement (laboratoire Pfizer) ; **c)** Pilule œstroprogestative renfermant 30/150 µg de la combinaison EE2/LNG (laboratoire Pfizer) (Tableau 05).

Tableau 05 : Caractérisations physicochimiques des de l'éthinylestradiol et du lévonorgestrel.

Hormone	Formule moléculaire	Poids moléculaire	Point de fusion	Solubilité
Ethinylestradiol (EE2)	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.4	183 °C	11,3 mg/L (À 27 °C) 0.1 % acétone
Lévonorgestrel (LNG)	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312.45	206 °C	0.1 % éthanol

Des solutions mères de chaque hormone sont préparées par dissolution dans un milieu ISO (ISO/DIS 6341.2) (ISO, 1996). Ainsi, l'EE2 synthétique (C₂₀H₂₄O₂) est dissous selon la méthode de Clubbs et Brooks, (2007) dans de l'acétone à 0,1%, et le LNG (C₂₁H₂₈O₂) dans 0,1% d'éthanol (Contardo-Jara *et al.*, 2011). Les concentrations testées sont obtenues par la dilution des solutions mères dans de l'eau distillée et sont stockées à 4 °C à l'abri de la lumière (Tableau 05).

2 Matériel biologique : *Daphnia magna*

2.1 Souche de daphnie utilisée

L'espèce *Daphnia magna* (Straus, 1820), un microcrustacé connu sous le nom de « puce d'eau », (Figure 21).

2.2 Classification taxonomique :

D. magna répond à la classification suivante :

Règne : Animalia

Phylum : Arthropoda

Classe : Branchiopoda

Sous classe : Phyllopoa

Ordre : Cladocera

Famille : Daphnidae

Genre : *Daphnia*

Espèce : *magna* (Straus, 1820)



Figure 21 : *Daphnia magna* (Image personnelle)

2.3 Source et zones de prélèvement

Le laboratoire LTC entretient actuellement cette souche des micro-crustacés *D. magna* qui ont été collectées dans des lacs où leurs eaux abritent de nombreux types de micro-crustacés ; situés dans le golfe d'Annaba, qui est un vaste golfe de la mer Méditerranée, dans la province d'El Tarf, à 430 km à l'est d'Alger (figure 22). Ils ont été rapidement transportés avec leur milieu naturel jusqu'au laboratoire dans des réservoirs aérés de 7 litres.

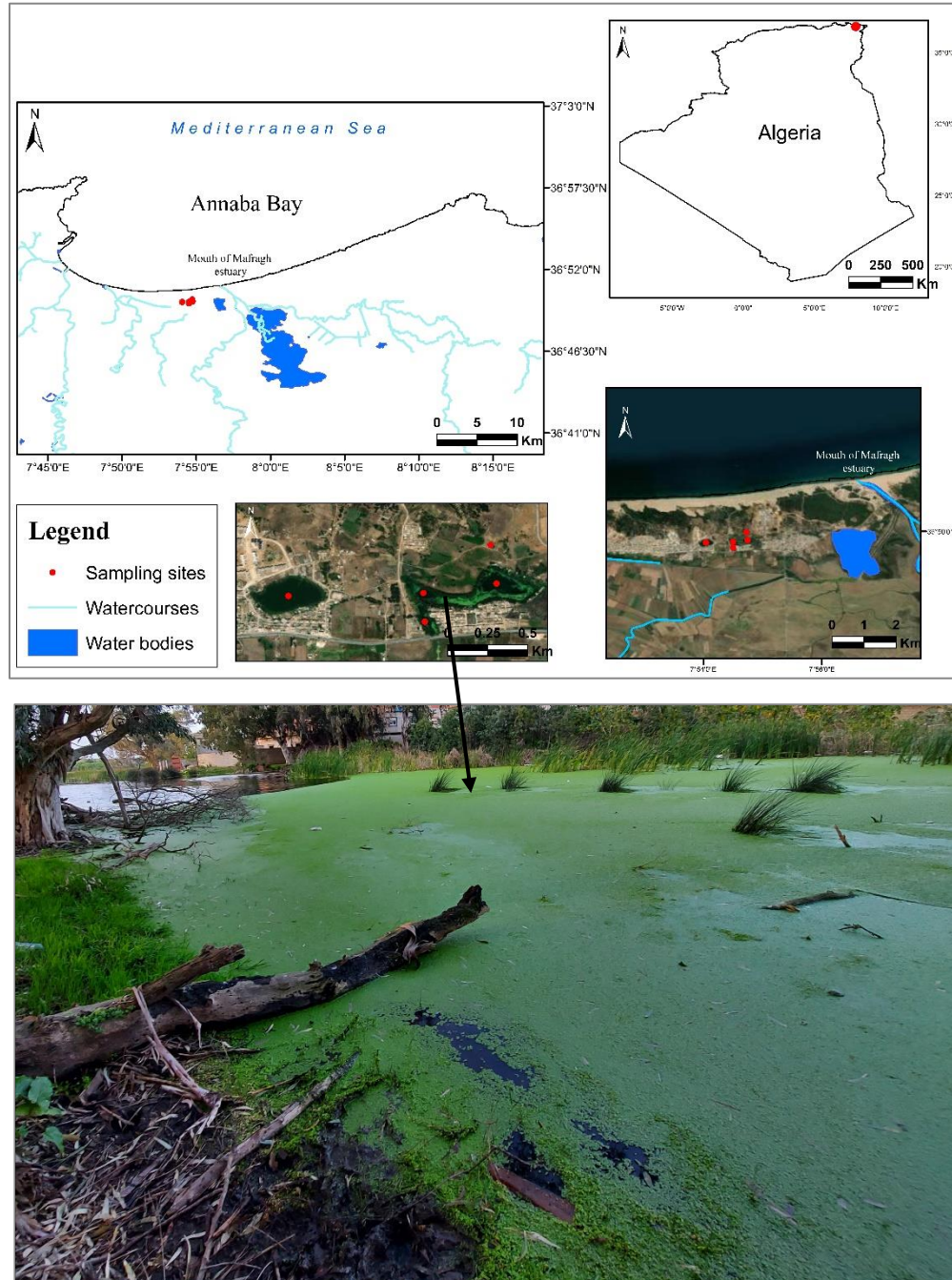


Figure 22 : Situation géographique des sites de prélèvement de *D. magna*

3 Méthodes

3.1 Conditions de culture des daphnies

D. magna est maintenue à partir d'une culture réalisée dans notre laboratoire sur de nombreuses générations et est incubée dans une chambre de croissance (Figure 03a), à une température constante de 20 ± 2 °C et un cycle de lumière (16 h lumière, 8 h obscurité) dans un aquarium contenant environ 15 L d'eau du robinet déchlorée (dureté totale de $169.8 \text{ mg/L} \pm 18$ de CaCO_3 utilisant un photomètre ; $\text{pH} = 7.8 \pm 0.2$), et une pompe à air pour assurer l'oxygénation (Figure 23a). Le milieu est renouvelé deux fois par semaine, et de la *Chlorella vulgaris* normale (5 mg/L) et du *Saccharomyces cerevisiae* (2.5 mg/L) se sont donnés à *D. magna* au cours de la première semaine de croissance.

Les juvéniles de *D. magna* âgés de moins de 24 heures sont extraits quotidiennement pour les tests de toxicité aiguë, ainsi que les adultes triés d'au moins la troisième couvée, sont mis séparément et temporairement avant les traitements dans un microclimat (SNIJDERS ECD01) assurant des conditions optimales pour leur survie (Figure 03c). Il est à noter que tous les clones ont été extraits de la même culture.

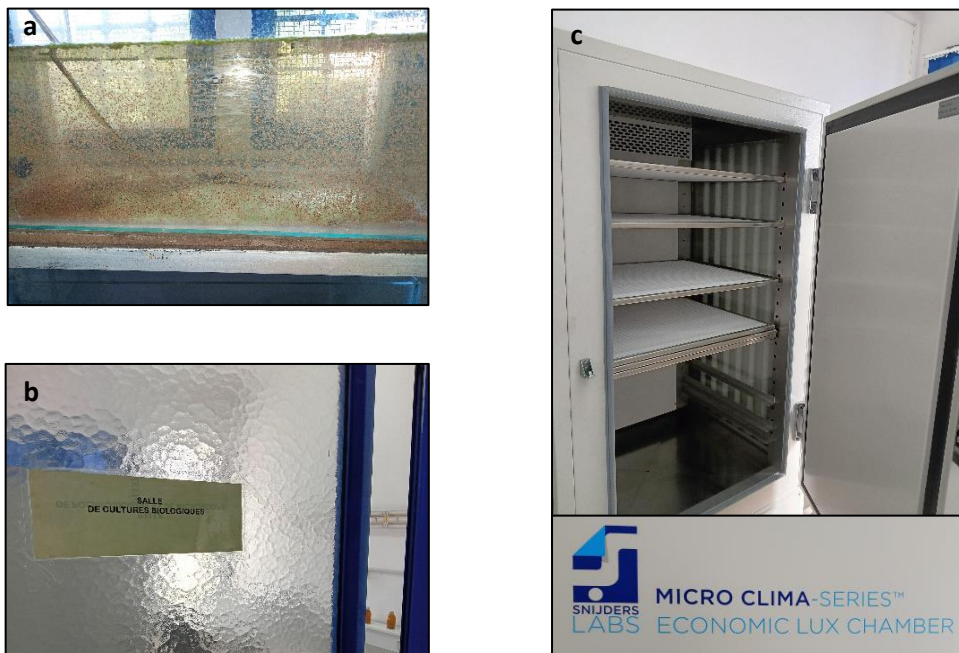


Figure 23 : Elevage de *D. magna* (a), Chambre de croissance (b) et microclimat (c)

3.2 Traitement des Daphnies

Quatre concentrations pour chaque hormone sont réservées et quatre groupes de traitement sont réalisés pour chaque test :

- **Groupe témoin** : un contrôle blanc est utilisé (milieu de culture ISO 6341.2).
- **Groupe EE2** : 0,1 ; 0,5 ; 5 ; et 25 $\mu\text{g/L}$;
- **Groupe LNG** : 0,5 ; 2,5 ; 25 ; et 125 $\mu\text{g/L}$;
- **Groupe EE2/LNG** : C1 = 0,1/0,5 ; C2 = 0,5/2,5 ; C3 = 5/25 ; et C4 = 25/125 $\mu\text{g/L}$.

Les concentrations choisies d'EE2 font référence à l'un des nombreux rapports (Rodrigues *et al.*, 2021 ; Zheng *et al.*, 2020), où la différence entre les concentrations de chaque hormone est basée sur les doses contenues dans la majorité des pilules contraceptives combinées avec un rapport de 1 : 5 (0,03 μg d'EE2 ; 0,15 μg de LNG).

3.3 Etude physiologique

3.3.1 Test de toxicité aigüe

Il s'agit d'un test à court terme qui détermine la **concentration inhibitrice médiane** (CI_{50}) qui provoque l'immobilité des jeunes daphnies (< 24 heures) au bout de 24h et 48h d'exposition selon les normes ISO 6341 (2012) ou le test OECD, 2004.

Pour ce faire, trois échantillons de 20 juvéniles de daphnies non nourris âgés de moins de 24 h sont introduits dans des tubes en verre de 30 ml contenant 10 ml de milieu ISO (ISO/DIS 6341.2) et les différentes concentrations voulues de chaque molécule seules ou en mixtures, et sont placés dans un endroit sombre. L'immobilité est le critère d'évaluation désigné. En particulier, les daphnies qui présentent une incapacité à nager sont considérées comme immobiles. En outre, les daphnies qui n'ont bougé que les antennes mais qui n'ont pas nagé dans les 15 secondes suivant une légère agitation sont également classées comme immobiles. La proportion fixe dans le contrôle doit être inférieure ou égale à 10 % pour que le test reste valide. Les juvéniles immobilisés sont comptés visuellement et confirmés au microscope optique (Leica ATC 2000 Microscope, Wetzlar, Allemagne) (grossissement 10x40) pour déterminer la concentration inhibitrice à 50 % (IC_{50}).

3.3.2 Calcul du taux d'immobilisation (24h/48h)

La réponse des jeunes daphnies au différentes gammes de concentrations de EE2, LNG, ainsi qu'à leur combinaison est obtenue à travers le calcul du pourcentage d'inhibition de la mobilité après 24 et 48 h d'exposition, selon l'équation suivante :

$$IM (\%) = 1 + \frac{(N0 - Ni)}{N0} * 100$$

Où :

IM : Pourcentage de l'immobilisation des jeunes daphnies (24h/48h) ;

N0 : Nombre initial de juvéniles soumises à l'expérimentation ;

Ni : Nombre de juvéniles daphnies immobiles à la fin de l'expérimentation.

3.3.3 Détermination de la concentration inhibitrice médiane (CI50)

La CI₅₀ moyenne, qui induit l'immobilisation de 50% des jeunes daphnies après 24 h et 48 h d'exposition aux EE2, LNG et EE2/LNG (CI₅₀/24 h ; CI₅₀/48 h), est calculée à partir de la gamme de concentrations testées précédemment par l'analyse Probit réalisé à travers le logiciel (GraphPad Prism 9).

3.3.4 Mesure du rythme cardiaque

La mesure de la fréquence cardiaque est basée sur la méthode de Bownik *et al.* (2015). Cinq daphnies adultes sont traitées (en triplicata) dans des béchers de 50 ml avec les concentrations croissantes de EE2, LNG et leurs mixtures EE2/LNG (sachant que les daphnies n'ont pas été nourris pendant le test). En tant que témoins, les daphnies ont été placés dans 50 ml du milieu de culture ISO. La mesure optique de la fréquence cardiaque est effectuée après 24 et 48 heures. Trois daphnies de chaque lot sont transférées individuellement sur une lame dans une goutte de 50 µl de la concentration appropriée de chaque hormone sous microscope (Leica DM 1000). Le mouvement de la daphnie sur la lame est limité en retirant l'excès de la goutte par des fibres de coton. L'observation microscopique des spécimens examinés est enregistrée en vidéos pendant au moins 1 minutes (à une vitesse de 30 images par seconde) avec l'appareil d'un smartphone (Samsung Galaxy S20) monté sur le microscope optique, équipé d'un module photo doté d'une qualité d'image très clair. Le grossissement (10x40) et la résolution de l'appareil photo nous ont permis d'effectuer l'analyse avec une bonne visibilité du cœur. La fréquence cardiaque est analysée avec le logiciel (Kinovea® 0.9.5) à partir des vidéos enregistrées par une méthode image par image, ou en ralentissant la vitesse de ces dernières jusqu'à 0.25x, et la fréquence moyenne est exprimé en battements/minute.

3.4 Etude biochimique

3.4.1 Méthodes de dosage des métabolites

Quinze *D. magna* adultes sont exposés aux concentrations croissantes d'EE2 ou/et LNG en quatre répétitions pendant 48 h. Ensuite, chaque lot est collecté, rincé trois fois à l'eau distillée, puis broyé dans des microtubes Eppendorf de 1,5 ml avec 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20% à l'aide d'un homogénéisateur ultrasonique (SONICS Vibracell™). Enfin, les homogénats sont centrifugés à 5000 tours / min pendant 10 minutes à 4 °C, afin d'obtenir des fractions d'aliquotes

de surnageant de 100 μ L exprimés en μ g/mg de matière fraîche, mesurés à partir des équations issues des courbes d'étalonnages.

3.4.2 Dosage des protéines totales

La teneur en protéines totales est mesurée en utilisant la méthode de Bradford (1976), qui fait appel au bleu brillant de Coomassie (G250) comme réactif. Les lectures d'absorbance sont effectuées à une longueur d'onde de 595 nm, et les taux de protéines totales sont déterminés en se basant sur une gamme étalon établie à partir d'une solution mère d'albumine sérique bovine BSA (1 mg/ml), utilisée comme standard de référence pour cette gamme d'étalonnage.

3.4.3 Dosage des lipides totaux

La teneur en lipides est évaluée suivant la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972), par comparaison avec une gamme étalon élaborée à partir d'une solution mère de lipides à 25 mg/ml, en utilisant la vanilline comme réactif. Les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 530 nm.

3.5 Embryotoxicité et malformations

3.5.1 Test d'embryotoxicité

L'évaluation de l'embryotoxicité est réalisée en suivant la procédure détaillée par Massarin, (2010) (Figure 25). Les œufs de daphnies sont exposés à des concentrations croissantes d'EE2 et LNG, ainsi qu'à leurs mélanges EE2/LNG, pendant la phase embryonnaire de leur développement, à l'intérieur de la poche incubatrice des mères adultes. Des femelles parthénogénétiques gravides sont placées individuellement dans des béciers en verre contenant 50 ml du milieu de culture et les concentrations souhaitées des hormones, pendant une période de 3 jours. Chaque concentration, ainsi que le témoin, est répliquée trois fois.

Après la libération des jeunes daphnies dans le milieu, celles-ci font l'objet d'un examen microscopique approfondi afin d'identifier, caractériser et de dénombrer les anomalies morphologiques. Les images des néonates présentant des déformations sont capturées à l'aide d'un système comprenant une caméra (Leica EC3) reliée à un microscope optique (Leica DM 1000), qui est à son tour connecté à un ordinateur (Figure 25).

3.5.2 Taux de malformations néonatales

Le taux de malformations néonatales peut être calculé en utilisant la formule suivante :

$$TA (\%) = \frac{Nm}{Nt} * 100$$

Où :

- ♦ **TA** : Taux d'anomalies ;
- ♦ **Nm** : Nombre de nouveau-nés malformés ;
- ♦ **Nt** : Nombre total des nouveau-nés produits par mère.

3.5.3 Détermination du sexe des néonates

La méthode la plus pratique et simple pour distinguer le sexe des daphnies repose sur l'observation de leurs caractéristiques phénotypiques, car les mâles et les femelles sont génétiquement identiques et leur sexe est déterminé par l'environnement (Olmstead et LeBlanc, 2000). La principale distinction entre les mâles et les femelles réside dans la longueur et la morphologie des antennes primaires, qui sont plus développées chez les mâles que chez les femelles (Figure 24). Cette disparité est perceptible dès la naissance, bien que d'autres caractéristiques sexuelles secondaires s'étalent au fur et à mesure de la croissance (Tatarazako *et al.*, 2003).

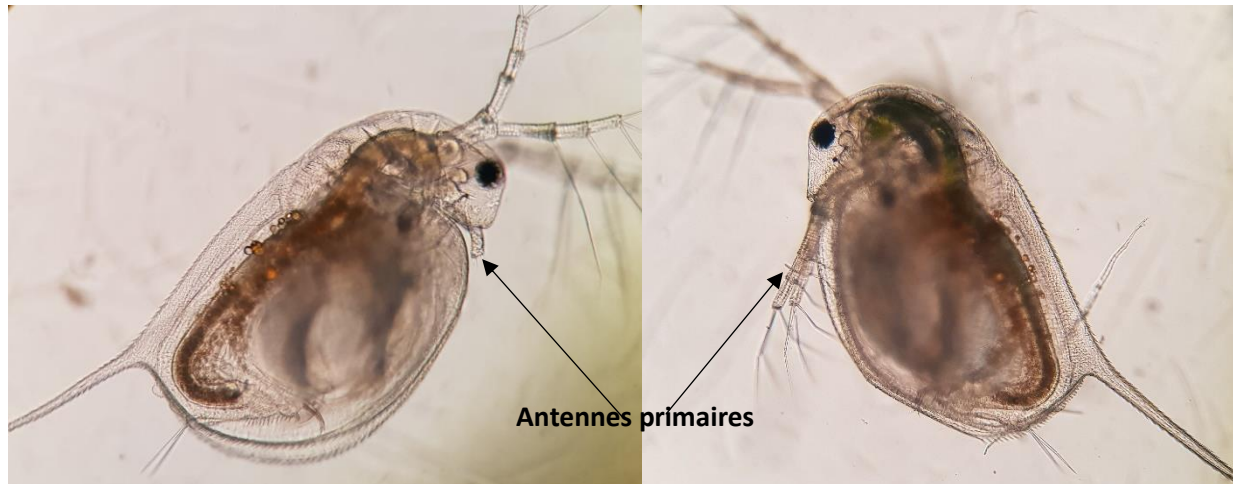


Figure 24 : Différence entre néonate femelle (à gauche) et néonate mâle (à droite) âgés de 12 h.
Photographie issue de notre culture

Afin d'identifier le sexe, les néonates produits par chaque femelle adulte doivent être transférés à l'aide d'une pipette et déposés dans une boîte de Pétri contenant 20 ml du milieu ISO (Zou et Fingerman, 2003). Il est essentiel de minimiser la quantité du milieu pour restreindre les déplacements des spécimens. L'analyse des premières antennes est réalisée à l'aide d'un microscope optique (Leica ATC 2000 Microscope, Wetzlar, Allemagne) (grossissement 10x40).

3.5.4 Observation microscopique des anomalies embryonnaires

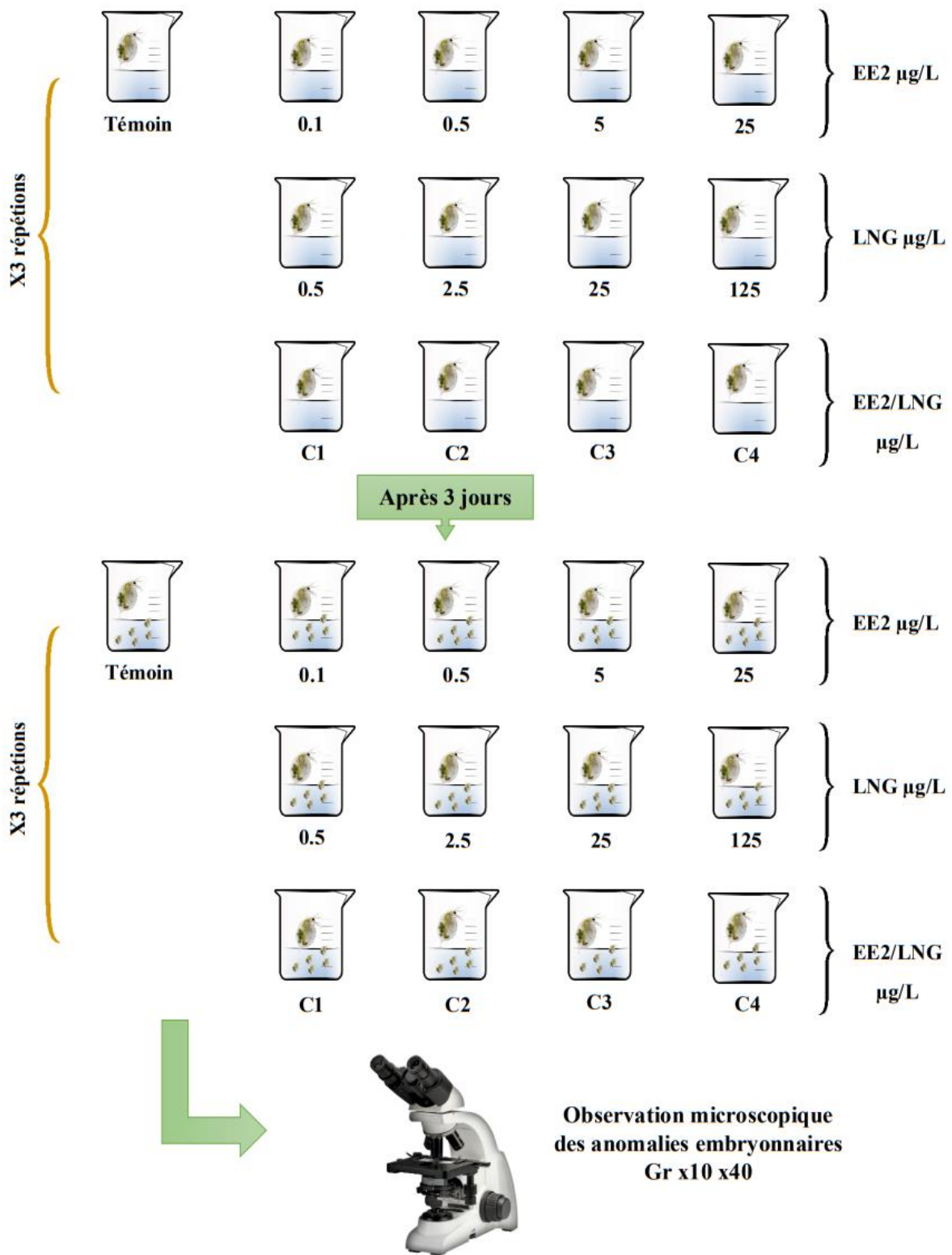


Figure 25 : Procédure expérimentale du test d'embryotoxicité et observation microscopique des déformations néonatales détaillée par Massarin, (2010)

3.6 Etude comportementale

3.6.1 Suivi des trajectoires de déplacement

Afin d'évaluer l'influence des concentrations croissantes d'EE2, LNG et de leurs combinaisons sur la trajectoire de nage des daphnies adultes, nous avons entrepris une étude selon la méthode de Uttieri *et al.* (2004), améliorée par Bownik *et al.* (2017), qui consiste à enregistrer les déplacements en présence et en absence des xénobiotiques, grâce à des enregistrements vidéo. Ensuite, les vidéos sont analysées à l'aide du logiciel (Kinovea[®] 0.9.5), permettant une traçabilité précise des cheminements parcourus par les spécimens (Figure 26).

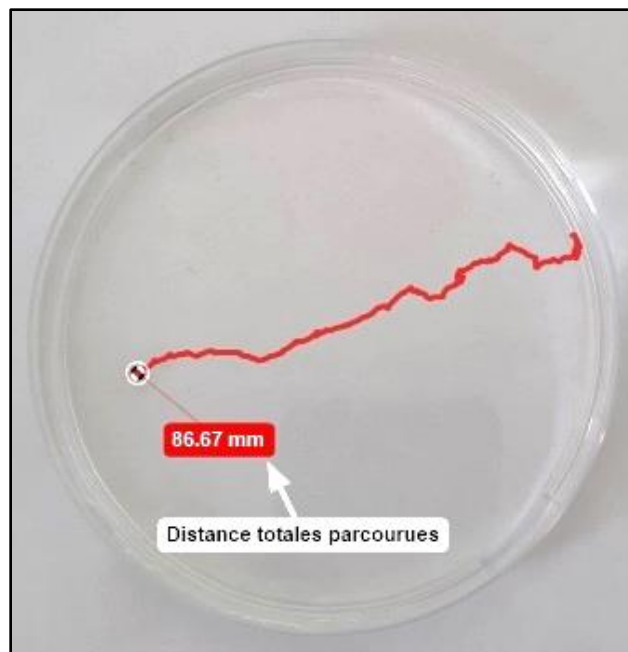


Figure 26 : Trajectoire et distance parcourue par une daphnie en fonction du temps (1 min) obtenue via le logiciel (Kinovea 0.9.5)

Trois daphnies adultes sont exposées aux concentrations croissantes d'EE2, LNG et EE2/LNG pendant 48 heures, puis placées séparément dans une boîte d'observation (Boîte de Pétri) d'un diamètre de 85 mm et d'une profondeur de 12 mm, contenant 35 ml de milieu ISO. Toutes les boîtes sont maintenues à 20 °C avec une photopériode de 16 h lumière et 8 h d'obscurité. Les mouvements des daphnies sont enregistrés en vidéo pendant 10 secondes, leurs permettant de s'acclimater à l'environnement de la boîte d'observation pendant les 10 premières secondes après avoir été délicatement déposées à l'aide d'une pipette.

3.6.2 Calcul de la vitesse de déplacement

Les vitesses de déplacements des daphnies traitées et témoins sont estimées à travers les enregistrements de vidéos, selon la méthode de Uttieri *et al.* (2004), améliorée par Bownik *et al.* (2017). Les mouvements des daphnies sont enregistrés en vidéos pendant 1 min, ensuite, les vidéos sont analysées à l'aide du logiciel (Kinovea 0.9.5), et la vitesse est exprimée en millimètres par seconde (mm/s) (Figure 26). Chaque valeur est la moyenne de la vitesse linéaire de 3 daphnies adultes exposées aux concentrations croissantes d'EE2, LNG et EE2/LNG pendant 24 h et 48 h pendant minimum 1 min.

3.7 Etude du stress oxydatif

3.7.1 Préparation de l'homogénat

Les activités enzymatiques et non-enzymatiques ont été réalisées sur quinze individus adultes ($n = 4$ par groupe), prélevés et rincés trois fois à l'eau distillée, exposés pendant 48 heures à des concentrations croissantes d'EE2, de LNG et d'EE2/LNG en quadruplé, puis placés dans des tubes Eppendorf et congelés ($- 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pour être conservés. Pour les analyses enzymatiques, les échantillons sont broyés à l'aide d'un homogénéisateur à ultrasons dans des microtubes Eppendorf de 1,5 ml avec 1 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6), 1 ml d'EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) (20 mM) et 1 ml de Tris-HCl (trisaminométhane-hydrochlorure) (50 mM, pH 7,5), où les aliquotes sont séparées pour chaque biomarqueur. Les surnageants sont ensuite centrifugés à 5 000 tours/minute pendant 10 minutes à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.2 Evolution du taux de glutathion (GSH)

Le GSH est déterminé selon la méthode de Weckbecker et Cory, (1988), où une fraction du surnageant (0.8 ml) provenant de l'homogénéisation d'organismes dans 1 ml d'EDTA (0,02 M) est ajoutée à 0,2 ml d'acide (ASS) sulfosalicylique dans un tube Eppendorf. La réaction est déclenchée en ajoutant 0,025 ml d'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0,5 ml de surnageant après agitation et centrifugation à 1000 tours/min pendant 5 minutes. Les niveaux de GSH des échantillons de daphnies témoins et traités sont mesurés instantanément à une longueur d'onde de 412 nm, et les résultats sont représentés en (mol/mg de protéine). Cette teneur en GSH est calculée par la formule suivante :

$$GSH (\mu\text{mol}/\text{mg de protéines}) = \frac{DO * 1 * 1.525}{13.1 * 0.8 * 0.5 * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ♦ **1** : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisations (dégradation des protéines) : (0.2 ml d'ASS + 0.8 ml d'homogénat)
- ♦ **1.525** : Volume total des solutions contenu dans la cuve (0.5 ml de surnageant + 1 ml Tris/EDTA + 0.025 ml de DTNB).
- ♦ **13.1** : Coefficient d'absorbance du groupement Thiol (**R-SH**) à 412 nm.
- ♦ **0.8** : Volume en ml de l'homogénat utilisé.
- ♦ **0.5** : Volume en ml du surnageant utilisé.

3.7.3 Evolution de l'activité Catalase (CAT)

L'activité de la CAT est déterminée selon la méthode de Claiborne, (1985), qui fait appel à l'addition d'eau oxygénée qui initie la réaction, en évaluant l'absorbance successive à la dismutation du H₂O₂ à la longueur d'onde de 240 nm et en la surveillant toutes les 15 secondes pendant 1 minute pour mesurer les fluctuations de l'activité enzymatique. Les résultats sont représentés en (μmol/min/mg de protéines) et calculées selon la formule suivante :

$$CAT (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO}{0.040 * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ♦ **ΔDO** : Pente de la droite de régression linéaire obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- ♦ **0.040** : Coefficient d'extinction molaire du H₂O₂ à 240 nm (0.04 mM⁻¹ cm⁻¹).

3.7.4 Evolution de l'activité glutathion-S-Transférase (GST)

Comme décrit par Habig *et al.* (1974), l'activité de GST est établie en suivant la formation du complexe de GSH avec le CDNB. Après homogénéisation des échantillons dans 1 ml de tampon phosphate (100 mM, pH = 6), l'homogénat est centrifugé pendant 30 min à 14000 tours/min. La réaction est initiée en mélangeant 1,2 ml de CDNB (1 mM)/GSH (1 mM) avec 0,2 ml de surnageant

dans une cuve en quartz. La production du conjugué glutathion S-2,4-dinitrophényle est effectuée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 340 nm après chaque intervalle de 1 min pendant une période de 5 min et les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines en appliquant l'équation suivante :

$$GST (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{\Delta DO * Vt}{e * Vs * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ♦ ΔDO : Pente de la droite de régression linéaire obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.
- ♦ Vt : Volume total de la cuve (1.4 ml).
- ♦ e : Coefficient d'extinction molaire du CDNB ($9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- ♦ Vs : Volume du surnageant (0.2 ml).

3.7.5 Evolution du taux de malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique résulte de l'oxydation des membranes lipidiques induite par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et est quantifiée selon la méthode de Buege et Aust, (1978) et amélioré suivant la méthode de (Draper et Hadley, 1990) qui consiste en la mesure colorimétrique de la réaction entre l'Acide Thiobarbiturique (TBA) et le Malondialdéhyde (MDA), utilisées pour déterminer les niveaux de MDA résultant de cette réaction, exprimés en (mmol/mg de protéine). La densité d'absorption du produit issu de cette réaction (couleur rouge brune) est mesurée grâce au spectrophotomètre (JENWAY 7305) à une longueur d'onde de 532 nm, selon la formule suivante :

$$MDA (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de protéines}) = \frac{DO * Vt}{e * Vs * \text{mg de protéines}}$$

Où :

- ♦ Vt : Volume total de la cuve (1 ml).
- ♦ e : Coefficient d'extinction molaire du TBA ($156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- ♦ Vs : Volume du surnageant (0.5 ml).

3.8 Méthodes statistiques

La toxicité aiguë est caractérisée en déterminant la concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀), et les taux d'immobilité sont ajustés à l'aide de la formule d'Abbott (1925), puis convertis en Probits, suivis d'une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) utilisée pour les comparaisons multiples entre les différents groupes traités et témoins, où $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

Les dosages biochimiques et enzymatiques sont réalisés en quadrupler, et les résultats sont présentés sous la forme de moyennes \pm erreurs-types de la moyenne (SEM) pour évaluer la corrélation entre les concentrations d'EE2 et/ou de LNG et leurs effets respectifs. Les variations intergroupes sont évaluées pour leur signification statistique pour les métabolites, les biomarqueurs du stress oxydatif et des antioxydants, fréquence cardiaque, tests de comportements, ainsi que pour les tests d'embryotoxicité, en utilisant une analyse de variance à un facteur (ANOVA) puis soumises au test de comparaisons multiples de Tukey (GraphPad Prism 9). Le seuil de signification statistique est établi à $p < 0,05$, où les valeurs avec des lettres différentes (a/b/c/d/e) diffèrent significativement.

3.8.1 Analyse en composante principale (ACP)

Pour caractériser la réponse des biomarqueurs du stress oxydatif et de l'immobilisation vis-à-vis la mixture EE2/LNG, nous avons utilisé une approche multivariée, une Analyse en Composantes Principales (ACP) couplée à un cercle de corrélation et à un dendrogramme de Ward sont réalisées en utilisant XLStat.

III. Résultats

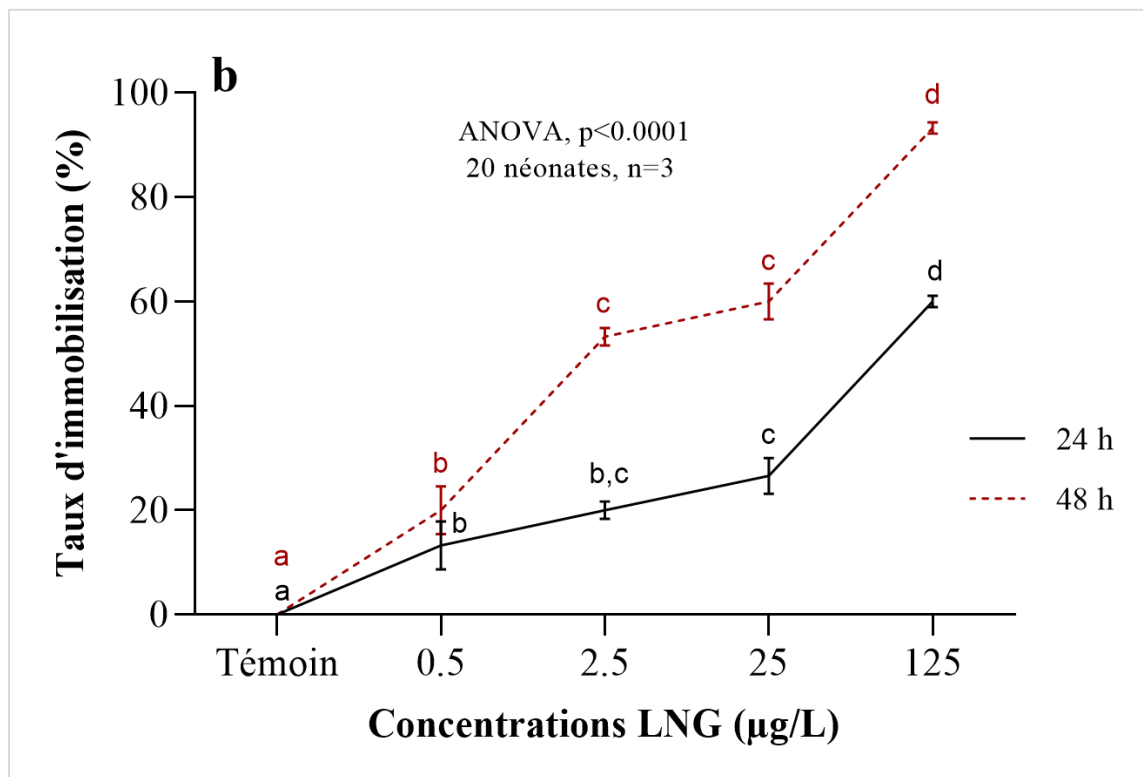
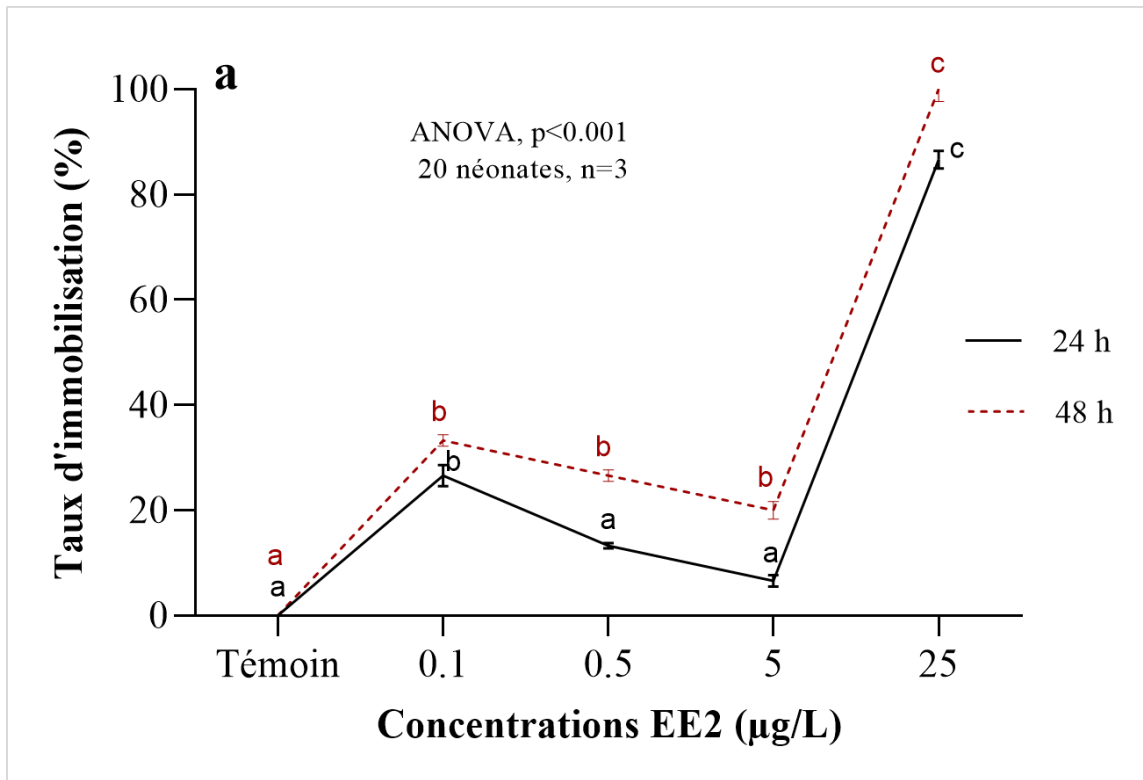
1 Paramètres physiologiques

1.1 Taux d'immobilisation de *D. magna* après exposition au EE2, LNG et EE2/LNG (24h/48h)

Les résultats concernant le taux d'immobilisation des jeunes daphnies après 24 et 48 heures d'exposition à différentes concentrations d'EE2, de LNG et à leur combinaison sont représentés dans la (figure 27).

Nous remarquons que les stéroïdes EE2, le LNG et leur combinaison ont un impact significatif sur la mobilité des jeunes daphnies, et ce pour les deux durées d'exposition ($p < 0,05$) (Figure 27 a, b, c). L'observation de la mobilité des juvéniles a révélé un schéma dépendant de la concentration, avec une diminution lors du traitement avec l'EE2 ($\leq 5 \mu\text{g/L}$) et une augmentation avec le LNG ($\leq 125 \mu\text{g/L}$). Cependant, la combinaison des deux hormones a amplifié considérablement l'immobilisation, surtout aux plus faibles concentrations. Par exemple, à $0,1 \mu\text{g/L}$ d'EE2, l'inhibition est de 33,33%, à $0,5 \mu\text{g/L}$ de LNG, elle est de 20%, mais elle atteint 40% avec la combinaison (C1 = $0,1/0,5 \mu\text{g/L}$). Notamment, l'exposition aux concentrations maximales d'hormones a engendré l'immobilisation la plus significative après 48 heures d'exposition, atteignant 100% à $25 \mu\text{g/L}$ d'EE2, 93,33% à $125 \mu\text{g/L}$ de LNG et 100% dans le cas de la mixture (C4 = $25/125 \mu\text{g/L}$). Tandis que les groupes témoins ne présentaient aucune inhibition 0.00 %.

Les concentrations sont exprimées en moyenne \pm SEM ($n = 3$ par groupe). Les valeurs avec des lettres différentes (a/b/c/d/e) indiquent des différences intergroupes significatives.



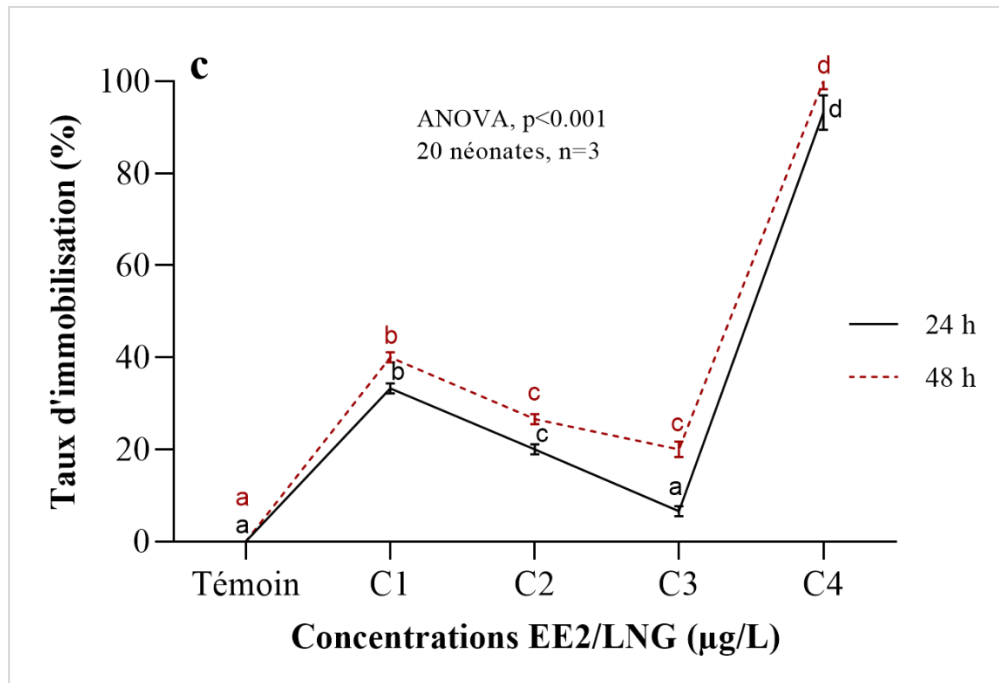


Figure 27 : Taux d'immobilisation enregistrés chez *D. magna* exposées aux concentrations croissantes d'EE2 (a), de LNG (b) et de la mixture EE2/LNG (c) après 24 et 48 h

1.2 Détermination de la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀)

L'influence de l'EE2 et du LNG sur l'immobilisation s'est intensifiée après 48 h par rapport à 24 h d'exposition, ce qui a été corroboré par la diminution significative des valeurs de la CI₅₀ au fil du temps, comme indiqué dans le (tableau 06) ci-dessous. Ainsi, l'effet de l'EE2 s'est révélé plus prononcé que celui du LNG, tant après 24 h que 48 h d'exposition.

Tableau 06 : Les valeurs de la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) qui causent l'immobilisation des néonates sont calculées pour une exposition de 24 heures et 48 heures à l'EE2 et au LNG (n = 3) sont regroupées dans le tableau suivant :

Traitement	Temps (h)	Equation de régression	Coefficient de corrélation R ²	CI ₅₀ (µg/L)	Intervalle de confiance 95%
EE2	24 h	$y = 1.288 + 2.374x$	0.977	20.61	-0.925 - 3.500
	48 h	$y = -4.062 + 5.987x$	0.977	1.66	-10.357 - 2.232
LNG	24 h	$y = 1.4 + 2.139x$	0.993	117.34	0.293 - 2.507
	48 h	$y = -0.046 + 3.111x$	0.950	2.23	-5.36 - 5.268

Note : L'analyse Probit réalisée avec (GraphPad Prism 9) a déterminé l'inhibition accumulée (%) des néonates de *D. magna* traitées avec différentes concentrations d'EE2 et de LNG pendant 24 et 48 heures, ainsi que la CI₅₀ avec des limites de confiance de 95%. Le logarithme de la concentration est représenté par la lettre X dans l'équation de régression, tandis que l'inhibition des daphnies est représentée par la lettre Y.

1.3 Mesure du rythme cardiaque

La figure (28) présente le changement de la fréquence cardiaque chez les daphnies adultes témoins et traitées par les concentrations croissantes d'EE2, LNG et EE2/LNG après 24 et 48 h d'exposition.

Nous n'observons aucun changement significatif du rythme cardiaque pour les différentes concentrations croissantes de EE2, LNG et leurs combinaisons, cependant, une stimulation significative ($p = 0.008$) avec la concentration maximale (25 µg/l) d'EE2, atteignant 564 battements/min comparativement aux témoins (de 361.33 battements/min après 24 h), et une diminution très hautement significative ($p < 0.001$) à la concentration la plus forte (125 µg/l) de LNG après 24 h, atteignant 197.33 battements/min.

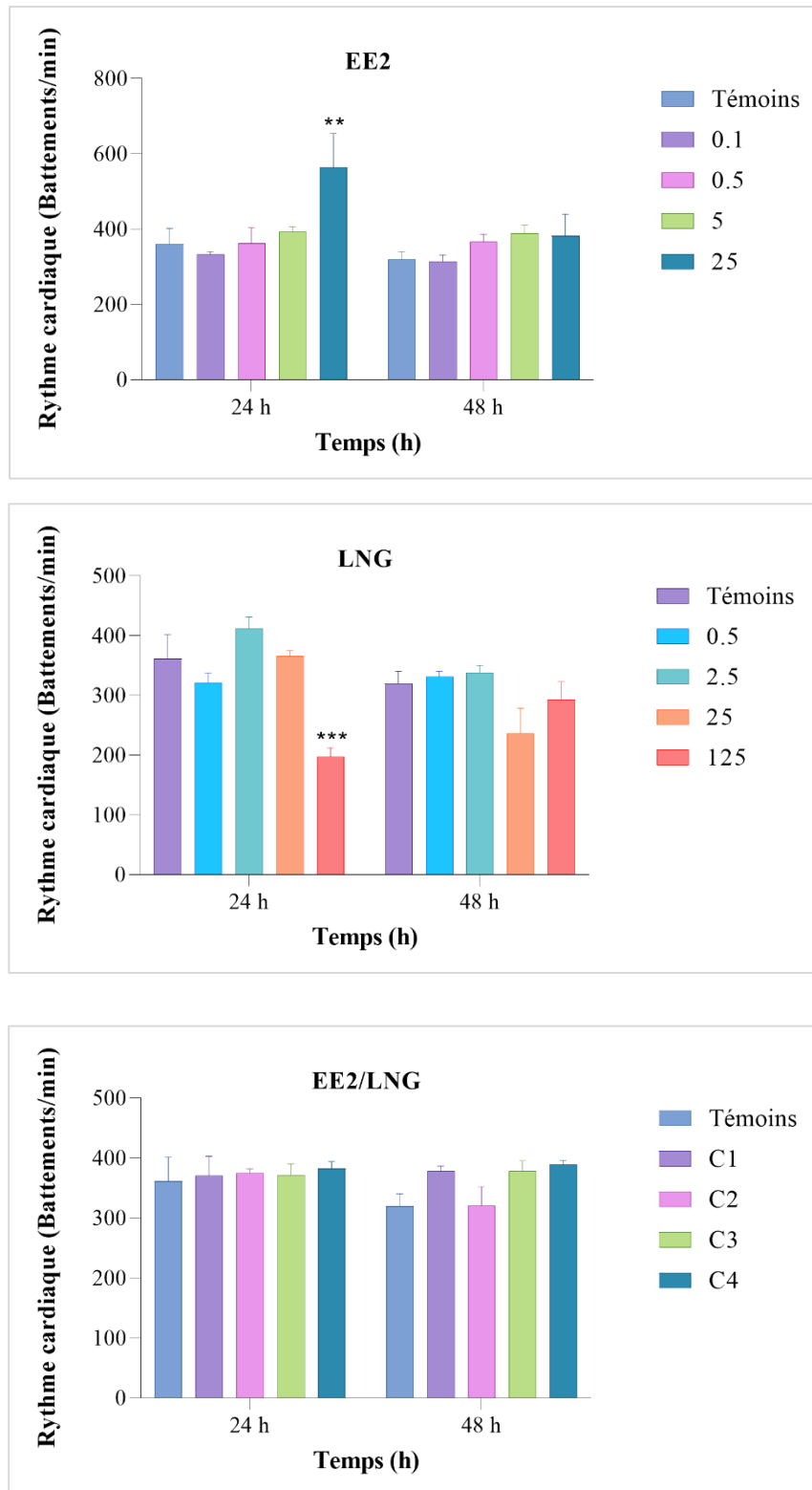


Figure 28 : Impact des concentrations croissantes d'EE2, LNG et EE2/LNG sur le rythme cardiaque de *D. magna* après 24 et 48 h d'exposition

2 Etude biochimique

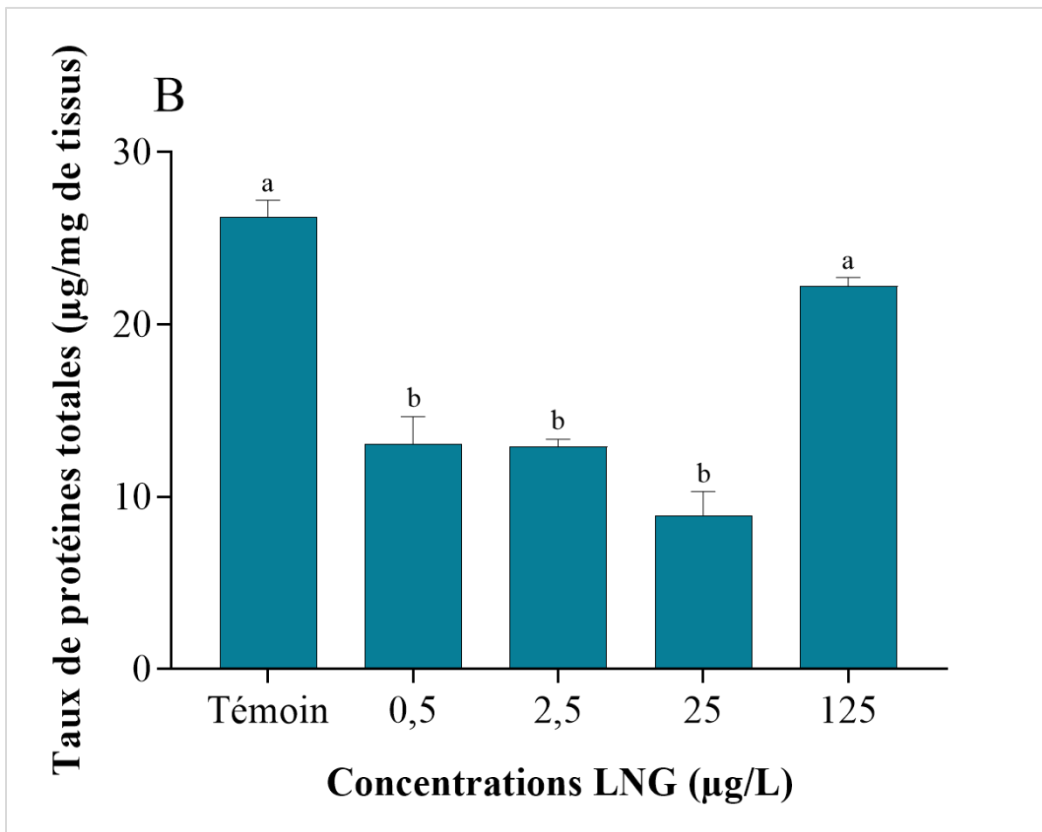
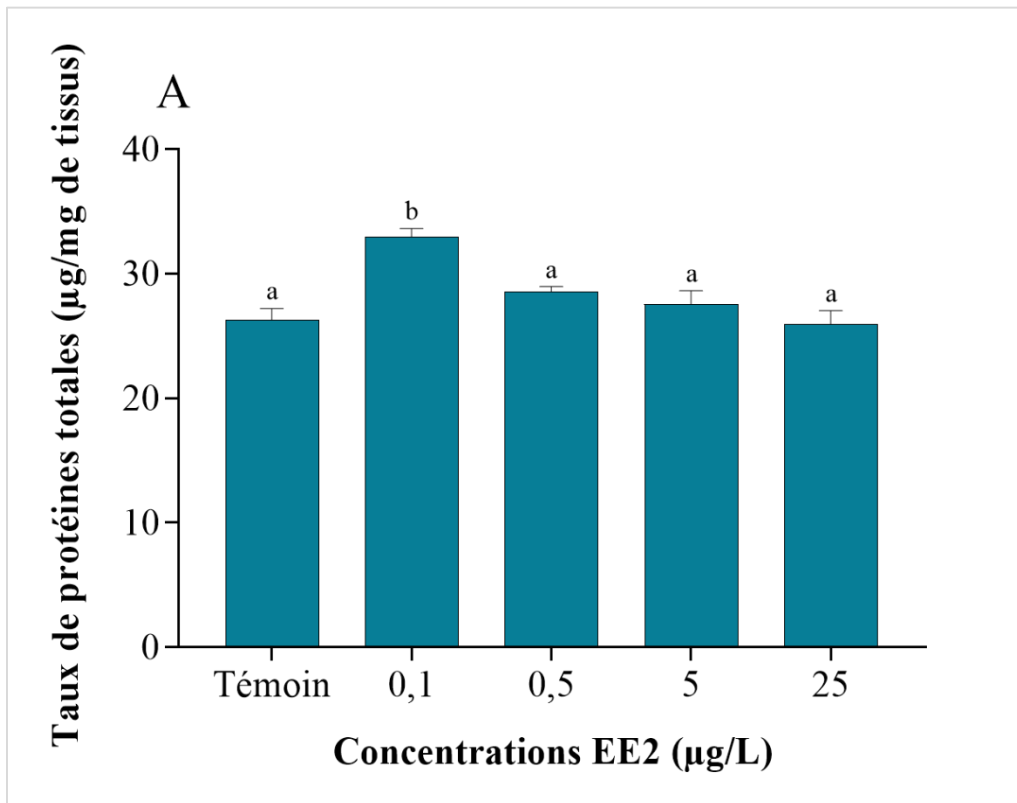
2.1 Variations du taux de protéines totales chez *D. magna*

La figure (29) présente l'évolution du taux de protéines chez les daphnies adultes témoins et traitées par les concentrations croissantes d'EE2 (A), LNG (B) et EE2/LNG (C) pendant 48 h.

Nous constatons que la teneur en protéines totales augmente de manière significative ($p < 0,05$) chez les traitées par la plus faible concentration (0.1 $\mu\text{g/l}$) d'EE2, atteignant 32,98 $\mu\text{g/mg}$, comparée au témoin qui est de 26,27 $\mu\text{g/mg}$ (Fig. 29A). Cependant, les concentrations les plus élevées n'ont montré aucun effet significatif ($p > 0,05$), où les concentrations 0,5 et 5 $\mu\text{g/L}$ ont augmenté les niveaux de protéines par rapport à la concentration la plus élevée de 25 $\mu\text{g/L}$, qui est très proche à celle du témoin.

En ce qui concerne la quantité de protéines totales après exposition au LNG (Fig. 29B), une diminution significative ($p < 0,05$) a été observée, atteignant près de la moitié de celle du témoin pour toutes les concentrations, en particulier à la concentration de 25 $\mu\text{g/L}$, où la quantité de protéines a chuté jusqu'à 8,94 $\mu\text{g/L}$, sauf à la concentration la plus élevée de 125 $\mu\text{g/L}$, qui n'est pas significative ($p > 0,05$).

Le traitement par la mixture EE2/LNG (Fig. 29C), induit une augmentation significative des niveaux de protéines ($p < 0,05$), particulièrement avec les concentrations les plus faibles de la combinaison des deux hormones, C1 et C2, avec un effet significatif et plus important pour C2 par rapport à C1 (49.33 $\mu\text{g/l}$) près du double de celle du témoin. Cette augmentation est plus prononcée comparant à l'effet enregistré chez les daphnies exposées individuellement à l'EE2 et LNG.



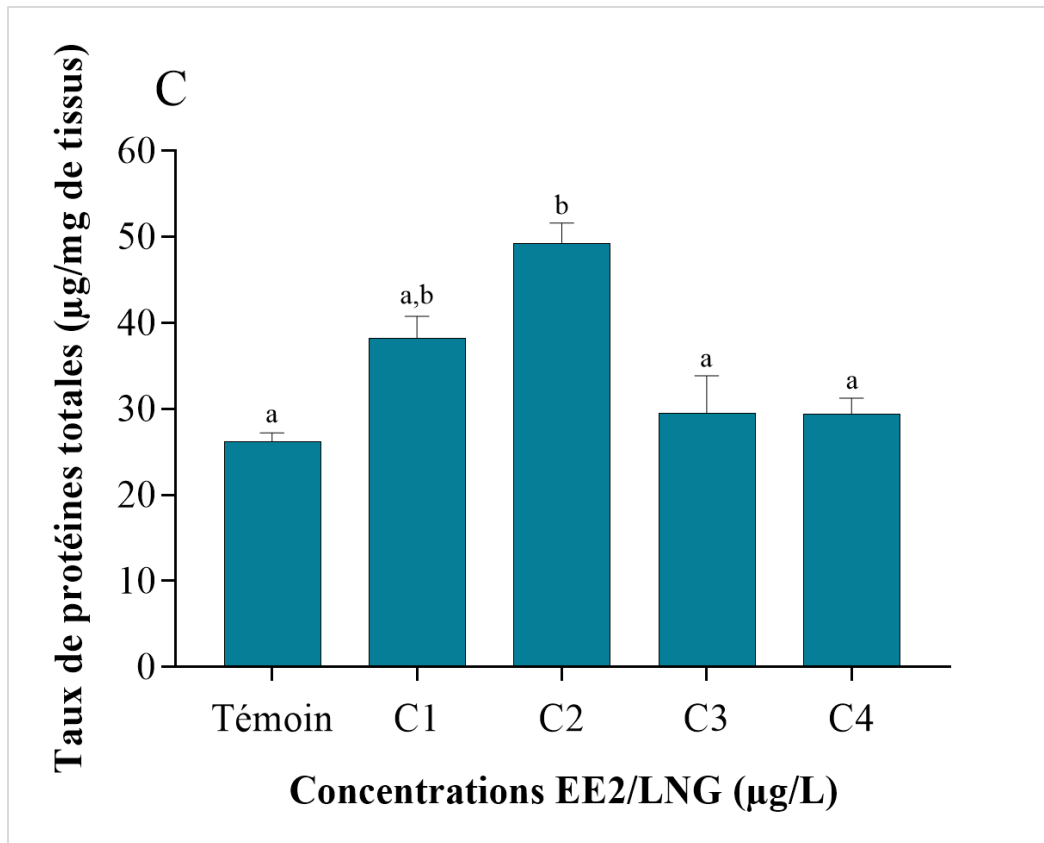


Figure 29 : Effet des concentrations croissantes d'EE2 (A), de LNG (B) et EE2/LNG (C) sur le taux de protéines chez *D. magna* après 48 h d'exposition

2.2 Evolution de la teneur en lipides chez *D. magna*

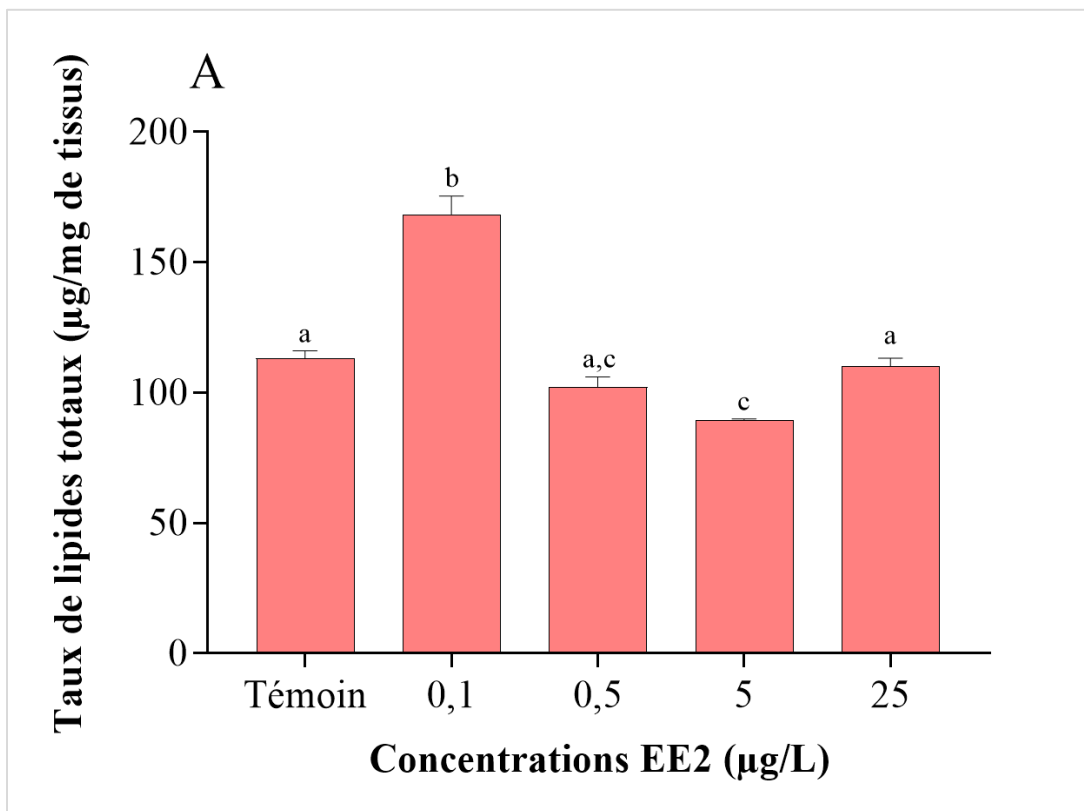
La figure (30) illustre les fluctuations de la teneur en lipides chez les daphnies adultes exposées aux concentrations croissantes d'EE2 (A), de LNG (B) et de la combinaison EE2/LNG (C) pendant 48 h.

Nous observons qu'une augmentation significative ($p < 0,05$) du contenu lipidique est observée à la concentration la plus faible de 0,1 µg/L d'EE2 (168,40 µg/mg), avec une légère diminution significative à 5 µg/L (89,51 µg/mg) par rapport aux témoins (113,22 µg/mg), comme indiqué dans la Figure (30A).

En revanche, la variation de la teneur en lipides des daphnies exposées au LNG (Figure 30B) n'est pas significative ($p > 0,05$). En effet, nous observons une augmentation avec la

concentration la plus élevée de 125 $\mu\text{g/L}$ (121,37 $\mu\text{g/mg}$) (en comparaison avec les autres concentrations plus basses).

Pour ce qui est de la combinaison EE2/LNG, un effondrement significatif du contenu lipidique ($p < 0,05$) est noté dans tous les groupes exposés aux hormones synthétiques combinées par rapport au témoin (Figure 30C), atteignant un taux de 25,44 $\mu\text{g/mg}$ avec la combinaison C2.



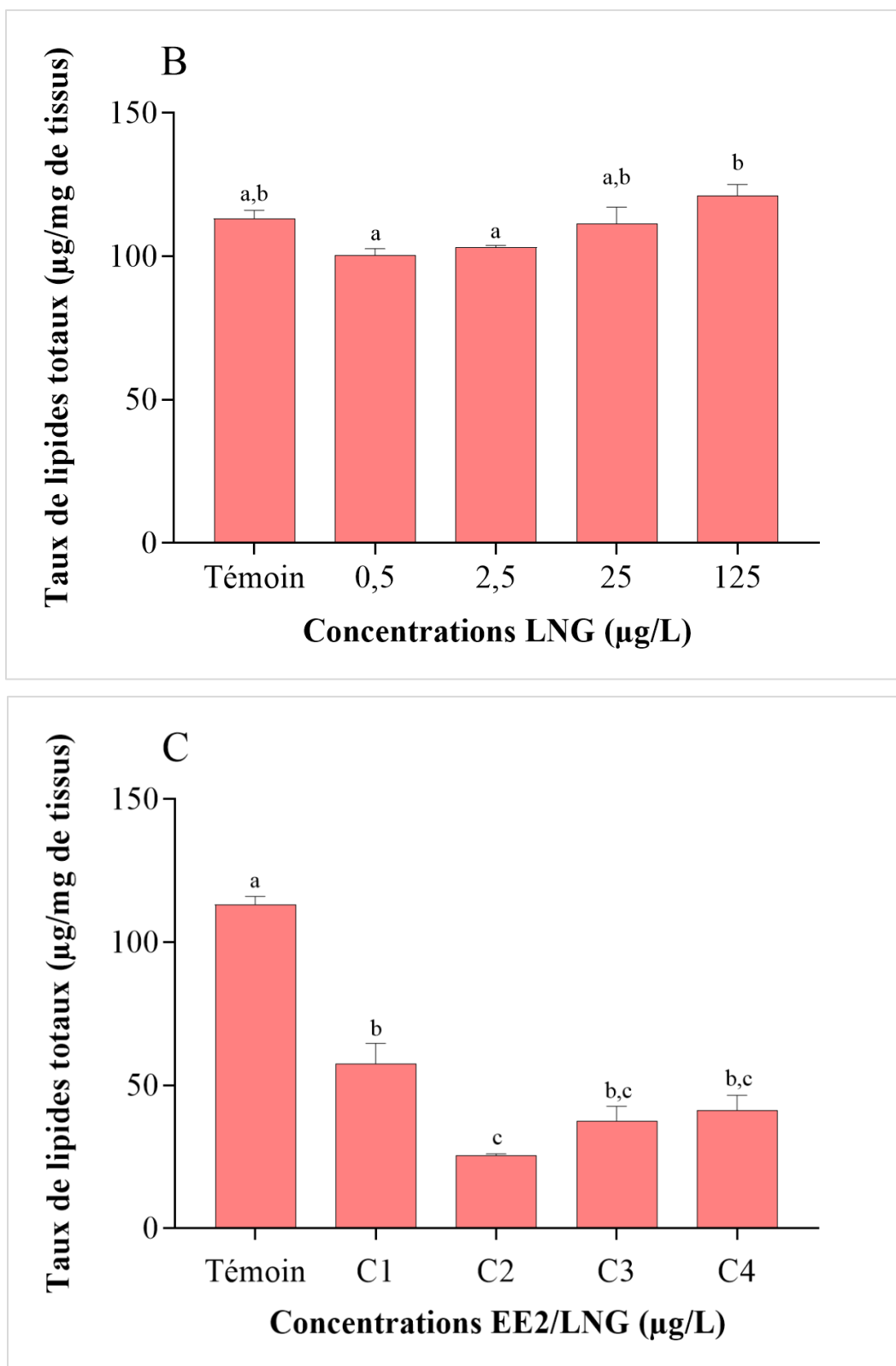


Figure 30 : Effet des concentrations croissantes d'EE2 (A), de LNG (B) et EE2/LNG (C) sur la teneur en lipides chez *D. magna* après 48 h d'exposition

3 Embryotoxicité et malformations

3.1 Détermination du sexe des néonates

Le tableau (7) indique l'apparition des néonates mâles lors de la première ponte des femelles traitées avec les différents stéroïdes EE2, LNG et leurs mixtures EE2/LNG, et nos résultats montrent une augmentation significative ($p < 0.05$) de la masculinisation des nouveau-nés de *D. magna* atteignant 100% par rapport aux témoins qui n'a montré que 5 % de mâles produits, notamment dans les groupes exposés à la concentration la plus faible et la plus élevée 0.1, 25 $\mu\text{g/L}$ d'EE2, respectivement (Tableau 07).

Ainsi, nous avons constaté que tous les descendants des femelles exposées à des concentrations croissantes (C1, C2, C3 et C4) du mélange EE2/LNG se sont toutes significativement masculinisées ($p < 0.05$). Tandis que la masculinisation de ceux exposés à la molécule LNG est concentration-dépendante (Tableau 07).

Tableau 07 : Taux d'apparition des mâles dans la descendance des daphnies femelles exposées aux concentrations croissantes de EE2, LNG et EE2/LNG.

Traitements	Concentrations ($\mu\text{g/L}$)	(%) mâles
EE2	Témoin	5 ± 0.14^a
	0.1	100 ± 0.61^b
	0.5	$83,33 \pm 0.55^c$
	5	$78,16 \pm 0.43^c$
	25	$100 \pm 0.53^{b,c}$
LNG	0.5	$9,11 \pm 7.05^{a,b}$
	2.5	$26,33 \pm 13.78^b$
	25	$62,5 \pm 13.78^c$
	125	100 ± 9.43^c
	C1	100^a

EE2/LNG	C2	100 ^a
	C3	100 ^a
	C4	100 ^a

3.2 Taux de malformations chez les nouveau-nés

La Figure (31) illustre la variation du taux d'anomalies chez les juvéniles après l'exposition des daphnies adultes aux concentrations croissantes de EE2, LNG et EE2/LNG pendant une période de 3 jours, au cours de leur stade embryonnaire.

L'exposition directe aux hormones synthétiques peut être critique pour les œufs, l'embryotoxicité et la production de juvéniles. Pour les trois traitements, on observe une augmentation hautement significative ($p < 0.05$) des effets embryotoxiques avec presque toutes les gammes de concentrations utilisées selon les résultats montrés dans la figure (31).

Le traitement avec la molécule EE2 a mis en évidence que tous les descendants des femelles exposées pendant 3 jours notamment à la plus faible et la plus forte concentration 0.1 et 25 $\mu\text{g/L}$, respectivement, sont malformés, et présentent un taux d'anomalies de 100% (Figure 31A). Tandis que le traitement avec la molécule LNG, a induit une augmentation concentration-dépendante du taux d'anomalies chez les néonates (Figure 31B).

Chez les femelles traitées par les concentrations C1 et C4 de la mixture EE2/LNG, les malformations des néonates ont affecté 100 % de la progéniture totale (Figure 31C).

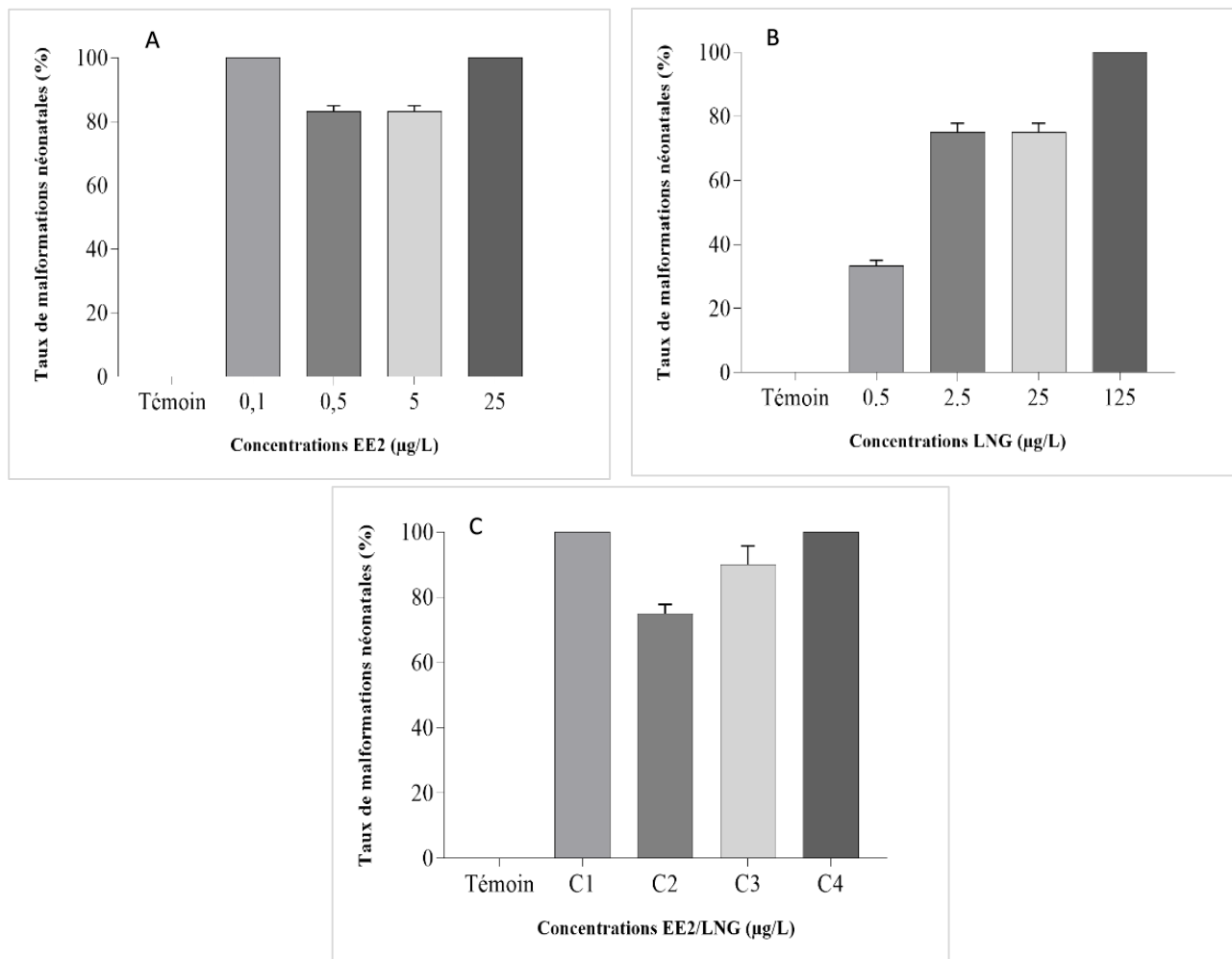


Figure 31 : Taux des anomalies morphologiques induites par EE2, LNG et la mixture EE2/LNG chez les néonates durant leur stade embryonnaire

3.3 Types de modifications morphologiques observées

Plusieurs types de malformations sont observées au niveau de la descendance de *D. magna*. remarquées particulièrement avec la plus faible concentration 0.1 µg/L d'EE2, la plus forte concentration 125 µg/L de LNG et toute la gamme de concentrations de la mixture EE2/LNG. Il est également noté que certains juvéniles présentent simultanément plusieurs de ces malformations, illustrées dans les Figures (33, 34, 35, 36 et 37). Ces anomalies affectent divers organes, notamment :

❖ Les antennes :

- Rétrécissement, absence totale des antennes secondaires (A1).

- Rétrécissement des antennes primaires (A2).
 - Désorientation des antennes secondaires vers le bas (A3).
 - Apparitions de nouveaux branchements au niveau des antennes secondaires, des mandibules et l'épine post-abdominale (A4).
 - Développement d'antennes secondaires au niveau de l'épine abdominale qui est très rare (A5).
- ❖ **Épine caudale :**
- Déformations ou rétrécissement (EC1).
 - Courbement plus ou moins important (EC2).
 - Absence totale de l'épine caudale (EC3).
- ❖ **Autres malformations :**
- Déformation ou détérioration de la carapace (C1).
 - Problèmes au niveau du tube digestif (infection intense) (TD).

En contraste, les spécimens témoins ne montrent aucune déformation développementale (Figure 32).



Figure 32 : Néonates témoins de *D. magna*, Gr x100

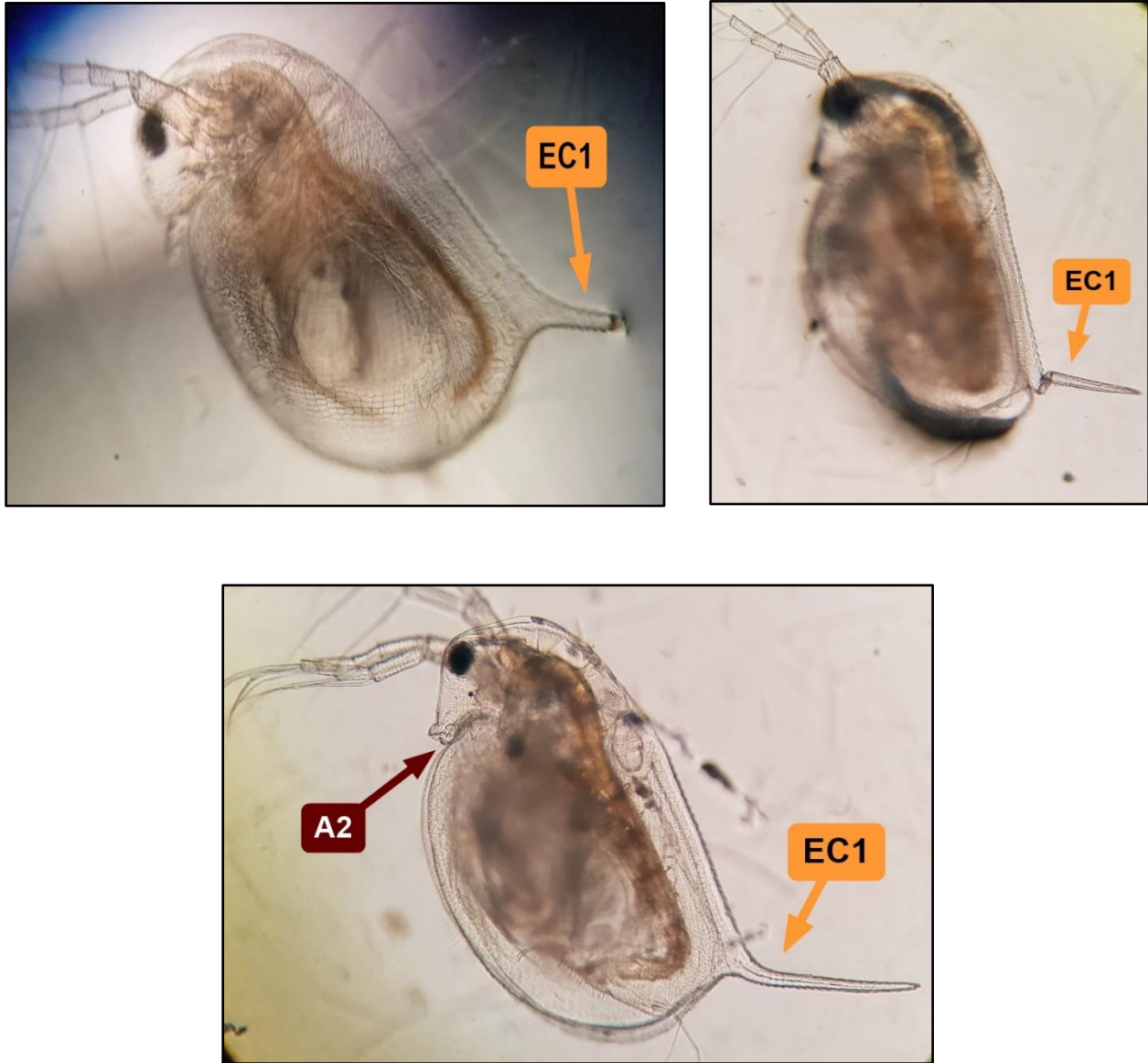


Figure 33 : Néonates de *D. magna* montrant : - Rétrécissement des antennes primaires (A2) ; - Des déformations ou rétrécissement au niveau de l'épine caudale (EC1), Gr x100

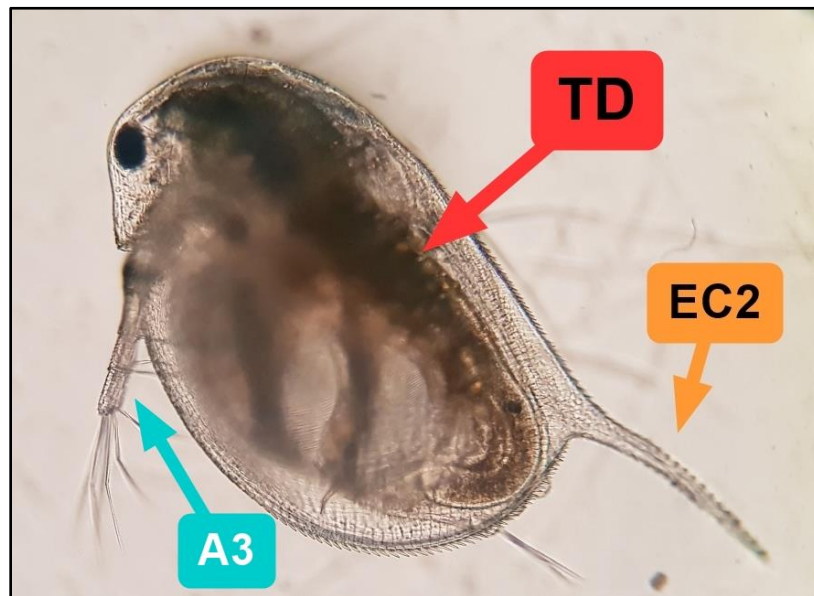


Figure 34 : Nouveau nés mâles de *D. magna* présentant : - Désorientation des antennes secondaires vers le bas (**A3**) ; - Un courbement plus ou moins important de l'épine caudale (**EC2**) ; - Infection intense du tube digestif (**TD**), Gr x100

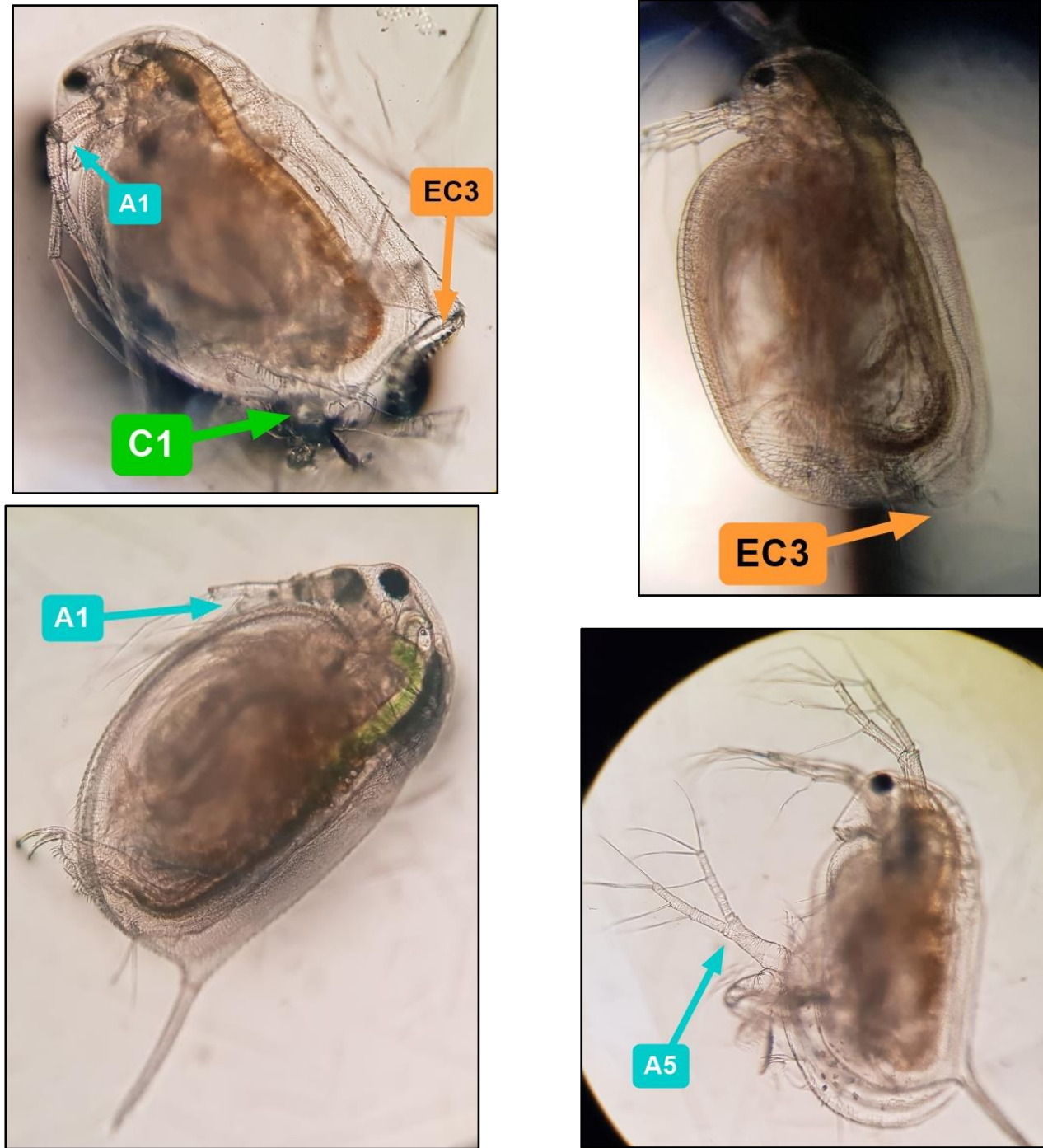


Figure 35 : Néonates de *D. magna* indiquant : - Un rétrécissement et/ou absence totale des antennes secondaires (A1) ; - Développement d'antennes secondaires au niveau de l'épine post-abdominale (A5) ; - Absence totale de l'épine caudale (EC3) ; - Déformation ou détérioration de la carapace (C1)

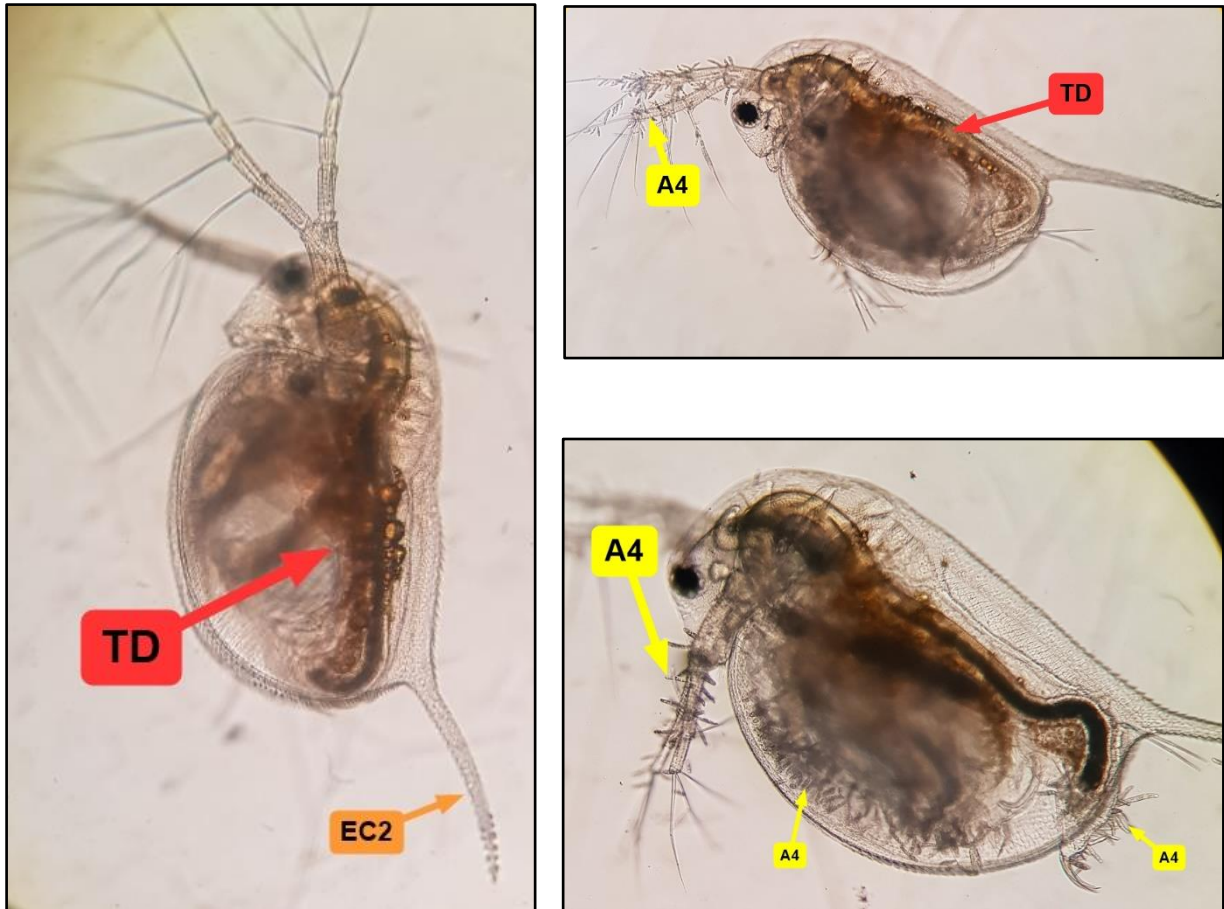


Figure 36 : Juvéniles de *D. magna* indiquant : - L'apparition de nouveaux branchements au niveau des antennes secondaires, des mandibules et l'épine post-abdominale (A4) ; - Infection sévère au niveau du tube digestif (TD)

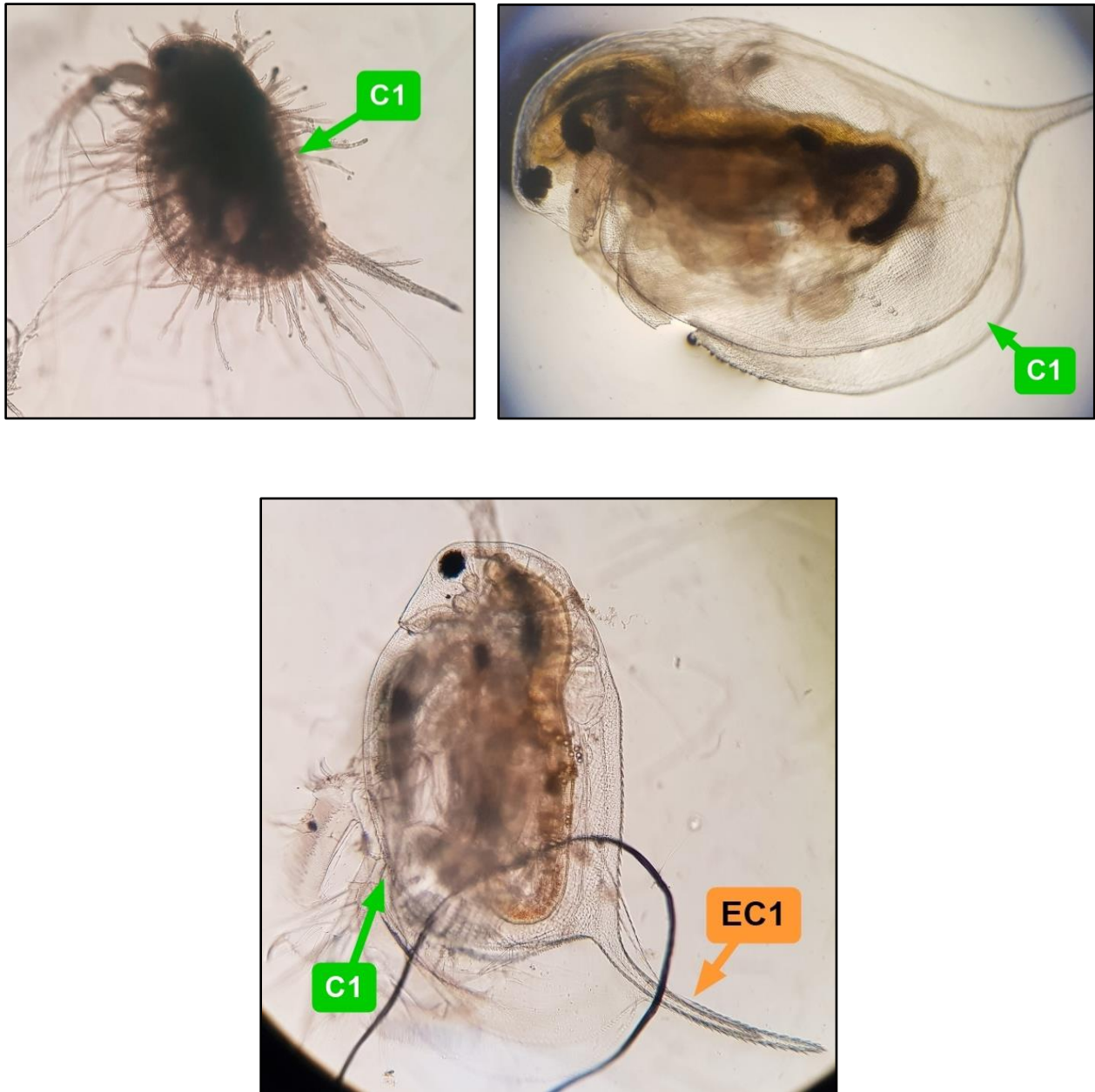


Figure 37 : Déformation et/ou destruction totale et/ou partielle des carapaces des néonates de *D. magna* (C1) ; - Un courbement plus ou moins important de l'épine caudale (EC2)

4 Etude comportementale

4.1 Suivi des Trajectoires de déplacement

Les trajectoires suivies par les daphnies témoins sont représentés dans la Figure (38).

Nous constatons qu'en l'absence de EE2, LNG et EE2/LNG, les femelles daphnies sont caractérisées selon une trajectoire rectiligne, un déplacement qui s'effectue le long d'une ligne droite, avec des mouvements plus ou moins ralentis à la fois horizontaux et verticaux grâce aux mouvements de leurs antennes secondaires.

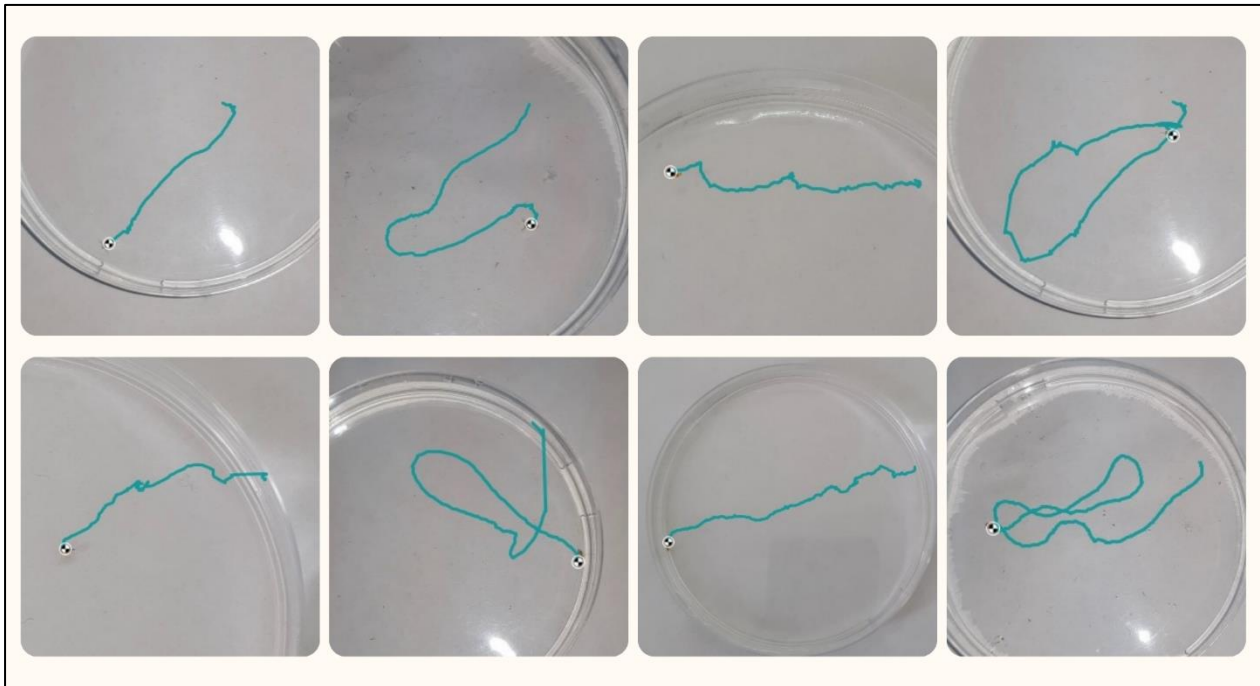


Figure 38 : Trajectoires enregistrées par les témoins de *D. magna*

Les Figures (39), (40) et (41), illustrent les trajectoires de *D. magna* après exposition à des concentrations croissantes d'EE2, LNG et leurs combinaisons EE2/LNG.

Nous constatons une perturbation significative du comportement natatoire de *D. magna*. Cette altération se manifeste par des mouvements totalement désordonnés et irréguliers chez les spécimens exposés.

La figure (39) met en évidence des déplacements de nages erratiques (saccadés et désorganisés) sous l'influence des hormones synthétiques EE2 et LNG, particulièrement aux plus fortes concentrations (5 - 25 $\mu\text{g/L}$) et (25 - 125 $\mu\text{g/L}$), respectivement.

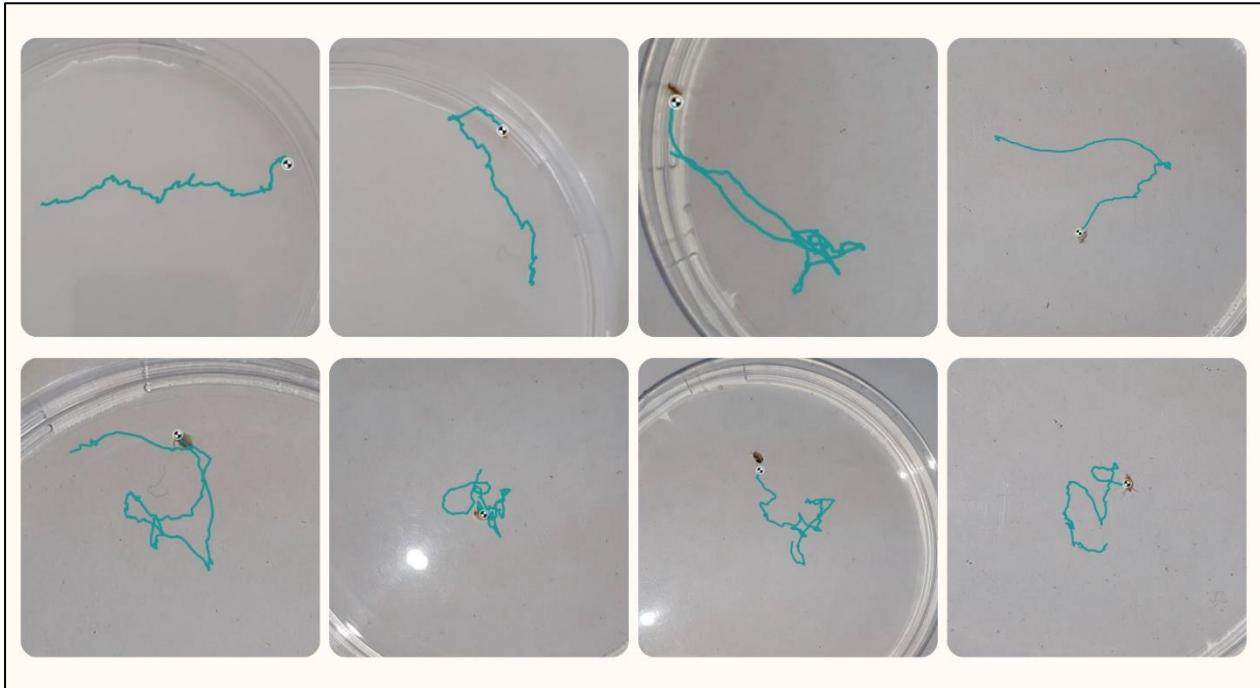


Figure 39 : Trajectoires de nages irrégulières enregistrées chez *D. magna* exposées aux concentrations d'EE2 (5 - 25 $\mu\text{g/L}$) et LNG (25 - 125 $\mu\text{g/L}$)

Ainsi, nous avons constaté des types de nages circulaires et rotatifs sur place (Figure 40A) et en zigzag (Figure 40B), observés significativement aux concentrations les plus faibles d'EE2 (0,1 – 0,5 $\mu\text{g/L}$), pareillement pour les concentrations les plus élevées (C3 et C4) de la combinaison EE2/LNG.

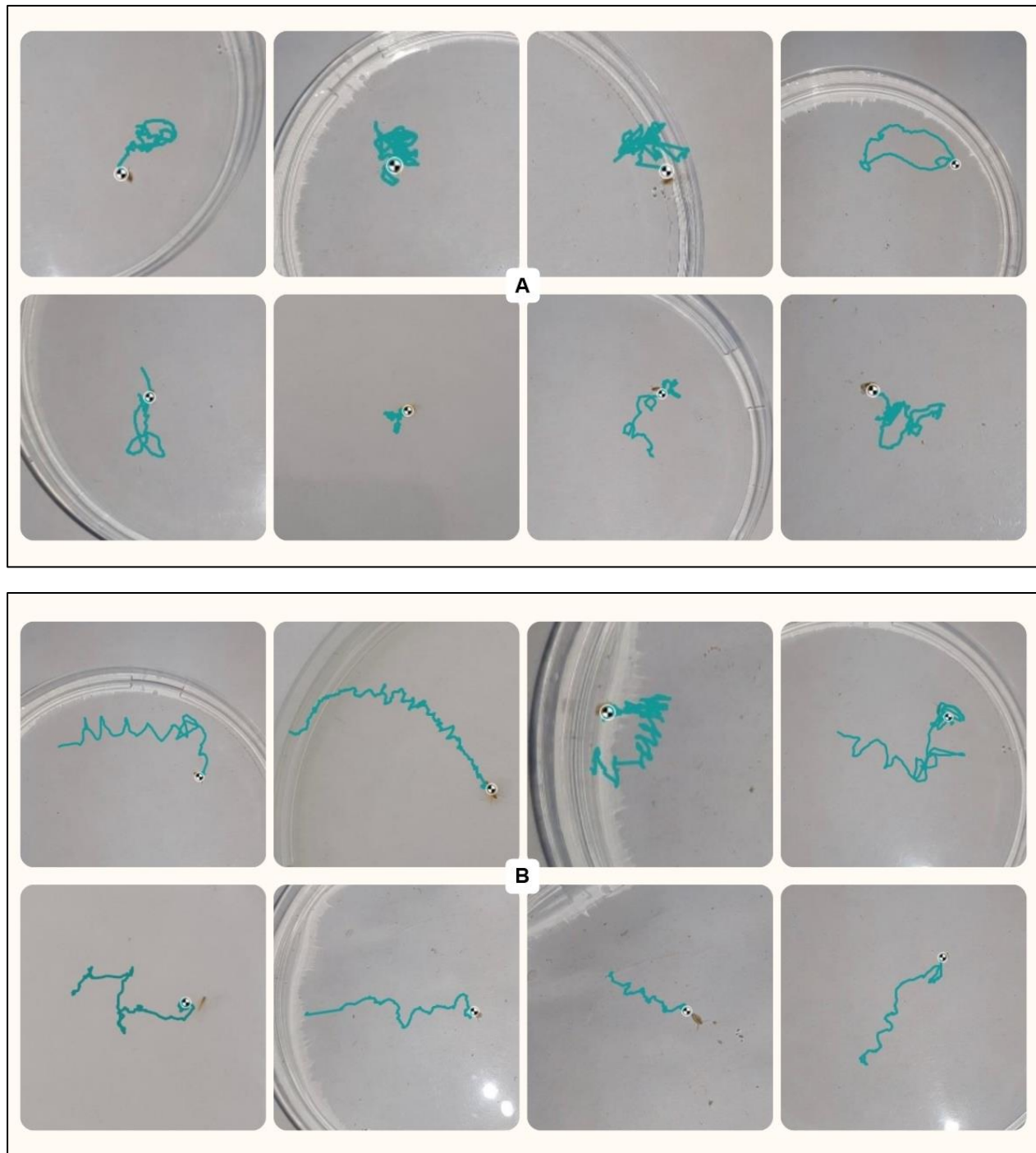


Figure 40 : Trajectoires de nages circulaires et rotatives (A) et en zigzag (B) chez *D. magna* exposées aux concentrations faibles d'EE2 (0,1 – 0,5 $\mu\text{g/L}$), et les plus élevées de la combinaison EE2/LNG (C3 et C4)

Les daphnies exposées à de faibles concentrations d'EE2, ainsi que celles de la combinaison EE2/LNG, manifestent une excitation accrue et adoptent des trajectoires en spirale (voir Figure 41), en particulier aux concentrations les plus faibles (0,1 – 0,5 µg/L), notamment aux concentrations (C1 - C2) de la combinaison EE2/LNG.



Figure 41 : Mouvements de nages en spirales notés chez *D. magna* exposées aux faibles concentrations (0,1 – 0,5 µg/L) et (C1 – C2) d'EE2 et la mixture EE2/LNG, respectivement

4.2 Calcul de la vitesse de nage

La figure (42) illustre les variations de la vitesse de nage de *D. magna* en fonction du temps et des concentrations croissantes des stéroïdes EE2 ou/et LNG.

❖ EE2 (Éthinylestradiol) :

- Durant les premières 24 h, la vitesse de nage des *D. magna* a augmenté de manière proportionnelle à la concentration d'EE2, atteignant une vitesse moyenne de (12,55 mm/s) avec les concentrations les plus faibles, ce qui indique une réponse positive à de faibles concentrations. Cependant, à la concentration la plus élevée (25 µg/L), une diminution significative ($P < 0,01$) de la vitesse est observée, avec une moyenne de (3,90 mm/s) par rapport au témoin, qui est de (8,02 mm/s).

- Après 48 heures, la vitesse a continué d'augmenter significativement ($P < 0.01$) à la concentration la plus faible ($0.1 \mu\text{g/L}$) touchant la vitesse moyenne de (13.14 mm/s), mais il y a eu une diminution nettement significative ($P < 0.01$) de (1.22 mm/s) à la concentration la plus élevée ($25 \mu\text{g/L}$) par rapport au témoin qui a baissé juste d'un cran à (7.47 mm/s).
- ❖ **LNG (Lévonorgestrel) :**
- Au cours des premières 24 heures, il y a eu une diminution non significative de la vitesse de nage avec l'augmentation de la concentration de LNG. Seule la concentration la plus élevée ($125 \mu\text{g/L}$) a montré une diminution significative ($P < 0.01$), touchant une vitesse moyenne de (4.14 mm/s) comparant au témoin.
 - Après 48 heures, la vitesse de nage a continué de chuter de manière significative ($P = 0.22, 0.24$ et <0.01), respectivement, avec l'augmentation des concentrations de LNG ($0.5, 2.5$ et $125 \mu\text{g/L}$) par rapport au témoin.
- ❖ **EE2/LNG (Combinaison d'Éthinylestradiol et de Lévonorgestrel) :**
- Au cours des premières 24 heures, la combinaison EE2/LNG a montré une augmentation significative ($P < 0.01$) de la vitesse moyenne à la plus faible concentration (C1) de (12.67 mm/s), et une augmentation non significative aux concentrations plus élevées (C2, C3, C4).
 - Après 48 heures, seule la concentration la plus faible (C1) a maintenu une augmentation de la vitesse moyenne de nage ($P = 0.12$) de (10.37 mm/s), tandis que les concentrations plus élevées (C2, C3, C4) ont entraîné une diminution de manière concentration-dépendante significativement ($P = 0.05, <0.01, <0.01$, respectivement), baissant jusqu'à (1.40 mm/s) à C4.

En résumé, le LNG semble avoir des effets différents sur la capacité natatoire de *D. magna*, avec des concentrations élevées entraînant généralement des effets négatifs traduites en baisses de la vitesse moyenne de nage. Tandis que EE2 seul, et la combinaison EE2/LNG montrent des résultats variables, avec une hausse notable de la vitesse de nage à faibles concentrations mais une baisse à des concentrations plus élevées, indiquant une possible interaction complexe entre les deux molécules.

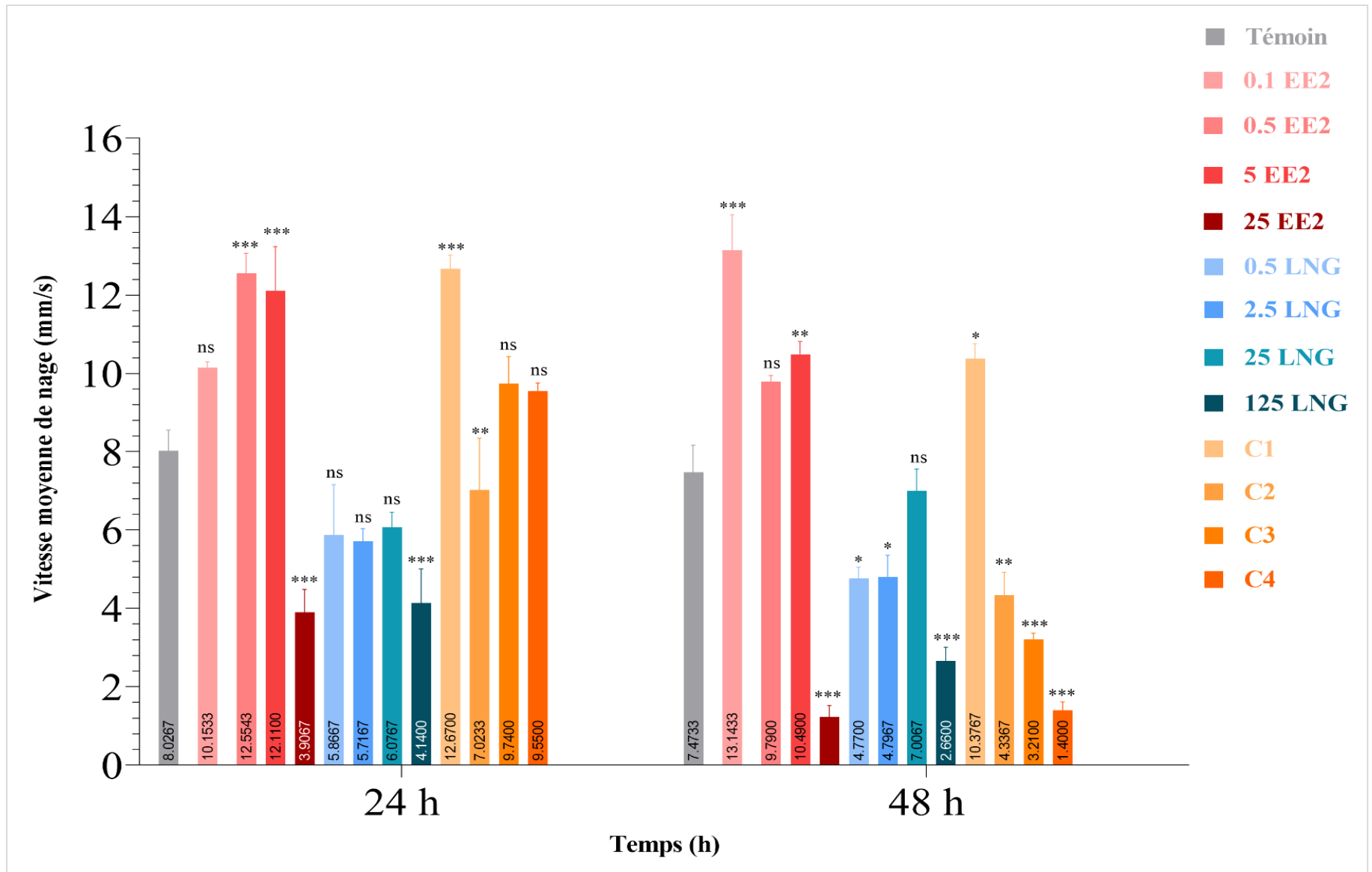


Figure 42 : Impact des concentrations croissantes d'EE2, LNG et EE2/LNG sur la vitesse de nage de *D. magna* après 24 et 48h.

5 Etude du stress oxydatif

5.1 Evolution du taux de glutathion (GSH)

La figure (43) illustre les variations du taux de GSH des daphnies adultes exposées aux concentrations croissantes d'EE2, de LNG et d'EE2/LNG après 48 h d'exposition.

Comparativement aux témoins ($0,96 \pm 0,14 \mu\text{mol/mg}$), une diminution nettement significative ($p < 0,05$) des niveaux de GSH est observée, inversement proportionnelle, à toutes les concentrations d'EE2 (Figure 43a). Cependant, la réduction des niveaux de GSH après le traitement au LNG est dépendante de la concentration et notablement significative ($p < 0,05$) à 25 et 125 $\mu\text{g/L}$ (Figure 43b). Ainsi, les résultats indiquent une diminution significative ($p < 0,05$) des niveaux de GSH dans tous les groupes traités par les hormones combinées (EE2/LNG), en particulier à C1 ($0,09 \mu\text{mol/mg}$) (Figure 43c).

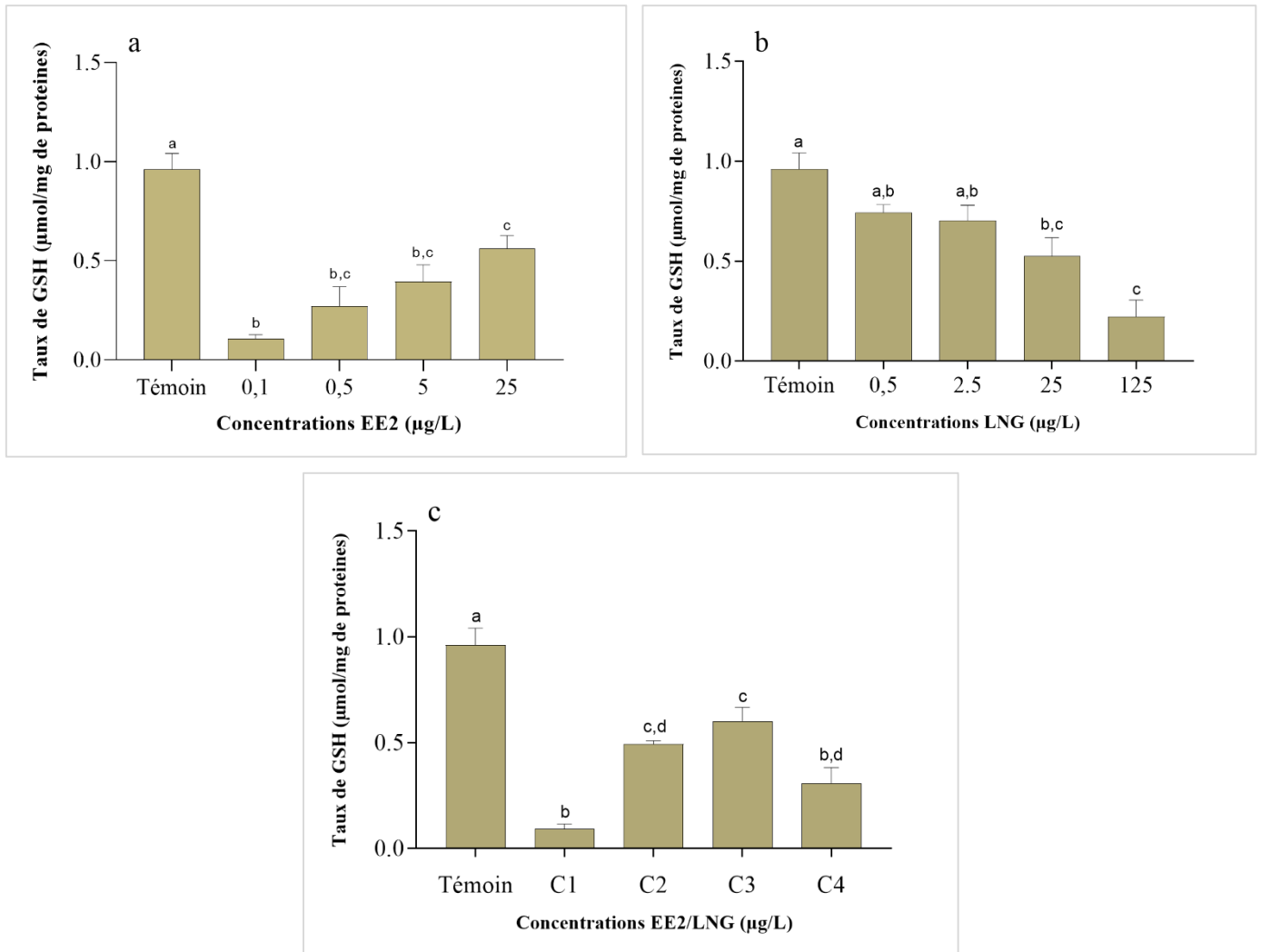


Figure 43 : Effet des concentrations croissantes d'EE2 (a), LNG (b) et EE2/LNG (c) sur le taux de GSH chez *D. magna*

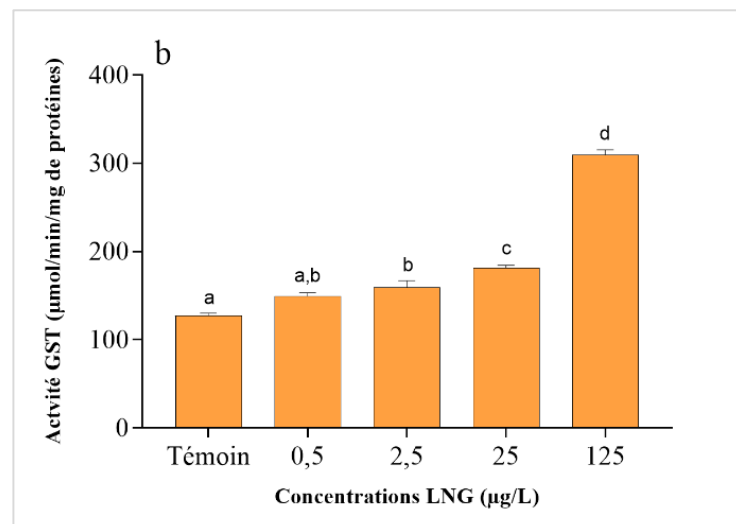
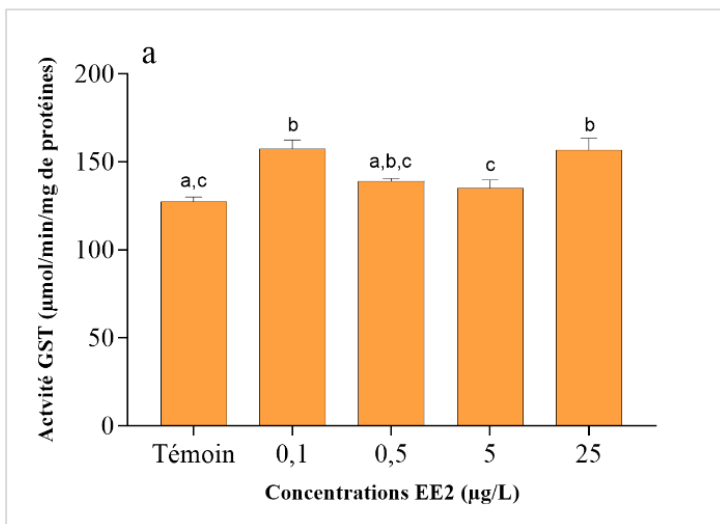
5.2 Evolution de l'activité (GST)

La figure (44) illustre les changements de l'activité GST chez *D. magna* traitées par les concentrations croissantes d'EE2, de LNG et d'EE2/LNG après 48 h d'exposition.

Le traitement par l'EE2 a montré une induction significative de l'activité GST ($p < 0,05$) par rapport au témoin (127.63 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), sauf pour 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$. Bien que les changements détectés n'étaient pas dépendants de la concentration, l'activité GST était significativement plus élevée dans les groupes exposés à 0,1 et 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ D'EE2 par rapport au témoin et aux autres concentrations (Fig. 44a).

Après 48 heures de traitement avec le LNG (Fig. 44b), l'induction significative ($p < 0,05$) à partir de 2,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ de l'activité GST est observée dans tous les groupes de manière concentration-dépendante par rapport au témoin, et significativement élevée à la concentration 125 $\mu\text{g}/\text{L}$ atteignant (309.89 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$).

L'exposition au mélange EE2/LNG a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité GST dans tous les groupes traités comparant au témoin. De plus, cette stimulation atteint son niveau le plus élevé par les plus faibles concentrations combinées C1 et C2 (370.80 et 335.67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$), respectivement (Fig. 44c).



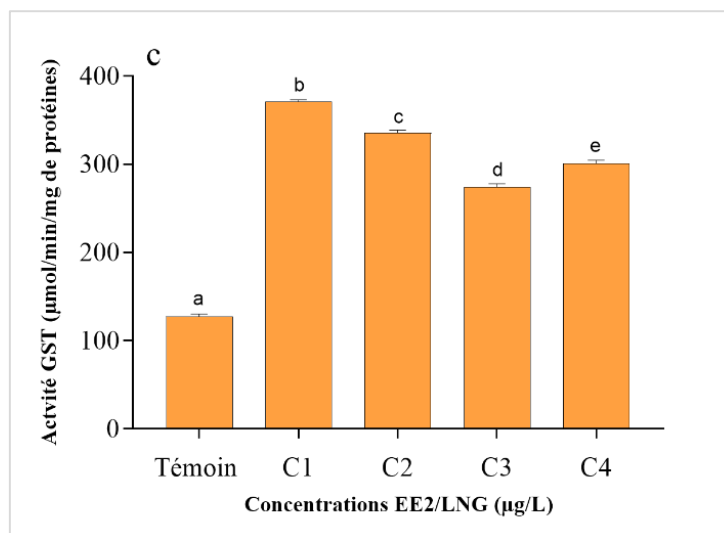


Figure 44 : Effet des concentrations croissantes d'EE2 (a), LNG (b) et EE2/LNG (c) sur l'activité GST chez *D. magna*

5.3 Evolution de l'activité Catalase (CAT)

La figure (45) illustre l'effet des concentrations croissantes d'EE2, de LNG et d'EE2/LNG sur l'activité CAT chez *D. magna* après 48 h d'exposition.

Nous constatons une diminution significative ($p < 0,05$) de l'activité CAT chez tous les groupes traités par l'EE2 par rapport au témoin ($20,70 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (Figure 45a).

Il y en a de même, pour les groupes traités par 2,5 et 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ de LNG, l'activité CAT est inhibée de manière significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin. Cependant, à 125 $\mu\text{g}/\text{L}$, l'activité CAT reste presque inchangée par rapport au témoin (Figure 45b).

Après traitement par les deux molécules combinées EE2/LNG, l'activité CAT diminue significativement chez tous les groupes par rapport au témoin ($p < 0,05$), en particulier avec C3, atteignant son niveau le plus bas d'activité ($0,75 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (Figure 45c).

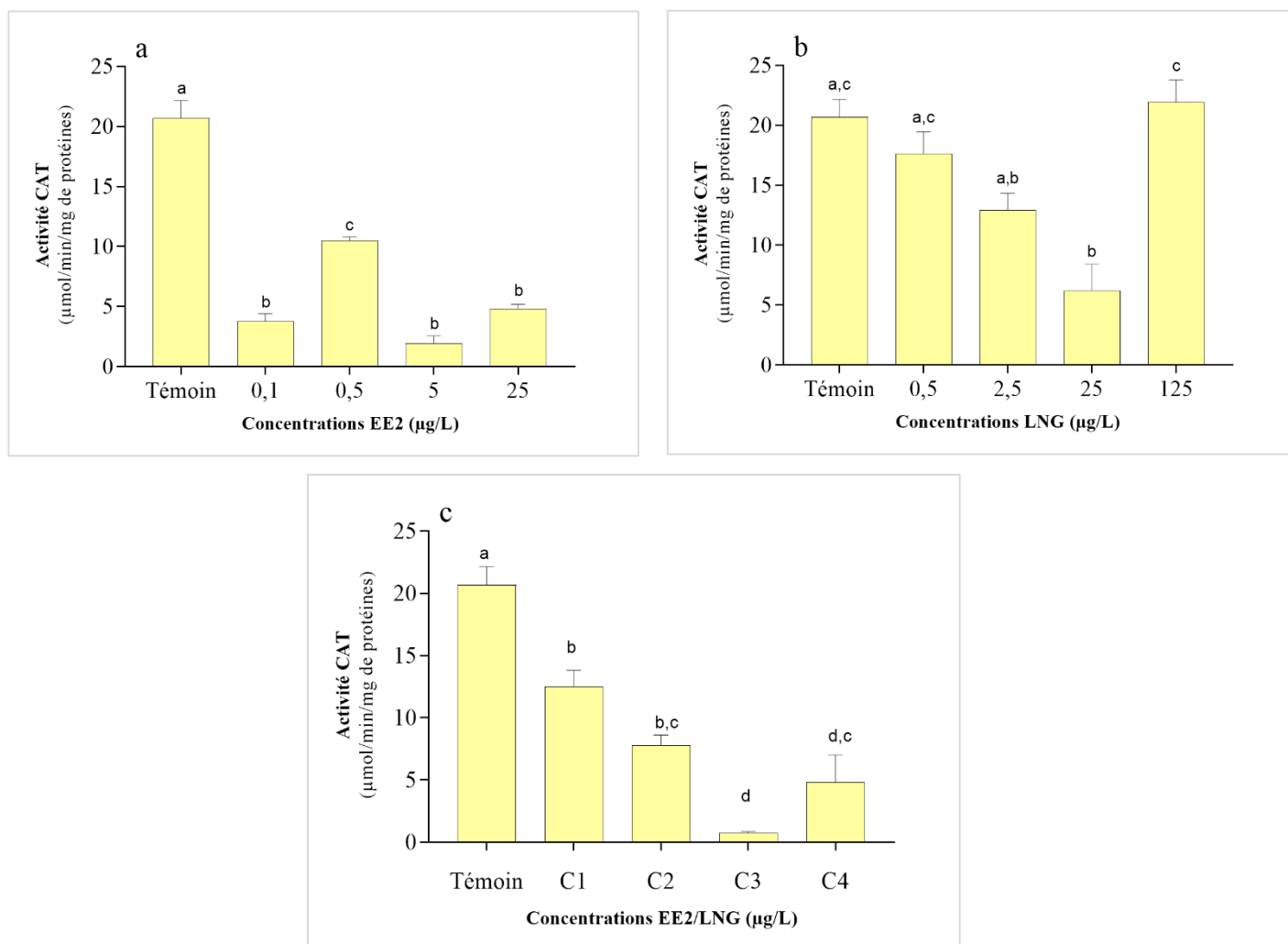


Figure 45 : Effet des concentrations croissantes d'EE2 (a), LNG (b) et EE2/LNG (c) sur l'activité CAT chez *D. magna*

5.4 Evolution du taux de malondialdéhyde (MDA)

La figure (46) montre l'effet d'EE2, de LNG et d'EE2/LNG sur les variations des niveaux de MDA chez *D. magna* après 48 heures d'exposition.

Après l'exposition de *D. magna* à l'EE2 pendant 48 h, tous les groupes ont montré une augmentation significative des niveaux de MDA ($p < 0,05$), à l'exception du groupe traité par 5 µg/L (figure 46a). Cependant, la teneur en MDA a augmenté significativement dans les groupes exposés aux concentrations les plus faibles d'EE2 (0,1 et 0,5 µg/L), atteignant respectivement (11,91 et 9,25 µmol/mg), par rapport aux autres concentrations les plus élevées et au témoin qui ne dépasse pas 5,96 µmol/mg.

Après un traitement de 48 heures au LNG, les niveaux de MDA ont augmenté dans tous les groupes de manière dépendante de la concentration ; cependant, l'augmentation était significative ($p < 0,05$) à partir de 2,5 $\mu\text{g/L}$ par rapport au témoin (Figure 46b).

La teneur en MDA a augmenté de manière significative ($p < 0,05$) dans tous les groupes traités par la combinaison EE2/LNG (Figure 46c), atteignant son niveau de stimulation maximal aux concentrations combinées C1 (11.91 $\mu\text{mol/mg}$), et C4 (12.97 $\mu\text{mol/mg}$).

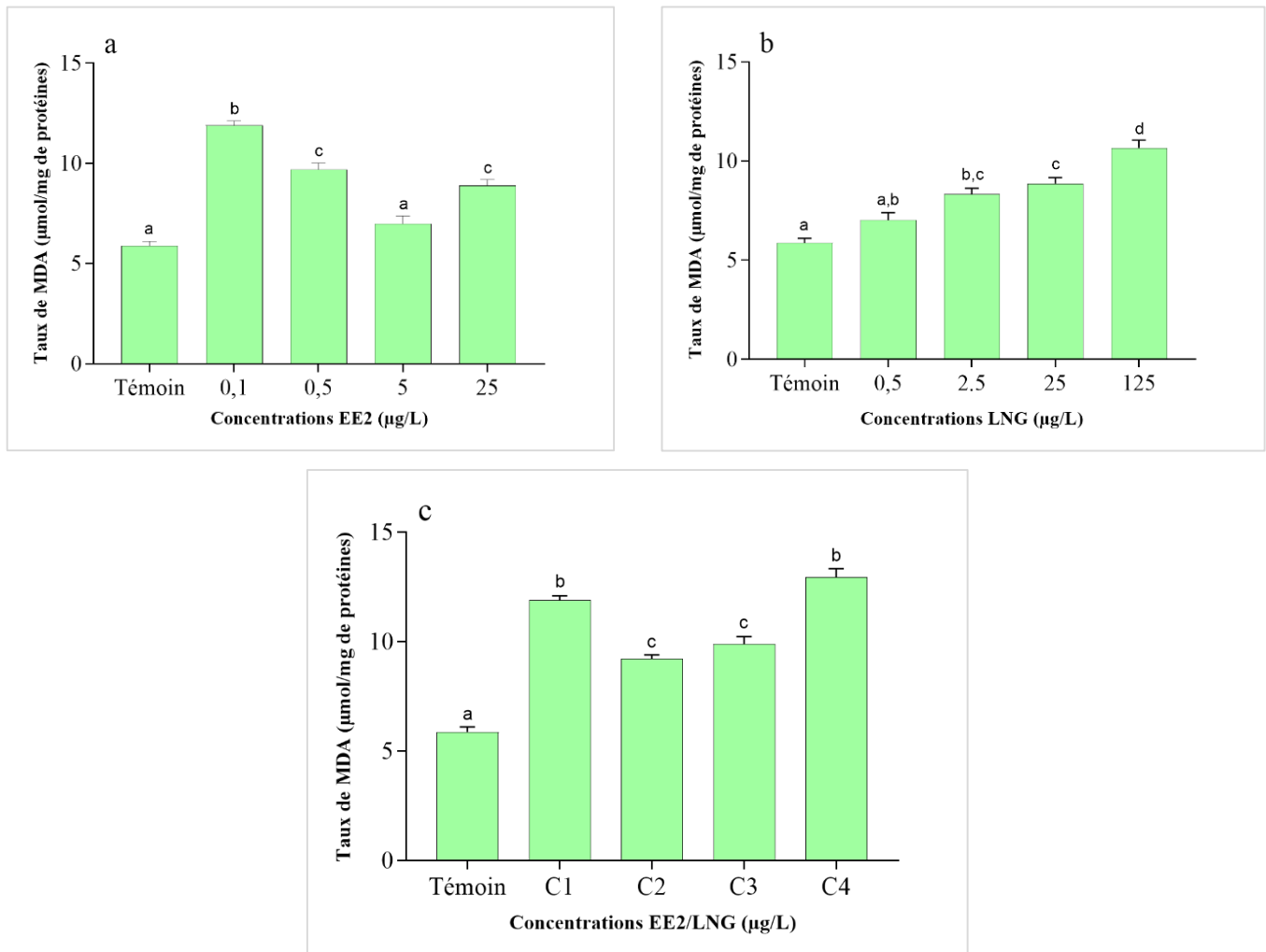


Figure 46 : Effet des concentrations croissantes d'EE2 (a), LNG (b) et EE2/LNG (c) sur les niveaux de MDA chez *D. magna*

6 Analyses statistiques

6.1 Analyse en composante principale (ACP)

Selon les résultats obtenus, il a été observé que la combinaison des hormones éthinylestradiol (EE2) et lévonorgestrel (LNG) a engendré l'impact le plus significatif sur divers paramètres évalués, en particulier aux concentrations combinées les plus faibles (C1) et les plus élevées (C4). Ces effets sont particulièrement marqués au niveau de l'immobilisation, considérée comme un aspect physiologique, ainsi que sur plusieurs antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques (CAT, GSH, GST, MDA), qui sont reconnus comme des biomarqueurs majeurs du stress oxydatif. Dans cette perspective, notre objectif est de valider la corrélation entre les altérations métaboliques observées dans le système antioxydant des daphnies adultes suite à l'exposition à ces hormones en mixtures, et leur incidence sur les caractéristiques physiologiques de leurs descendances, notamment en ce qui concerne l'immobilisation de ces dernières. Cette approche vise à éclairer d'avantage la compréhension des mécanismes sous-jacents aux effets de la mixture EE2/LNG sur la physiologie et la descendance des *D. magna*, mettant en lumière les implications potentielles de ces altérations métaboliques sur la santé globale des micro-organismes aquatiques.

Dans ce contexte, nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP) (Fig. 47), dans le but d'analyser les corrélations entre les variables présentées par 4 biomarqueurs de stress oxydatif enzymatique et non enzymatique (CAT, GSH, GST, MDA), et le pourcentage d'immobilisation mesuré dans les spécimens de *D. magna* appartenant à 5 lots expérimentaux (témoin et quatre concentrations combinées de (C = EE2/LNG). Cette analyse a révélé deux principaux gradients parmi les paramètres mesurés, avec une corrélation de 83,96 %, comme indiqué sur la figure (47). Le premier gradient est associé à une forte influence des traitements sur la GST, le MDA et le pourcentage d'immobilisation. Le premier axe décrit une corrélation de 70,18 % de la variance totale de ces trois paramètres. Le deuxième gradient est lié aux deux autres biomarqueurs, CAT et GSH, avec une corrélation de 13,78 % (Fig. 47A). Le biplot de l'ACP révèle deux paires claires de composants (Fig. 47B), montrant clairement l'impact de l'exposition aux concentrations les plus basses et les plus élevées de la mixture (C1 = 0,1/0,5 µg/L et C4 = 25/125 µg/L) sur les variables mesurées (MDA, GST et taux d'immobilisation), tandis que le deuxième est associé aux autres paramètres (CAT et GSH).

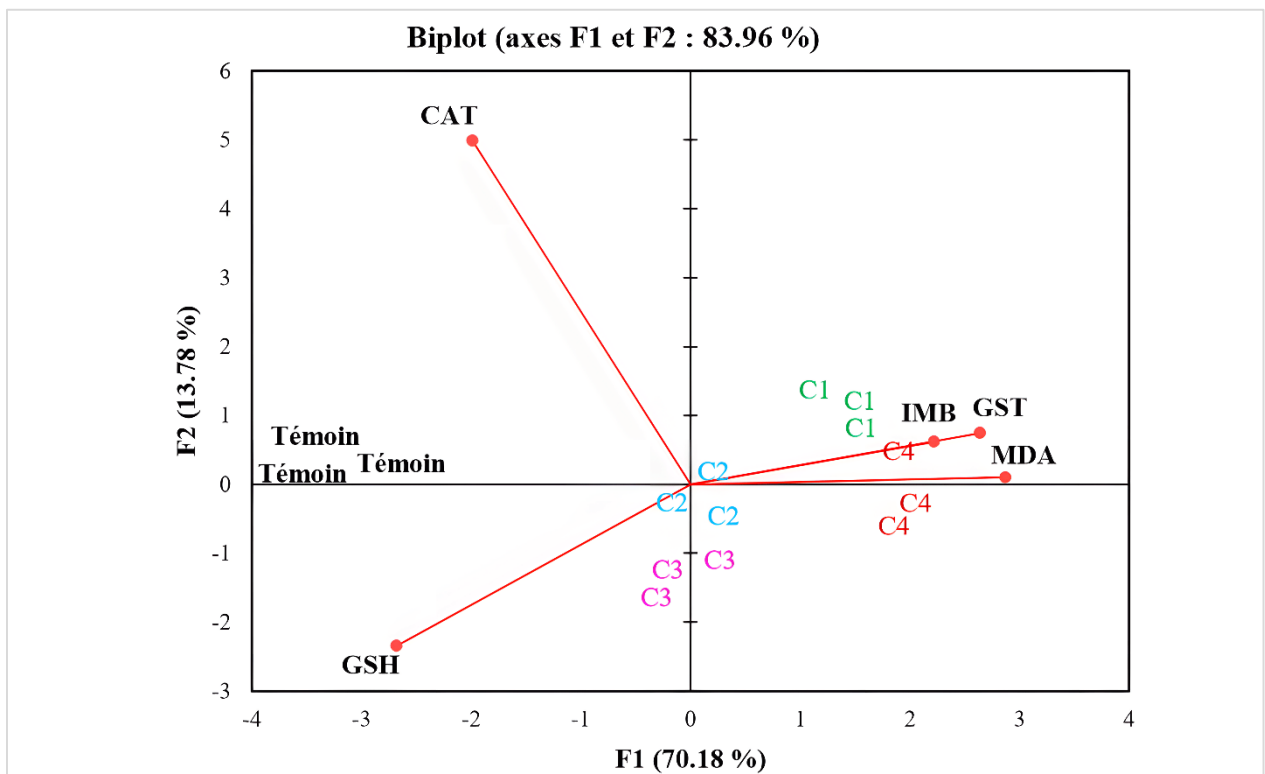
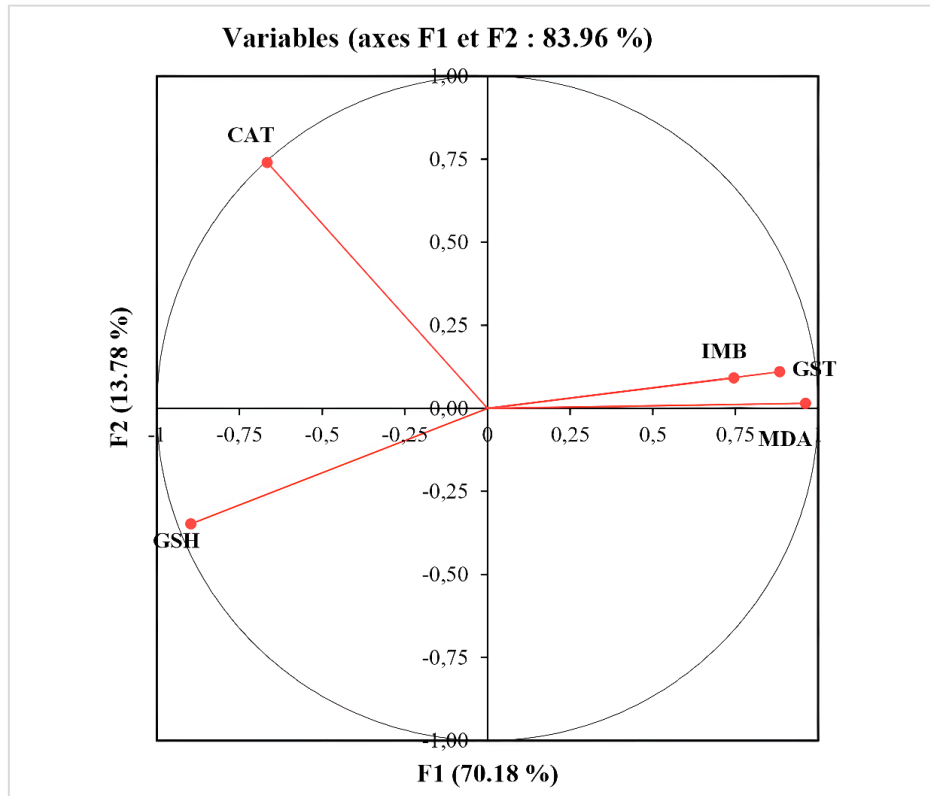


Figure 47 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur 04 variables de biomarqueurs du stress oxydatif et le taux d'immobilisation chez *D. magna* exposée aux concentrations croissantes de la mixture EE2/LNG. (A) Plan factoriel F1 (70,18 %), F2 (13,78 %) ; (B). Résultats du biplot, projection des variables du stress oxydatif et du taux

d'immobilisation dans les groupes des témoins et les groupes traités aux concentrations croissantes de la mixture EE2/LNG sur les deux premiers axes principaux.

Abréviations : C1 = 0,1/0,5 ; C2 = 0,5/2,5 ; C3 = 5/25 ; C4 = 25/125 µg/L ; IMB = taux d'immobilisation %.

IV. Discussion

La préoccupation croissante concernant l'impact néfaste des résidus de stéroïdes sexuels, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, sur les écosystèmes aquatiques suscite un débat significatif (Svigruha *et al.*, 2021), et les études existantes mettent en lumière la sensibilité de *Daphnia magna* aux stéroïdes synthétiques (Zheng *et al.*, 2020). Face à ce contexte, la présente recherche se positionne comme une contribution essentielle en se penchant sur la toxicité potentielle des stéroïdes éthinylestradiol (EE2) et lévonorgestrel (LNG), ainsi que de leur mélange, sur plusieurs paramètres utilisés en tant que biomarqueurs pour évaluer les effets de multiples facteurs perturbants sur *D. magna* : physiologiques, biochimiques, développements embryonnaires et comportementales, ainsi, sur le système de défense antioxydant.

Cette investigation « *in vitro* » vise à élargir notre compréhension des impacts spécifiques de ces composés sur une espèce clé dans les écosystèmes aquatiques, avec des implications potentielles pour la santé globale de ces environnements fragiles. En analysant de manière approfondie ces aspects, nous cherchons à apporter des éclairages substantiels pour orienter les stratégies de gestion environnementale et renforcer la protection des organismes aquatiques face à ces substances potentiellement délétères. En surveillant les points finaux, sublétaux et biochimiques chez *D. magna* qui reflètent les processus endocriniens, cette recherche contribue essentiellement à l'avancement de la compréhension des impacts des polluants émergents sur l'environnement. Il est donc important de noter cependant que cette étude ne se concentre pas sur l'identification des bases moléculaires des résultats obtenus. Nous admettons donc simplement que les stéroïdes sont présents dans les habitats naturels de *D. magna* et avons exploré la possibilité que leur présence puisse entraîner des altérations moléculaires, cellulaires et comportementales détectables sur ces micro-organismes.

Les hormones communément considérées comme des hormones sexuelles (œstrogènes et androgènes) chez les vertébrés ne semblent pas contrôler la différenciation sexuelle chez *D. magna* ; cependant, plusieurs hormones de vertébrés influent sur la reproduction et le développement de ces crustacés, faisant d'elle un outil potentiellement utile pour surveiller la présence de ces hormones ou de composés qui les imitent (Kashian et Dodson, 2004). Les daphnies sont largement reconnues en tant que bioindicateurs efficaces de la qualité des écosystèmes d'eau douce (Svigruha *et al.*, 2021). En raison de leur abondance et de leur facilité de manipulation, associées à leurs caractéristiques physiologiques sensibles, ces organismes

réagissent de manière diversifiée aux perturbations extérieures impactant leur habitat (Kovacevic *et al.*, 2019), ainsi, lorsqu'ils sont soumis à des conditions stressantes ou défavorables, les daphnies présentent une variété de réponses adaptatives au niveau physiologique (Luna *et al.*, 2015 ; Oropesa *et al.*, 2020 ; Rodrigues *et al.*, 2021 ; Yisa *et al.*, 2023). Par conséquent, si ces mécanismes adaptatifs ne parviennent pas à résister aux effets néfastes du stress, cela peut se traduire par des altérations physiologiques telles qu'un taux de mortalité accru, un ralentissement de la croissance et une diminution de la fécondité (Weis *et al.*, 2001). Ainsi, les réponses physiologiques de ces organismes constituent des indicateurs précoces sensibles aux perturbations environnementales, offrant des réponses pertinentes sur l'état global de leur santé (Moumeni, 2016).

Cependant, aucun mécanisme précis pour l'immobilisation des juvéniles de *D. magna* n'a été étudié, seules les hypothèses telles que celle de Goto et Hiromi, (2003) sur l'incapacité des jeunes *D. magna* à capturer de la nourriture ont été avancées. Nous proposons que cette incapacité soit probablement due à l'impact de ces perturbateurs endocriniens sur l'activité de l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans de nombreux processus physiologiques, notamment la contraction musculaire, la régulation du rythme cardiaque et la fonction cognitive de *D. magna* (Liu *et al.*, 2020).

Un débat persiste sur l'impact potentiel des résidus de stéroïdes sexuels, naturels ou synthétiques, présents dans l'environnement sur le système neuroendocrinien et les processus physiologiques des espèces invertébrées (Luna *et al.*, 2015 ; Fodor *et al.*, 2020). Contrairement aux vertébrés, au moins deux homologues des enzymes catalysant la voie de biosynthèse des stéroïdes classiques n'ont pas encore été identifiés dans les génomes des arthropodes (Markov *et al.*, 2017). Cependant, en ce qui concerne la perception de la progestérone, des séquences homologues aux récepteurs membranaires de la progestérone gamma (mPR γ) et au composant 1 du récepteur membranaire de la progestérone (PGMRC1) ont été découvertes chez les crustacés (Ren *et al.*, 2019). Bien que la capacité de liaison à la progestérone de ces molécules n'ait pas été étudiée, elles pourraient constituer une cible potentielle dans la voie des changements induits par les progestatifs, et les effets pourraient être médiés par une voie non génomique (Svighruha *et al.*, 2021). Cela inclurait l'activation de seconds messagers et diverses cascades de protéines kinases pouvant éventuellement conduire à des changements indirects dans l'expression génique en raison de la phosphorylation des facteurs de transcription. Un mécanisme d'action similaire a été suggéré pour les altérations induites par les œstrogènes chez les mollusques (Tran *et al.*, 2019). En se basant sur les réponses moléculaires, cellulaires et

comportementales (Luna *et al.*, 2015 ; Torres *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2020), il semble que *D. magna* soit sensible aux contaminations par les stéroïdes sexuels qui se produisent dans leur habitat naturel ; confirmant ainsi nos résultats à travers leurs expositions aux hormones EE2, LNG et leur mixture.

Malgré la détection des stéroïdes dans les environnements d'eau douce et marins, à notre connaissance, seulement des hypothèses, mais aucune étude n'a été publiée sur l'évaluation de biomarqueurs spécifiques (liés au mode d'action spécifique) qui pourraient montrer les effets exercés par ces hormones synthétiques sur *D. magna*. Cependant, en raison des similitudes structurales avec l'ecdysone (une hormone stéroïde intervenant dans le processus de la mue des crustacés et dans le contrôle de leur reproduction (Kato *et al.*, 2007) ; il a été suggéré que les stéroïdes vertébrés pourraient éventuellement interférer avec le système endocrinien des invertébrés, tels que les crustacés, en compétition avec l'ecdysone au niveau du récepteur des écdystéroïdes (EcR), en influençant sa sécrétion et sa libération, ou en limitant sa transformation en 20-hydroxyecdysone (20HE) (Maes, 2011). Bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore bien compris, certaines relations potentielles ont déjà été envisagées entre les hormones vertébrées et l'inhibition de la mue, le retard de croissance et les anomalies de reproduction chez les invertébrés (Maes 2011 ; Rodrigues *et al.*, 2021). Par ailleurs, Svigruha *et al.* (2021) suggèrent que le possible site d'action pourrait, par exemple, se produire via les mPR γ identifiés chez les daphnies ou des réponses non médiées par les hormones/interactions non spécifiques (par exemple, avec des récepteurs multifonctionnels anciens ou des récepteurs pour d'autres composés).

C'est dans ce contexte que la première partie de notre étude s'est concentrée sur des paramètres physiologiques, notamment l'évaluation de la toxicité aiguë de ces stéroïdes en déterminant la concentration inhibitrice (CI₅₀). Parallèlement, la surveillance d'un paramètre physiologique spécifique, à savoir la fréquence cardiaque (pulsations cardiaques), est couramment adoptée en tant que biomarqueur de stress chez *D. magna* (Campbell *et al.*, 2004).

Les espèces aquatiques à leurs premiers stades embryonnaires de développement sont plus vulnérables en raison de leur moindre tolérance aux œstrogènes que les adultes lorsqu'elles sont exposées de manière aiguë, et sont privilégiées pour évaluer la santé des écosystèmes aquatiques, comme souligné par (Liu *et al.*, 2012 ; Aris *et al.*, 2014 ; Rodrigues *et al.*, 2021). À cet égard, la toxicité aiguë des différentes concentrations d'EE2, LNG et leurs mixtures, ont été évaluées sur l'immobilisation des juvéniles de *D. magna* afin d'estimer la concentration d'inhibition (IC₅₀) et leurs intervalles de confiance à 95 % à 24 et 48 h d'exposition.

Nos résultats montrent que le pourcentage d'immobilisation des juvéniles suivent un schéma dépendant de la concentration, diminuant pour les concentrations minimales d'EE2 ($\leq 5 \mu\text{g/L}$) ; les résultats observés sont en accord avec Razekenari *et al.* (2023), qui ont constaté que le taux de survie des crustacés juvéniles *Neocaridina davidi* est stimulé de manière significative par des concentrations de 0,02 et 0,2 $\mu\text{g/L}$ d'EE2 ; il est donc possible que l'EE2 soit métabolisé et assimilé comme un nutriment plutôt que comme un xénobiotique nocif, permettant aux cellules de maintenir leurs concentrations intracellulaires spécifiques de xénobiotiques en équilibre (Moumeni *et al.*, 2016). De même, *Acartia clausi* a présenté une significative réduction du succès d'éclosion à des concentrations faibles d'EE2 (0,05 et 5 $\mu\text{g/L}$) selon Djebbi *et al.* (2022). Dans le même sens, Castro *et al.* (2014) ont signalé la toxicité de quatre médicaments (éthinyloestradiol, fluoxétine, ibuprofène et diclofénac) pour *Daphnia similis* à de faibles concentrations. **En revanche, les juvéniles exposés à des concentrations plus élevées dépassant 25 $\mu\text{g/L}$ d'EE2 pendant 24 h étaient immobiles, et tous sont morts après 48 h**, ce qui peut s'expliquer par la difficulté inhérente à attraper la nourriture, entraînant une augmentation de la mortalité (Goto et Hiromi, 2003). Ainsi, l'EE2 a induit une mortalité accrue des juvéniles de *Ceriodaphnia reticulata* nouvellement éclos à des concentrations d'EE2 supérieures à 200 $\mu\text{g/L}$, comme indiqué par Torres *et al.* (2015).

D'autres observations rapportées par Jobling *et al.* (2003), indiquent que pendant la période de traitement à l'EE2, des espèces de poissons telles que le *Cyprinus carpio* et l'*Oncorhynchus mykiss* manifestent une survie sans mortalité ultérieure lors des études portant sur la performance de reproduction, cependant, des impacts sont notés sur la croissance, avec une inhibition observée chez les poissons mâles à une concentration de 10 ng/L et chez les poissons femelles à 100 ng/L après une exposition de 3 semaines. D'autre part, Razekenari *et al.* (2023) ont pu observer des effets inhibiteurs potentiels à des concentrations plus élevées (2, 20 et 200 $\mu\text{g/L}$) sur les performances de croissance d'un crustacé, *Neocaridina davidi*.

De plus, *D. magna* était plus sensible, avec une CI_{50} de 20,61 $\mu\text{g/L}$ après 24 h et 1,66 $\mu\text{g/L}$ après 48 h d'exposition, ce qui explique pourquoi la mobilité a été d'avantage impactée avec le temps, par rapport à Jaser *et al.* (2003), qui ont rapporté que la CE_{50} (24 h) pour *Ceriodaphnia reticulata* est d'environ 1814 $\mu\text{g/L}$ d'EE2.

D'autre part, la présente étude a révélé que l'immobilisation des juvéniles présentait un schéma dépendant des concentrations croissantes lors de l'exposition à (0,5, 2,5, 25 et 125 $\mu\text{g/L}$) de LNG, et nous avons établi que ce progestatif était moins toxique que l'EE2 puisque la CI_{50} était de plus en plus élevée, soit 117,34 et 2,23 $\mu\text{g/L}$ après 24 et 48 h,

respectivement. Peu d'études ont été entretenues concernant la toxicité des progestatifs synthétiques sur les invertébrés. D'après Oropesa *et al.* (2020), le test de toxicité aiguë a révélé que l'exposition au LNG à des concentrations de LNG entre 10 et 313 µg/L entraînait une immobilisation de 30 % des jeunes daphnies, et ont provoqué une certaine mortalité des juvéniles. Ainsi, des résultats similaires ont été obtenus chez *D. magna* exposés à la norethindrone (un médicament contraceptif renfermant une hormone progestative similaire à LNG) (Goto et Hiromi, 2003) ; les auteurs ont expliqué que l'immobilisation était affectée par la réduction de la capture de la nourriture.

Dans des situations réelles, les organismes aquatiques sont souvent exposés à des mélanges de médicaments qui, d'un point de vue toxicologique, peuvent interagir entre eux. Cela devient particulièrement pertinent dans le cas d'autres progestatifs et œstrogènes, étant donné qu'ils ont démontré une capacité d'interaction sur la croissance et/ou la reproduction (Oropesa *et al.*, 2020).

La combinaison d'EE2 et du LNG dans les contraceptifs hormonaux combinés vise à fournir une efficacité contraceptive optimale en agissant donc de manière synergique pour inhiber l'ovulation en ciblant les récepteurs de chacune des hormones (Goto et Hiromi, 2003).

Effectivement, la combinaison des deux stéroïdes était plus nocive que leur effet isolé, où les concentrations les plus faibles étaient les plus toxiques, et nous soutenons que l'EE2 a un potentiel de toxicité plus élevé que le LNG, car l'immobilisation lors de l'exposition au mélange était de la même manière que l'EE2 ; ce résultat était similaire à ceux étudiés par García-García *et al.* (2014), qui ont montré que la croissance de la population d'*Anuraeopsis fissa* était affectée aux concentrations les plus basses d'hormones, soit 31,25/6,25 puis 62,5/12,5 µg/L de la mixture LNG/EE2 respectivement après six jours. Récemment, certaines études ont montré que les combinaisons d'hormones stéroïdiennes peuvent inhiber la reproduction de diverses espèces d'invertébrés aquatiques (en particulier les mollusques et les crustacés), même lorsque les concentrations des hormones individuelles sont trop faibles pour avoir un effet individuel (Ojogoro *et al.*, 2021). De plus, Goto et Hiromi, (2003) ont révélé que, tandis que la norethindrone (progestatif contraceptif) seule n'affectait pas la reproduction de *D. magna*, l'EE2 à 0,1 µg/L et une combinaison d'EE2 et de norethindrone à 0,006 ou 0,094 µg/L réduisaient drastiquement le nombre de progénitures.

Les études menées sur *D. magna* ont révélé que la fréquence cardiaque de ces organismes peut être utilisée comme un paramètre physiologique pour évaluer l'effet toxique de substances chimiques et médicaments (Campbell *et al.*, 2004 ; Bownik *et al.*, 2015 ; Tkaczyk

et al., 2021). Un bon équilibre du rythme cardiaque peut améliorer le flux d'hémolymphe (liquide circulatoire des crustacés dont le rôle est analogue au sang et au liquide interstitiel des vertébrés), favoriser la distribution des nutriments et améliorer l'échange gazeux en maximisant l'apport d'oxygène (Bownik *et al.*, 2015 ; Pan *et al.*, 2017).

Nos recherches ont montré que ces hormones synthétiques séparément affectent la fréquence cardiaque des daphnies, avec des concentrations plus faibles de LNG stimulant légèrement la fréquence cardiaque, tandis que des concentrations plus élevées induisent l'effet inverse après 24 et 48 h. Cette diminution peut être liée à l'atteinte des mécanismes similaires à ceux observés dans le cœur des mammifères, notamment la myogenèse cardiaque (formation des tissus musculaires du cœur) et la présence de la Na⁺, K⁺-ATPase dans le cœur des crustacés (Tkaczyk *et al.*, 2021). Par conséquent, les dysfonctionnements enzymatiques de ces derniers, en réponse au stress oxydatif pourraient contribuer à une inhibition de l'activité cardiaque (Fan *et al.*, 2012). En outre, EE2 a montré une stimulation significative qu'à la plus forte concentration (25 µg/l) après 24 h, avec une légère augmentation après 48 h, suggérant une possible adaptation dans le temps (Fekete-kertész *et al.*, 2016).

Les résultats suggèrent que certaines hormones compatibles peuvent influencer la fréquence cardiaque chez les invertébrés, ouvrant la voie à l'utilisation du cœur de *D. magna* pour le test de médicaments destinés aux humains (Tkaczyk *et al.*, 2021), suggérant un potentiel test de toxicité aiguë pertinent pour évaluer l'impact écologique des micropolluants et comme système d'alerte précoce pour la surveillance de la qualité de l'eau (Fekete-kertész *et al.*, 2016).

Il est généralement admis que l'exposition prolongée et intense aux xénobiotiques constitue une source majeure de production excessive de radicaux oxygénés (ROS) et d'entités radicalaires (Moumeni, 2016). Ces espèces réactives sont connues pour induire le stress oxydatif, entraînant des dommages aux composants cellulaires (Yisa *et al.*, 2023). Par conséquent, les macromolécules biologiques, en particulier les protéines et les lipides, essentiels au métabolisme énergétique, sont les cibles privilégiées de ces radicaux libres (Abdel-Daim *et al.*, 2015) ; et sont souvent utilisées pour évaluer l'oxydation des protéines (Cappelletti *et al.*, 2021).

Les résultats de notre étude montrent que la quantité de protéines a significativement augmenté uniquement avec la plus faible concentration d'EE2 (0,1 µg/L). Le mécanisme d'EE2 chez les crustacés reste mal compris, cependant, il a été établi que *D. magna* manque des récepteurs d'œstrogènes caractéristiques des mammifères (Kovacevic *et al.*, 2019) ; alors que

les mêmes chercheurs ont constaté une augmentation notable des quantités de 13 acides aminés et une réduction remarquable du glucose chez *D. magna* après une exposition à 1 mg/L d'EE2 dans leur expérience. Contrairement aux autres concentrations plus élevées qui ont eu un léger effet opposé mais non significatif, appelé « effet d'hormèse » (une réponse de stimulation des défenses biologiques, généralement favorable, à des expositions de faibles doses de toxines ou d'autres agents ou phénomènes générateurs de stress), par conséquent, les concentrations de 0,5 et 5 µg/L d'EE2 ont augmenté les niveaux de protéines par rapport à la concentration la plus élevée de 25 µg/L, qui était très proche de celle du témoin. Une augmentation telle que la teneur en protéines dans les organismes aquatiques stressés peut être attribuée à leur implication dans la défense cellulaire contre les dommages oxydatifs (Tkaczyk *et al.*, 2021). Une observation similaire selon Belhadj *et al.* (2017) corrobore avec nos résultats, qui rapporte que *Dunaliella salina* a montré une augmentation significative des niveaux totaux de protéines lorsqu'elle a été exposée aux concentrations les plus faibles d'EE2 (0,1 et 1 µg/L) ; de plus, la teneur en protéines était plus élevée dans le groupe de concentration de 0,1 µg/L que dans celui de 1 µg/L, ce qui est conforme à nos résultats. Les niveaux élevés du métabolite primaire observés à des concentrations plus élevées pourraient être attribués à la réaction de l'organisme à des conditions environnementales défavorables. Cette réponse implique la dégradation des protéines pour produire des acides aminés, qui sont ensuite utilisés pour produire un nombre limité de protéines de stress, selon Rasool *et al.* (2013). Une autre étude concorde avec nos résultats, où la quantité totale de protéines du juvénile de poisson-chat *Pelteobagrus fulvidraco* a augmenté avec l'augmentation des niveaux d'exposition à l'EE2 (0, 0,1 et 1 ng/L) (Chen *et al.*, 2017). D'autres observations sur les changements dans le métabolisme des protéines provoqués par l'EE2 chez *Oncorhynchus mykiss* ont été rapportées par Gagné *et al.* (2006), notamment l'induction d'une protéine similaire à la vitellogénine (Segner *et al.*, 2003). Cette induction protéique pourrait être associée à l'activation du processus de détoxification, marquée par l'induction d'enzymes et de molécules antioxydantes de nature protéique, autrement dit, elle pourrait stimuler la biosynthèse de protéines spécifiques impliquées dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif (Moumeni, 2016).

Malgré la disponibilité de données sur l'impact des œstrogènes sur *D. magna*, la capacité à tolérer les concentrations de la progestérone et les altérations des mécanismes moléculaires et cellulaires résultant de l'exposition aux progestatifs sur des périodes courtes ou prolongées restent inexplorées (Svigruha *et al.*, 2021). Cependant, **notre expérience a démontré l'impact du progestatif LNG, sur les niveaux de protéines, qui a entraîné une réduction significative**

à près de 50% du témoin pour toutes les concentrations utilisées, sauf pour la plus élevée (125 µg/L). Les résultats de Contardo-Jara *et al.* (2011) concordent avec ce que nous avons remarqué, qui montre une augmentation des niveaux d'ARNm hsp70 dans les branchies des moules après quatre jours d'exposition à des concentrations de LNG similaires aux nôtres, ce qui suggère fortement un endommagement des protéines.

Le mélange de ces deux stéroïdes LNG/EE2 a montré une augmentation significative des niveaux de protéines, surtout avec les concentrations combinées les plus faibles (C1 = 0,1/0,5 ; C2 = 0,5/2,5 µg/L), comparativement aux concentrations combinées les plus élevées. À notre connaissance, aucune information n'est disponible sur les effets de EE2 et du LNG appliqué en mélange à des concentrations écologiquement pertinentes sur les niveaux de protéines et de lipides chez les invertébrés. Cependant, Furuhaugen *et al.* (2014) montrent que le mélange LNG avec deux autres médicaments (Miconazole et Prométhazine) a induit des niveaux élevés de synthèse d'ARN et de protéines chez *D. magna* ; et ont spéculé que cette augmentation observée est une conséquence de la production accrue de protéines de choc thermique (HSP) (de l'anglais "Heat Shock Proteins") qui appartiennent à une famille de protéines bien conservées sur le plan évolutif, présentes chez tous les organismes vivants (Feder et Hofmann, 1999), où leur fonction est de protéger les protéines et les structures cellulaires importantes contre la dénaturation lors de situations de stress.

Nous sommes donc les premiers à examiner et à fournir des résultats sur les profils biochimiques chez *D. magna* exposée à la mixture EE2/LNG, faisant de notre étude une contribution pionnière dans ce domaine.

Le métabolisme des lipides est fortement lié à la reproduction chez *D. magna* (Fuertes *et al.*, 2020). L'objectif de cette étude est de tester si les résidus des stéroïdes mentionnés ci-dessus ont perturbé le profil lipidique chez *D. magna*, en les exposants à des concentrations environnementales pertinentes, et en tenant compte du fait que la peroxydation lipidique indique des dommages oxydatifs aux membranes lipidiques causés par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Nunes *et al.*, 2017).

En ce qui concerne nos résultats, **on observe une augmentation significative dans la quantité des lipides à la concentration la plus basse de 0,1 µg/L, ainsi qu'une légère diminution significative avec 5 µg/L d'EE2.** Les résultats de Rodriguez *et al.* (2021) indiquent que l'exposition de *D. magna* aux concentrations d'EE2 a des impacts notables sur les paramètres biochimiques, le stress oxydatif, la peroxydation lipidique et la génotoxicité. Par

conséquent, des concentrations <100 µg/L d'EE2 ont entraîné une augmentation des niveaux de TBARS, suggérant un stress oxydatif chez *D. magna*, pouvant causer des lésions tissulaires en initiant la peroxydation lipidique, soulignent Rodriguez *et al.* (2021). (Maranho *et al.*, 2014) affirme d'ailleurs, qu'une lipo-peroxydation a été observée chez l'invertébré aquatique *Hediste diversicolor* après une exposition à l'EE2 (0,01 ng/g ; 14 jours). Cela pourrait être attribué aux sous-produits du métabolisme de phase I et à une activation insuffisante des réponses antioxydantes, comme suggéré par Rodriguez *et al.* (2021).

Bien que les altérations lipidiques n'aient pas montré de signification statistique concernant **l'exposition aux concentrations croissantes de LNG, une augmentation notable a été exclusivement détectée à la concentration maximale de 125 µg/L, contrairement aux concentrations plus faibles.** Cette observation suggère un effet dépendant de la concentration du LNG sur les lipides, mais aucune information concrète n'est disponible sur l'effet du LNG sur le profil lipidique. De Coen et Janssen, (2003) expliquent les changements dans les réserves lipidiques de *D. magna* par la mobilisation de ces réserves par l'organisme pour maintenir son homéostasie pendant des conditions de stress.

À notre connaissance, aucune information n'a été rapportée sur les effets du mélange EE2/LNG sur les niveaux lipidiques chez les invertébrés, uniquement lorsqu'ils sont utilisés individuellement. Par ailleurs, **nous notons une déplétion significative dans le contenu lipidique de tous les groupes exposés aux hormones synthétiques combinées EE2/LNG par rapport au témoin, et s'est révélé plus prononcé que l'effet individuel des molécules isolées.** Cette observation suggère la présence potentielle d'un risque additif ou synergique (Goto et Hiromi, 2003).

Les objectifs de cette étude étaient de caractériser la différenciation sexuelle chez les daphnies mâles et femelles *D. magna* et d'évaluer si l'exposition à des perturbateurs endocriniens présumés pouvait perturber le développement des caractères sexuels. Les hormones stéroïdiennes peuvent exercer leur action à des concentrations extrêmement faibles (action hormétique), de l'ordre du ng/L, provoquant des perturbations de la reproduction chez différentes espèces de poissons et d'autres crustacés aquatiques (Desbrow *et al.*, 1998). De plus, l'exposition aux stéroïdes environnementaux a été montrée pour affecter la production d'œufs, suggérant que ces invertébrés sont sensibles aux effets des œstrogènes (Oehlmann *et al.*, 2000). Chez les daphnies, les œufs parthénogénétiques se différencient en fonction des conditions environnementales qui incitent les organismes à passer de la parthénogenèse à la

reproduction gamogénétique (Rodriguez *et al.*, 2007 ; Ebert, 2011). Ainsi, La génération de juvéniles mâles et l'apparition d'anomalies de développement chez les daphnies peuvent résulter de divers mécanismes, notamment des conditions culturelles défavorables (Toumi *et al.*, 2013) ; notant que cette production de mâles est un indicateur de perturbation endocrinienne (Tatarazako *et al.*, 2003 ; Oda *et al.*, 2005).

Cependant, **il convient de noter que nos expériences excluent de telles conditions**, car aucune privation alimentaire, encombrement ou altération de la photopériode n'a été introduite. De plus, la confirmation de ces conditions optimales de culture est étayée par le nombre de nouveau-nées femelles par adulte observé dans les groupes témoins. Malgré la présence d'hormones spécifiques aux invertébrés qui régulent des processus tels que la mue, la métamorphose, l'ovulation, la spermiogenèse et la vitellogenèse chez les espèces de daphnies, une exposition à des perturbateurs endocriniens du type hormonal chimique peut influencer le développement, la croissance et la reproduction (Segner *et al.*, 2003). Colbourne *et al.* (2011) suggèrent que le secret de ce succès reproductif réside dans le génome, avec son répertoire étrangement large de gènes dupliqués en tandem et une proportion élevée de gènes spécifiques à la lignée des daphnies. Selon Liu *et al.* (2012), les organismes aquatiques, lors des premiers stades de leur vie, sont sensibles aux œstrogènes lors d'une exposition aiguë. Les stades embryonnaires et juvéniles des organismes aquatiques ont été utilisés pour évaluer la qualité biologique de l'environnement aquatique en raison d'une tolérance moindre aux substances toxiques par rapport au stade adulte (Aris *et al.*, 2014).

En ce qui concerne nos observations, l'émergence de néonates mâles a été constatée lors de la première ponte des femelles traitées avec les deux hormones et leurs mixtures après 3 jours d'exposition. **Les pourcentages de mâles juvéniles produits après l'exposition à EE2 ont révélé une augmentation significative, atteignant 100 % par rapport aux témoins qui n'ont montré que 5 % de mâles. Cette masculinisation était particulièrement marquée dans les groupes exposés aux concentrations les plus faibles et les plus élevées, soit 0.1 et 25 µg/L d'EE2, respectivement.**

Certains travaux confortent nos résultats. Effectivement, l'exposition à 0.1 µg/L d'EE2 a induit une inversion de sexe et le développement d'un ovaire chez tous les juvéniles mâles de médaka (*Oryzias latipes*), selon les travaux de Scholz et Gutzeit, (2000). Luna *et al.* (2015) affirment qu'une exposition à des concentrations environnementales pertinentes de l'ordre de ng/L d'EE2 peut provoquer la masculinisation ou la féminisation de *D. magna*. Selon Parrott et Blunt, (2005), une exposition à 1 ng/L d'EE2 chez les poissons d'eau douce *Pimephales*

promelas a entraîné une diminution significative de la fécondation, une augmentation de la production d'œufs et une réduction de l'expression des caractéristiques sexuelles masculines secondaires. De même, une exposition de *Pimephales promelas* à des concentrations d'EE2 entre 5 et 6 ng/L a entraîné une féminisation et une expansion conséquente de la population. Ainsi, une étude effectuée par Orlando et Guillette, (2007) a également montré que les amphibiens et les reptiles exposés à des hormones synthétiques environnementaux présentent une inversion du sexe et des changements significatifs dans les caractéristiques sexuelles secondaires.

En revanche, la masculinisation **chez ceux exposés à l'hormone LNG était dépendante de la concentration, atteignant 100 % à la concentration la plus élevée, soit 125 µg/L.** Des concentrations plus élevées de LNG ont été démontrées pour masculiniser les poissons femelles (Runnalls *et al.*, 2013). Même à des concentrations basses, le LNG peut altérer la croissance, le développement et la reproduction des organismes aquatiques exposés de manière continue à ce composé parent et à ses produits de dégradation (King *et al.*, 2016). Antérieurement, il a été observé que des spécimens de *D. magna* exposés à une concentration de 100 µg/L de progestérone ont généré des portées caractérisées par une prédominance accrue de mâles lors de la deuxième ponte des jeunes (Kashian et Dodson, 2004). Aussi, il a été constaté que des concentrations entre 3,3 et 40 ng/L de LNG peuvent réduire la reproduction des poissons par la masculinisation des femelles, des modifications de l'histologie des gonades et des perturbations des niveaux hormonaux (Fent, 2015). Zeilinger *et al.*, (2009), ont observé aussi que, l'exposition de gardons *Pimephales promelas* au LNG à une concentration de 29,6 ng/L a entraîné la masculinisation des caractéristiques sexuelles secondaires des femelles.

Les réponses aux mélanges de xénobiotiques sont susceptibles d'être surestimées (Kortenkamp *et al.*, 2009). **En effet, tous les descendants des femelles exposées aux concentrations croissantes (C1, C2, C3 et C4) du mélange EE2/LNG ont présenté une masculinisation significative de 100 % par rapport aux témoins.** De tels effets synergiques semblent être identiques à l'action combinée de LNG et d'EE2 dans la pilule (Goto et Hiromi, 2003). L'interrelation des deux produits chimiques dans la pilule est une aide mutuelle : l'EE2 agit chez l'homme comme un produit chimique similaire à la progestérone, il stimule l'hypophyse et favorise l'ovulation d'abord stimulée par le LNG ; ainsi, l'ovulation est favorisée par une dose plus faible d'EE2 lorsqu'elle est mélangée à LNG. Les futures études devront examiner si un tel processus se produit chez le métabolisme hormonal des daphnies, qui est le cas pour notre étude.

Les hypothèses que nous avançons pour expliquer nos résultats concernant la masculinisation des daphnies juvénile, soit par l'influence des hormones agonistes juvéniles endogènes perturbant le signal régulateur de la production des femelles (Tatarazako *et al.*, 2003), ou bien en interférant avec l'hormone juvénile méthyl farnesoate (MF) sur la détermination du sexe chez les daphnies (Olmstead et Leblanc, 2002). La synthèse de l'hormone juvénile (MF) a lieu dans les organes mandibulaires des crustacés et est présente dans l'hémolymphe. Cependant, trois rôles majeurs de la MF ont été identifiés dans la littérature : **(a)** la stimulation de la synthèse générale des protéines ; expliquant ainsi nos résultats à propos des altérations observées au niveaux des quantités de protéines totales ; **(b)** la promotion du cycle de mue ; et **(c)** son implication dans la reproduction chez les mâles et les femelles (Homola et Chang, 1997).

Bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore bien connu, certaines relations potentielles ont déjà été envisagées entre les hormones destinées aux vertébrés avec les invertébrés (Maes 2011), conséquemment, l'exposition directe aux hormones synthétiques peut être critique pour les œufs, l'embryotoxicité et les anomalies de reproduction et de **développement** (Kashian et Dodson, 2009 ; Rodriguez *et al.*, 2021). Pour les trois cas de traitement, on observe une augmentation du taux de malformation avec presque toutes les gammes de concentrations utilisées selon les résultats obtenus, différent les uns des autres en fonction des concentrations utilisées. Ces anomalies affectent divers organes de l'organisme, notamment : Les antennes primaires et secondaires, l'épine caudale ainsi que d'autres anomalies comme les altérations au niveau du tube digestif ou la destruction totale de la carapace (Toumi, 2013 ; Moumeni, 2016). L'évolution morphologique a été étudiée par Oda *et al.* (2010), chez des nouveau-nés de *Daphnia galeata* de moins de 24 h, exposés soit à l'hormone juvénile Méthyl farnesoate (MF) à des concentrations de 1,9 à 30 µg/L, soit au fénoxycarbe (un pesticide imitant les hormones juvéniles), pendant 6 jours. Les crustacés ont développé un casque plus long à 1,9 µg/L de MF et 25 ng/L de fénoxycarbe, et ont montré un allongement dépendant de la concentration, aussi bien que la taille de l'épine caudale a été réduite en fonction de la concentration, soutenant ainsi nos résultats.

Les résultats obtenus lors du traitement avec la molécule EE2 ont montrés que tous les descendants des femelles exposées pendant 3 jours notamment à la plus faible et la plus forte concentration 0.1 et 25 µg/L, respectivement, sont malformés, où le taux d'anomalies été de 100 %. Dans ce contexte, Dietrich *et al.* (2010) ont montré que l'EE2 provoquait une diminution de la longueur corporelle de *D. magna*. Ainsi, Des aberrations histologiques de

l'appareil reproducteur des mâles *Hyaella azteca* (un crustacé d'eau douce) ont également été observées à toutes les concentrations d'exposition, soit de 0,1 à 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ d'EE2 (Vandenbergh *et al.*, 2003). Des déformations des pièces buccales ont été observées à 10 ng L^{-1} chez *Chironomus riparius* après exposition au EE2 (Watts *et al.*, 2003) ; et une altération de la métamorphose des têtards ainsi qu'un aspect anormal des gonades (La Farre *et al.*, 2008).

Les chercheurs Zheng *et al.* (2020), suggèrent que l'exposition à l'EE2 a provoqué des changements transcriptionnels dans le système immunitaire, la détoxification, la prévention des maladies et la voie de dégradation des protéines, en affectant des gènes impliqués dans le transport de l'ARN et la transduction des signaux, ce qui peut entraîner une résistance réduite à plusieurs maladies.

En outre, Certaines études indiquent la possibilité d'une interaction entre les produits chimiques œstrogéniques et le récepteur des écdystéroïdes (EcR) chez les invertébrés, y compris *D. magna* (Zou et Fingerman, 2003 ; Segner *et al.*, 2003 ; Clubbs et Brooks, 2007) en influençant sa sécrétion et sa libération, ou en limitant sa transformation en 20-hydroxyecdosone (20HE) (Maes 2011 ; Rodriguez *et al.*, 2021). L'apparition des malformations, peut donc résulter d'une diminution du taux d'écdystéroïdes dans les embryons, sachant que ces hormones jouent un rôle primordial dans le développement embryonnaire normal (Creuzburg *et al.*, 2007). D'autres ont démontré que la testostérone, dont la structure est similaire à celle des œstrogènes, provoque une toxicité embryonnaire pour les daphnies en interférant avec l'activité des écdystéroïdes (Mu et LeBlanc, 2004). D'un autre côté, ces malformations peuvent être associées à des perturbations d'autres hormones, tel est le cas des malformations observées chez le crustacé *Neocaridina denticulata* par Huang *et al.* (2004).

Tandis que le traitement avec la molécule LNG, a montré une augmentation concentration-dépendante du taux d'anomalies chez les néonates. Le travail de Brockmeier *et al.* (2016) a révélé un développement anormal des embryons chez les femelles de poissons moustiques de l'Est *Gambusia holbrooki* exposées à 100 ng/L de LNG. Par ailleurs, (Furuhagen *et al.*, 2014) ont remarqués des aberrations subcellulaires, tels que l'allocation d'ARN et l'expression de gènes liés à la production d'œufs et à la construction de la cuticule (membrane externe) en exposant *D. magna* aux concentrations croissantes de LNG. Contrairement à Steinbach *et al.* (2023) qui ont affirmé que le LNG n'a eu aucun effet significatif sur le développement précoce des *Cyprinus carpio* ni sur l'occurrence d'anomalies morphologiques.

Cependant, chez les femelles traitées par les concentrations C1 et C4 de la mixture EE2/LNG, les déformations des néonates ont affecté 100 % de la progéniture totale, et nous avons pu observer des malformations sévères comme le développement d'antennes secondaires au niveau de l'épine post-abdominale, un phénomène qui n'a jamais été remarqué auparavant (Fig. 15 « A5 »). Par conséquent, les effets de combinaison possibles de faibles concentrations d'une gamme de composés différents peuvent présenter des effets additifs, synergiques ou antagonistes (Ruiz et Font, 2011).

Le comportement de nage des daphnies est complexe, multiparamétrique et considéré comme l'un des biomarqueurs de toxicité les plus sensibles (Duquesne et Küster, 2010), et la plupart des paramètres comportementaux sont déterminés à l'aide de l'analyse numérique de l'enregistrement vidéo de la trajectoire de nage des spécimens (Dodson *et al.*, 1995). Cette trajectoire est un paramètre basé sur le chemin laissé par une daphnie en mouvement, caractérisé par sa longueur (généralement exprimée en millimètres) et sa forme (Tkaczyk *et al.*, 2021). Des articles ont indiqué que la trajectoire de nage des daphnies peut être modifiée suite à une intoxication (Shimizu *et al.* 2002 ; Bownik, 2017). L'analyse de ce paramètre en 2 ou 3 dimensions peut révéler un comportement altéré, suggérant des troubles du système nerveux des crustacés y compris des symptômes tels que la perte d'orientation des animaux (Bownik, 2017). De plus, les recherches menées par Ren *et al.* (2007) ont révélé que le changement de comportement chez *D. magna* était un indicateur sensible de l'exposition au malathion. Ces chercheurs ont également suggéré que ce changement comportemental pouvait servir de réponse précoce au stress.

À notre connaissance, c'est la première étude montrant l'influence de l'EE2, LNG et particulièrement leurs mixtures aux niveaux comportemental chez *D. magna* surtout aux concentrations plus faibles utilisées dans l'étude.

L'activité de nage est un terme large couvrant différents comportements de la natation qui peuvent être distingués en : immobilité (manque de capacité à se déplacer), incapacité de nager (les daphnies ne sont pas capables de nager mais elles sautent avec les antennes), dépression (animaux piégés à la surface de l'eau ou se déplaçant uniquement au fond) , natation normale (aucune alternance du comportement de natation n'est observée) et suractivité (les daphnies effectuent une rotation constante) (Jeong *et al.*, 2018 ; Tkaczyk *et al.*, 2021).

Différents schémas d'activité de nage ont été observés après l'exposition des daphnies à un alpha-bloquant, un bêta-bloquant et un psychostimulant (Jeong *et al.*, 2018). **D'après nos**

observations, les trajectoires des spécimens témoins présentent des courbes moins prononcées, couvrant pratiquement toute la surface de la boîte d'observation, tandis que les trajectoires des animaux traités avec les stéroïdes et leurs mixtures se limitent à de petites zones près des parois. On constate que, en l'absence du traitement, les femelles daphnies optent pour des migrations caractérisées par une nage **rectiligne**, un déplacement qui s'effectue le long d'une ligne droite en cascade, accomplissant des déplacements plus ou moins ralentis en sautant, à la fois horizontaux et verticaux grâce aux mouvements de leurs antennes secondaires. En effet, de manière générale, les daphnies adoptent un mode de nage sautillant, caractérisé par les battements rythmiques et réguliers de leur deuxième paire d'antennes (Simão *et al.*, 2019).

Tandis qu'à leurs expositions à des concentrations croissantes d'EE2, LNG, ainsi qu'à leurs combinaison EE2/LNG, leurs trajectoires de nages mettent en évidence de manière significative une perturbation du comportement natatoire. Cette altération se manifeste par des mouvements totalement **désordonnés** et **irréguliers** chez les spécimens exposés, suggérant une réponse notable aux substances testées. Effectivement, certaines études indiquent que les trajectoires des daphnies intoxiquées diffèrent de celles des non traitées (Shimizu *et al.*, 2002 ; Noss *et al.*, 2013). Pareillement, nous mettons en évidence des déplacements de nages **erratiques** (saccadés et désorganisés) sous l'influence des hormones synthétiques EE2 et LNG, particulièrement aux plus fortes concentrations (5 - 25 µg/L) et (25 - 125 µg/L), respectivement.

Ainsi, nous avons constaté des comportements de nages **circulaires** et rotatifs sur place, et **une augmentation du changement d'angle tracées en zigzag**, observés significativement aux concentrations les plus faibles d'EE2 (0,1 – 0,5 µg/L), pareillement pour les concentrations les plus élevées de la combinaison EE2/LNG (C3 et C4). De même, les daphnies exposées en particulier aux faibles concentrations d'EE2 (0,1 – 0,5 µg/L), ainsi que celles de la combinaison EE2/LNG (C1 - C2), manifestent une excitation accrue et adoptent des trajectoires en **spirale** appelé « **Spinning** ». Le "spinning" ou la rotation quasi-hélicoïdale, est un mouvement atypique de la daphnie caractérisé par des cercles de petite taille pendant la nage, causé par des agents stressants tel que les ingrédients pharmaceutiques (Dodson *et al.*, 1995). On suggère que le "spinning" est le résultat d'une perte de contrôle de l'équilibre du corps (Bownik, 2017). Un comportement similaire a été observé chez les daphnies après exposition à un alpha-bloquant, la cyproheptadine (Jeong *et al.*, 2018).

En guise de conclusion, le comportement de nage de *D. magna* a été utilisé comme un biomarqueur fiable des effets induits par divers facteurs de stress, en particulier ceux qui

affectent le système neuromusculaire (Oliveira *et al.*, 2013 ; bownik *et al.*, 2015). En conséquence, nous proposons que ces modifications d'orientations soient probablement dues à l'impact de ces perturbateurs endocriniens sur l'activité de l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans de nombreux processus physiologiques, notamment la contraction musculaire, la régulation du rythme cardiaque et la fonction cognitive de *D. magna* (Liu *et al.*, 2020).

La vitesse de la nage exprimée par la grandeur scalaire « la vitesse et sa grandeur vectorielle, la vélocité » (habituellement exprimée en mm/s), est parmi les différents points finaux comportementaux et physiologiques couramment utilisés chez les daphnies (Pan *et al.* 2017 ; Bownik *et al.*, 2020 ; Bownik *et al.* 2019b). D'après nos recherches, c'est la première étude mettant en évidence l'influence de l'EE2, du LNG, et particulièrement de leurs mixtures, sur la vitesse de nage de *D. magna*, notamment aux concentrations environnementales pertinentes.

Après 24 h d'exposition, la LNG semble avoir des effets différents sur la capacité natatoire de *D. magna*, avec des concentrations élevées entraînant généralement des effets négatifs traduites en baisses de la vitesse moyenne de nage. Tandis que EE2 seul ou en mixture, montre des résultats variables, avec une hausse notable de la vitesse de nage à faibles concentrations mais une baisse à des concentrations plus élevées après 24h, indiquant une possible interaction complexe entre les deux molécules.

Cette réduction de la vitesse aux premières 24 h peut être liée à une activité neuromotrice réduite chez les daphnies exposées aux concentrations les plus élevées de LNG (Bownik *et al.*, 2015). Nous suggérant donc, que des concentrations élevées de LNG peuvent induire une inhibition de la transmission neuromusculaire. Les mécanismes par lesquels les progestérones et/ou les œstrogènes synthétiques tel que le LNG ou EE2 diminuent la vitesse de nage des daphnies n'ont pas été élucidés. Cependant, on pourrait émettre l'hypothèse que le stress oxydatif, connu pour être induit par ces substances chez ces espèces, pourrait également être responsable des effets toxiques sur le comportement des crustacés et notamment sur leur mobilité (Faheem et Lone 2018 ; Mo *et al.*, 2019 ; Shen *et al.*, 2019 ; Rodrigues *et al.*, 2021).

Tandis que la surexcitation observée chez *D. magna* pourrait être attribuée exclusivement à l'intermédiaire de l'activité des canaux sodiques, entraînant un blocage réversible au niveau des neurones. Ceci peut conduire à une dégradation de la capacité d'action le long de l'axone, provoquant ainsi une hyperexcitation neuromusculaire (Hodgson, 2004).

Après 48 h d'exposition, la vitesse a continué d'augmenter significativement à la concentration la plus faible D'EE2 (0.1 µg/L), et baisser à la plus forte concentration (25 µg/L). Quant aux vitesses des groupes traités par la LNG, ont continué de diminuer de manière significative. Cependant, dans le cas de la mixture, seule la concentration la plus faible (C1) a maintenu une augmentation de la vitesse moyenne de nage, tandis que les concentrations plus élevées (C2, C3, C4) ont entraîné une diminution significative de manière concentration-dépendante, baissant jusqu'à (1.40 mm/s), par rapport à la vitesse moyenne de celle des témoins (7.47 mm/s). Cette altération du comportement pourrait être liée à l'allocation d'énergie pour la détoxification et la protection antioxydante plutôt que pour l'activité de nage, comme le postule Oliveira *et al.* (2012). Cependant, selon l'expérience réalisée par Xin *et al.* (2020), la vitesse de nage a augmenté, bien que la distance de nage et le temps de nage moyen aient significativement diminué, chez les larves de poisson-zèbre exposées à la prednisolone (hormone stéroïdienne) à des concentrations infimes, confirmant ainsi la montée de la vitesse à la plus faible concentration EE2 et les mouvements circulaires ou en rotation qui ont été observés auparavant.

De nombreuses substances polluantes présentes dans l'environnement peuvent perturber l'activité enzymatique et l'expression génique associées à la détoxification et aux mécanismes antioxydants (Wang *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017). Des recherches antérieures ont démontré que les effets moléculaires et cellulaires de l'exposition aux stéroïdes sexuels peuvent être évalués au moyen de biomarqueurs enzymatiques issus de différentes voies métaboliques, notamment les réponses enzymatiques antioxydantes observées chez diverses espèces aquatiques non ciblées (Cardoso *et al.*, 2019). Ces antioxydants constituent le principal système de défense qui réduit la toxicité liée aux ROS (Maharajan *et al.*, 2018). La surproduction de ROS peut entraîner des altérations redox en perturbant l'activité des enzymes impliquées dans l'état de stress oxydatif (Duan *et al.*, 2022). Dans la présente étude, l'exposition de *D. magna* adultes aux stéroïdes individuels et combinés EE2 et LNG pendant 48 heures a provoqué un déséquilibre de la balance redox, comme en témoigne la diminution des niveaux de GSH et l'activité de la CAT ainsi que l'augmentation de la teneur en MDA et de l'activité de la GST, comme déterminé par le test ACP.

La peroxydation des lipides initie une réaction en chaîne lorsque les radicaux libres attaquent les lipides, et les niveaux de MDA peuvent augmenter en raison de la dégradation des lipides (Maharajan *et al.*, 2018). **Après 48 heures d'exposition séparée ou combinée à l'EE2 et au LNG, une augmentation des niveaux de MDA a été induite par rapport aux groupes**

témoins de manière dépendante de la concentration, diminuant pour l'EE2 et augmentant pour la LNG ; cette augmentation observée était associée à une baisse de l'activité de la CAT et des niveaux de GSH.

En conséquence, l'augmentation des niveaux de MDA résulte de la dégradation des hydroperoxydes primaires et des polymères lipidiques, ce qui se produit lorsqu'il y a une quantité excessive de H₂O₂ intracellulaire au-delà du niveau cellulaire typique, que les activités de la CAT et de la GST ne peuvent neutraliser (Yisa *et al.*, 2023). Dans ce contexte, (Rodrigues *et al.*, 2021) ont montré qu'une exposition de *D. magna* à l'EE2 à des concentrations croissantes de 0,1 à 100 µg/L augmentait significativement les TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique), entraînant une plus grande cytotoxicité. De manière similaire, Meksem *et al.* (2007) ; Shen *et al.* (2019) ont confirmé que l'accumulation de MDA dans les tissus pourrait être liée à la suppression de la fonction des enzymes antioxydantes.

Cette conclusion est corroborée par Mo *et al.* (2019), qui suggère que l'EE2 provoque la formation de ROS et l'accumulation de MDA chez *Pelteobagrus fulvidraco*, entraînant des effets délétères. Bien qu'il ne puisse être comparé, et en raison du manque d'informations sur les effets du mélange d'EE2 et de LNG sur les systèmes antioxydants des invertébrés, une étude sur des rongeurs a déterminé que le mélange augmentait considérablement les niveaux de MDA plasmatiques et rénaux ainsi que les niveaux de GSH (Olaniyi *et al.*, 2021).

Le GSH est le thiol le plus courant en dehors des protéines et est crucial pour la survie cellulaire (Lushchak, 2011). **Dans notre expérience, une réduction des niveaux de GSH a été enregistrée, en particulier à 0,1 µg/L d'EE2**, où une toxicité significative a été observée, comme en témoigne la production excessive de MDA. La diminution observée du GSH peut être due à sa participation à la neutralisation des radicaux libres induits par les stéroïdes et/ou à son utilisation élevée pour la conjugaison (Faheem et Lone 2018 ; Shen *et al.*, 2019). **Cependant, la réduction significative de la quantité de GSH observée dans le mélange, en particulier avec la concentration la plus basse de C1 = 0.1/0.5 µg/L (EE2/LNG)**, indique une synergie potentialisée entre les deux molécules, suggérant que leurs effets combinés à de faibles concentrations sont de plus en plus remarquables que ceux affectés par chacune d'entre elles (Zhu, 2008). Ainsi, une baisse des niveaux de GSH après l'exposition à LNG, dépendante de la concentration et notablement significative à 25 et 125 µg/L. Dans ce contexte, une étude récente a conclu que le stress oxydatif provoqué par le progestatif synthétique Norgestrel (un isomère actif du LNG), à des concentrations croissantes (0,01 et 1 µg/L) presque dans la même

plage que la nôtre, a entraîné des lésions histologiques de la glande digestive de la palourde *Macra veneriformis* (Zhao *et al.*, 2023).

Les résultats de notre étude ont démontré que l'activité de la catalase a chuté de manière significative chez les adultes de *D. magna* exposées à l'EE2, au LNG et à leur mélange. En soutien à nos résultats, une étude récente a rapporté qu'une exposition à 1 µg/L d'EE2 réduit l'activité de la catalase dans le sérum du poisson-chat jaune (Mo *et al.*, 2019). Pour le LNG, une réaction d'hormèse de la catalase a été observée chez le poisson zèbre à la suite d'une exposition à des concentrations plus faibles qu'à des concentrations plus élevées (Cardoso *et al.*, 2019). Selon Rodrigues *et al.* (2021), cela suggère l'implication de la catalase dans le processus de défense antioxydante chez *D. magna*. Par conséquent, cette réduction peut être attribuée à l'inhibition de l'activité enzymatique par la surproduction de radicaux libres tels que le H₂O₂ (Belhaj *et al.*, 2018).

L'une des principales fonctions de contrôle dans le processus redox cellulaire et de protection des tissus contre le stress oxydatif est assurée par l'enzyme GST (Shen *et al.*, 2019), reconnue pour son rôle dans l'élimination de nombreux agents toxiques d'origine anthropique (résidus d'ingrédients pharmaceutiques actifs) (Svigruha *et al.*, 2021). Selon une étude récente, l'augmentation des activités de la GST chez *D. magna* a permis à l'organisme de mieux détoxifier les médicaments psychotropes (Duan *et al.*, 2022). **Nos résultats ont montré que l'activité de la GST était significativement augmentée chez *D. magna* exposé à l'EE2, au LNG et à leur mélange par rapport aux groupes témoins ; cette augmentation observée n'était pas dépendante de la concentration, en particulier lors de l'exposition à de faibles concentrations d'EE2 individuellement ou en mélange (C1 = 0.1/0.5 et C2 = 0.5/2.5 µg/L),** ce qui peut s'expliquer par une augmentation du stress oxydatif et de la peroxydation lipidique (Svigruha *et al.*, 2021).

D'autres auteurs comme Gasmi *et al.* (2019) ; Zhou *et al.* (2019) s'accordent que l'activité de l'enzyme GST était impliquée dans la détoxification de l'EE2 et du LNG, individuellement ou en combinaison, dans l'espèce étudiée. Des résultats similaires ont été enregistrés chez *D. magna* exposé à 0,1, 1 et 10 µg/L d'EE2 (Rodrigues *et al.*, 2021). Dans ce sens, une exposition à court terme de *D. magna* à un mélange de quatre progestatifs, dont le LNG, a augmenté l'expression génique de la GST et, par conséquent, une augmentation significative de l'activité de la GST, indiquant que les progestatifs peuvent interagir avec les circuits impliqués dans les réponses au stress oxydatif, de manière similaire aux œstrogènes (Svigruha *et al.*, 2021).

V. Conclusion

Pour conclure cette partie *in vitro*, il s'est avéré que ces hormones synthétiques sont responsables des différentes perturbations observées que ce soit sur le plan morphologique, comportemental, et biochimique chez les crustacés d'eau douce *Daphnia magna*. Ces perturbations sont observées particulièrement aux plus faibles concentrations d'EE2 seul ou en combinaison, illustrant ainsi, le phénomène d'hormèse.

Un autre point à souligner, c'est que la toxicité du mélange des deux hormones est significativement plus prononcée, en raison de la synergie entre les deux molécules et du puissant caractère de l'œstrogène.

Étant donné que *D. magna* représente une proportion substantielle du régime alimentaire des consommateurs secondaires tels que les têtards et les poissons, les résultats du modèle analysé à des concentrations environnementales pertinentes pour les deux hormones indiquent leur menace potentielle pour la chaîne alimentaire aquatique. Ainsi, la bioaccumulation de ces résidus se manifeste lorsqu'ils s'accumulent graduellement dans les tissus des organismes aquatiques au fur et à mesure de leur consommation de proies ou d'autres sources alimentaires contaminées. En conséquence, leur présence dans les écosystèmes aquatiques pourrait potentiellement avoir des répercussions sur la santé reproductive, à travers la chaîne alimentaire.

**CHAPITRE 03 : ÉTUDE *IN VIVO* : REPROTOXICITE
INDUITE PAR LES RESIDUS D'HORMONES
STEROÏDIENNES EE2 ET/OU LNG CHEZ LE RAT *WISTAR*
MÂLE**

I. Introduction

L'exposition des organismes vivants aux contaminants émergents présents dans l'environnement a considérablement augmenté au cours des 100 dernières années en raison de leur utilisation dans la fabrication de matières plastiques, de pesticides, d'herbicides, de médicaments et d'autres produits industriels (Jeminwa *et al.*, 2016). Il s'agit d'un problème de santé publique car il est prouvé que de nombreuses substances chimiques ont la capacité d'interférer avec l'axe endocrinien (Su *et al.*, 2019). Parmi ces substances, les stéroïdes sexuels, qui imitent l'activité des œstrogènes et progestérones endogènes et figurent parmi les perturbateurs endocriniens les plus courants (Degen et Bolt, 2000), libérées dans l'environnement par le biais des industries, des activités d'élevage, des eaux usées domestiques et des rejets hospitaliers (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009 ; Gore *et al.*, 2015 ; Lin *et al.*, 2020), ainsi que par l'utilisation intensive de contraceptifs qui ont radicalement bouleversé les pyramides des populations, passant de pyramides à base large reflétant un taux de natalité élevé, à pyramides à base étroite, témoignant d'une population vieillissante. Lorsque la "pilule" est arrivée sur le marché dans les années 1960, l'industrie pharmaceutique florissante l'a présentée comme une méthode universelle et sûre, exempte d'effets secondaires dont ils avaient déjà connaissance (Cortès et Alfaro, 2014). Cependant, l'arrivée de contraceptifs oraux synthétiques n'a pas été sans risques pour la santé (Sitruk-Ware et Nath, 2013). Il est rapporté que les hormones stéroïdiennes présentes dans ces contraceptifs, en particulier les œstrogènes et les progestatifs synthétiques (Su *et al.*, 2015, 2016, 2017), peuvent perturber la fonction endocrinienne normale de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (Massawe *et al.*, 2018 ; Su *et al.*, 2019). Cela a soulevé des questions concernant leurs éventuels effets physiologiques indésirables, essentiellement sur la reproduction et la fertilité masculines.

L'17 α -éthynylestradiol (EE2) et le lévonorgestrel (LNG) comptent parmi les contraceptifs synthétiques féminins les plus couramment utilisés (Säfhholm *et al.*, 2015). L'EE2 est un œstrogène synthétique utilisé dans le traitement des insuffisances en œstrogènes (D'ascenzo *et al.*, 2003), mais environ 40 % de la dose substantielle d'EE2 est excrétée inchangée dans l'urine et les selles (D'ascenzo *et al.*, 2003 ; Johnson et Williams, 2004). En raison de ses propriétés œstrogéniques, ce produit est considéré comme un perturbateur endocrinien lorsqu'il est rejeté dans l'environnement via les eaux usées, ayant des implications pour la santé de l'écosystème (Jeminwa *et al.*, 2016 ; Lin *et al.*, 2020), en interférant avec la reproduction masculine et l'activation hormonale. Récemment, L'effet biologique de l'EE2 sur le système reproducteur masculin a mis en évidence que le niveau de testostérone plasmatique

est significativement bas chez les rats exposés à l'EE2 (Lin *et al.*, 2020). Ainsi, est signalé que ce xénobiotique provoque une féminisation complète des poissons mâles (Scholz et Gutzeit, 2000 ; Örn *et al.*, 2003), une diminution de la qualité du sperme (Montgomery *et al.*, 2014), et une perturbation du comportement d'accouplement (Partridge *et al.*, 2010). Une autre étude antérieure a rapporté que l'EE2 peut altérer la production de testostérone chez les poissons mâles en modifiant les activités des enzymes stéroïdogènes (Hogan *et al.*, 2010), en plus, d'une diminution de la motilité des spermatozoïdes et une atrophie de la prostate et des vésicules séminales chez les rats traités avec l'EE2 (Walker *et al.*, 2021), indiquant des dommages induits dans le système reproducteur.

Le lévonorgestrel (D-(1-norgestrel)) est un progestatif totalement synthétique substitué en position 13b-éthyl dans la structure du 19-nor (Smith *et al.*, 1963), largement utilisé seul ou en association avec l'EE2 dans diverses formulations contraceptives, notamment les pilules, les injectables, les dispositifs intra-utérins médicamenteux, les implants sous-cutanés, les anneaux vaginaux, et les pilules contraceptives d'urgence (Morali *et al.*, 2002). Le LNG est une molécule stéroïdienne avec des liaisons moléculaires fortes, et donc, récalcitrante aux processus de dégradation et présente une persistance environnementale car les conditions naturelles ne parviennent pas à l'éliminer complètement (Olivera et Luengo, 2019). Par conséquent, cette molécule représente un risque d'exposition à long terme pour de nombreux organismes aquatiques et mammifères (Ríos-Sossa *et al.*, 2022). Le LNG induit des effets agonistes hormonaux autres que ceux de son activité progestative (Cabeza *et al.*, 1995). En effet, il se lie spécifiquement, avec une grande affinité aux récepteurs intracellulaires des androgènes, notamment, à l'hormone de croissance (testostérone) (Morali *et al.*, 2002).

La plupart des études antérieures se sont concentrées sur les effets dépendant de la dose des composés de l'EE2 et LNG individuellement, ou en mixture dans un rapport de 1:1 (Su *et al.*, 2019), mais les effets dépendants du rapport 1:5 présent dans la pilule oestroprogestative la plus dominante sur le marché mondiale, n'ont jamais été élucidés, en particulier chez les rongeurs mâles. Ainsi, le concept de plus en plus répandu des "effets de mélange chimique" semble raisonnable, car les actions chimiques individuelles peuvent sous-estimer les effets des actions chimiques combinées (Jeminwa *et al.*, 2016). L'évaluation des effets des mélanges chimiques est cruciale pour évaluer les risques encourus par les populations exposées simultanément à plusieurs produits chimiques. Par conséquent, les stratégies pour effectuer ces évaluations font l'objet de débats constants (par exemple : Al-Fartosi *et al.*, 2017 ; Lee, 2018 ; Olaniyi *et al.*, 2021 ; Walker *et al.*, 2021 ; Su *et al.*, 2019 ...etc).

Chez l'homme, les contraceptifs oraux combinés (COCs) peuvent réduire le niveau de testostérone sérique (Zimmerman *et al.*, 2014). De nombreuses études font référence à la relation entre les COCs et les hormones de la glande thyroïde, et suggèrent que l'estrogène (EE2) présent dans les COCs provoque une augmentation de la concentration de globuline de liaison à la thyroxine, ce qui entraîne une augmentation des hormones thyroïdiennes (triiodothyronine et thyroxine) (Wiegratz *et al.*, 2003). Dans le même ordre d'idées, les COCs ont des effets sur la glande surrénale, la pression sanguine et la fonction thyroïdienne (Al-Fartosi *et al.*, 2017).

Notre objectif est la comparaison entre les effets individuels et les effets de la proportion du mélange (1:5) dus aux deux xénoestrogènes, à savoir l'17 α -éthinyloestradiol (EE2) et le lévonorgestrel (LNG) sur l'évaluation des paramètres liés à la fertilité masculine chez des rats *Wistar* mâles. Nous avons donc examiné les poids de leurs organes reproducteurs (testicules, épидидyme et vésicule séminale), la densité et la motilité des spermatozoïdes, les niveaux des hormones androgènes (testostérone, FSH et LH). Nous avons par la suite examiné les profils lipidiques (cholestérol total, HDL, LDL et triglycérides), ainsi que les concentrations d'antioxydants révélateurs de stress oxydatif dans les tissus testiculaires. De plus, une étude histologique nous permet d'élucider les différentes altérations provoquées par ces contraceptifs synthétiques, ainsi que leur mixture.

II. Matériel et méthodes

Cette deuxième phase de notre étude se présente comme une exploration « *in vivo* », effectuée au niveau de deux différentes structures de l'Université Badji Mokhtar – Annaba : l'animalerie du Département de Biologie, et le Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC).

1 Matériel chimique

Les hormones (EE2 et LNG) utilisées dans le traitement sont identiques à celles employées dans la première étude "in vitro" sur *Daphnia magna*. Pareillement, les mêmes méthodes de dissolution et de préparation des solutions ont été appliquées, à l'exception du choix des doses, une seule ayant été prise pour chaque hormone (1 et 5 µg/kg de PC (poids corporel) d'EE2 et LNG, respectivement). Les doses sélectionnées dans cette étude ont été choisies sur la base du protocole précédemment rapporté par Olaniyi *et al.* (2021).

2 Matériel biologique : Rat *Wistar*

L'étude est réalisée sur des rats mâles de la lignée *Wistar*, pesant entre 150 g et 180 g et âgés de deux mois.

Les animaux sont hébergés dans la salle d'animalerie du Département de Biologie de l'Université Badji-Mokhtar à Annaba, en Algérie, dans des conditions environnementales contrôlées d'une température de (24 ± 2 °C) et d'une photopériode normale (cycle de 12h/12h, obscurité/jour). Les rats ont un accès libre à un régime alimentaire standard pour rongeurs (Complexe de l'alimentation pour rongeurs et poterie, Annaba, Algérie) pendant la période d'adaptation. Les protocoles expérimentaux sont menés conformément aux directives du Programme National de Recherche Scientifique du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, sous le numéro éthique PRFU D01N01EN210120220001.

3 Méthodes

3.1 Protocole expérimental

Après une période d'acclimatation d'environ un mois, trente-deux rats mâles *Wistar* sont répartis également en quatre groupes, et sont traité quotidiennement par voie orale à travers une sonde gastrique pendant quatre semaines successives :

- **Groupe Témoin** : 300 µl/jour d'eau distillée par gavage.
- **Groupe EE2** : 1 µg d'éthinylestradiol (EE2)/kg/jour de PC par gavage.
- **Groupe LNG** : 5 µg de lévonorgestrel (LNG)/kg/jour de PC par gavage.
- **Groupe Mixture EE2/LNG** : 1 + 5 µg EE2/LNG/kg/jour de PC par gavage.

3.2 Paramètres physiologiques

Il est à noter que tout au long de l'expérience, tous les rats sont alimentés de manière limitée avec 140 g/jour de nourriture, en plus de recevoir de l'eau potable. Le poids corporel et l'apport alimentaire des rats témoins et traités sont enregistrés quotidiennement tout au long de la période expérimentale.

3.3 Prélèvement des échantillons

3.3.1 Prélèvement sanguin

À la fin de l'expérience, les animaux sont privés de nourriture pendant la nuit, sacrifiés sous anesthésie à l'éther par décapitation cervicale. Le sang est collecté immédiatement de la veine jugulaire dans des tubes secs et d'autres tubes héparinés. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 3000 tours/min pour récupérer le plasma, utilisé pour déterminer les paramètres biochimiques (tubes secs), hormonaux et de la concentration plasmatique de la testostérone (tubes héparinés).

3.3.2 Prélèvement des organes

Après le sacrifice, une incision longitudinale est effectuée au niveau de la région ventrale des rats, et après la dissection, les testicules, l'épididyme et la vésicule séminale ont été prélevés. Ces organes ont été nettoyés de leurs tissus adipeux, rincés dans du NaCl à 0,9%, puis pesés à l'aide d'une balance à précision pour en obtenir leur poids absolu. Ensuite, stockés à -20 °C en vue de la réalisation de l'étude histologique et les dosages du stress oxydatif.

3.3.3 Prélèvement du sperme épидидymaire

L'épididyme est soigneusement ouvert au niveau de la queue de l'épididyme à l'aide d'un scalpel pour obtenir du sperme (Martinez-Pastor *et al.*, 2006), puis un ratio de 1:50 de fluide épидидymaire a été préparé dans une solution saline normale (NaCl à 0,9%).

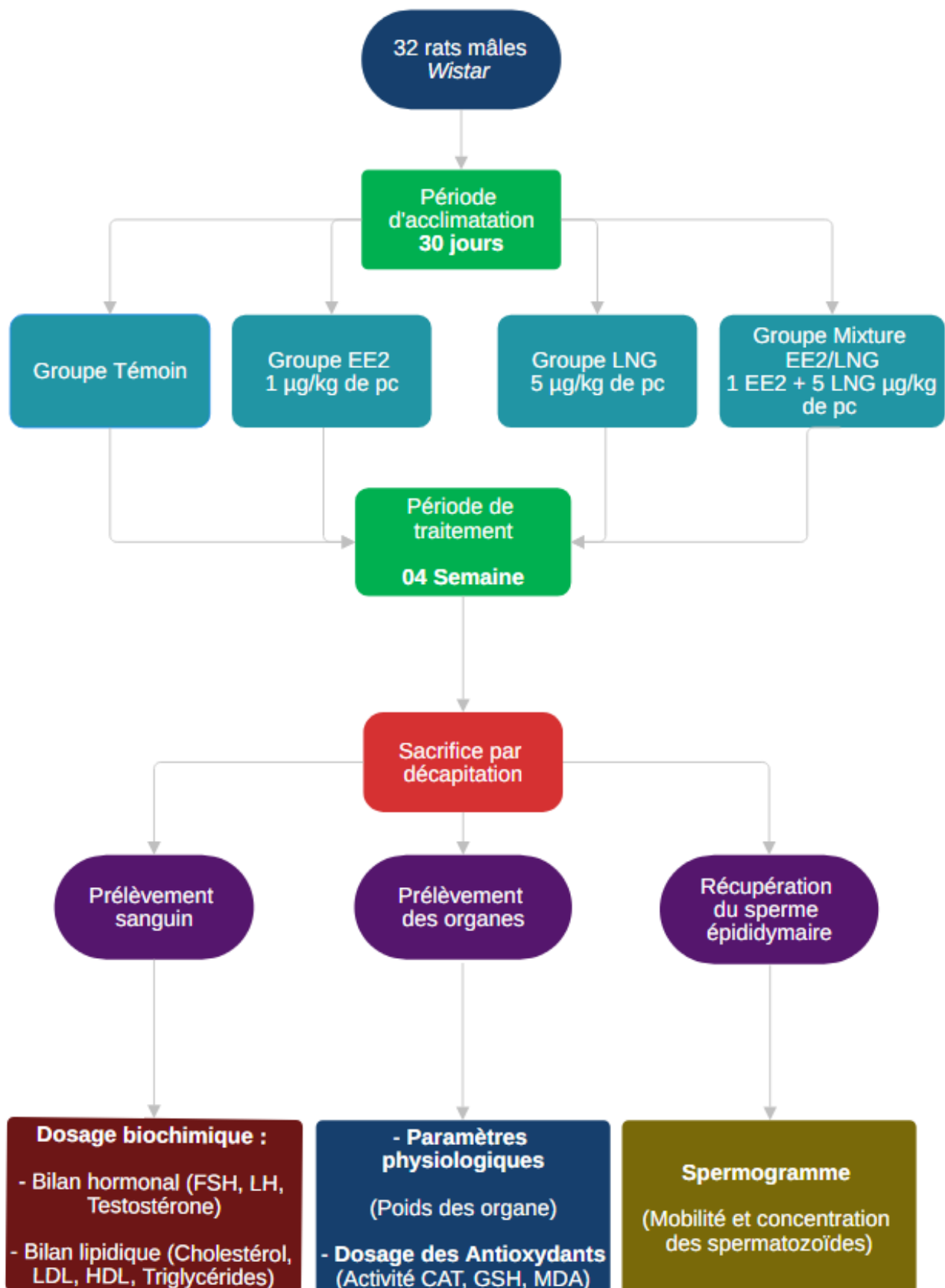


Figure 48 : Schéma récapitulatif représentant le dispositif expérimental

3.4 Méthode de dosages

3.4.1 Analyses biochimiques

Dans cette expérience, nous avons procédé à la détermination du profil lipidique sérique (concentrations en Cholestérol total, Lipoprotéine de basse densité (LDL), Lipoprotéine de haute densité (HDL) et triglycérides), ainsi que les hormones sexuelles sériques (hormone folliculostimulante (FSH), hormone lutéinisante (LH) et la testostérone), à l'aide d'un analyseur d'immuno-analyse automatique (VITROS® ECiQ, New York, USA). Les dosages sont effectués au niveau du laboratoire d'analyses médicales de Dr ARIBI. M.L à Annaba.

3.4.2 Evaluation de la physiologie des spermatozoïdes (Spermogramme)

3.4.2.1 Mobilité et concentration

La motilité des spermatozoïdes est immédiatement analysée selon le protocole de Mortimer et Mortimer, (2013). Les spermatozoïdes sont classés comme mobiles ou non mobiles, et cinq champs sont observés. Une goutte est déposée sur une lame de verre recouverte d'une lamelle de 22x22 mm et examinée sous le microscope optique (Leica ATC 2000 Microscope, Wetzlar, Allemagne) au grossissement de x40.

La concentration des spermatozoïdes est mesurée en utilisant un hémocytomètre (une cellule de Malassez). En résumé, une goutte du liquide épидидymaire (sperme) est étalée des deux côtés de la cellule de Malassez et recouverte d'une lamelle de 22x22 mm, après un repos de 5 minutes, on procède au dénombrement sous le microscope optique (Leica ATC 2000 Microscope, Wetzlar, Allemagne) au grossissement de x40. Le dénombrement des spermatozoïdes est effectué dans 5 champs. Enfin, la concentration est calculée comme suit :
Concentration (Spz. $10^6/ml$) = $D \times V \times n / N$, où :

- **D** : coefficient de dilution (50).
- **V** : volume de la cellule de Malassez.
- **n** : le nombre de spermatozoïdes comptés dans 5 champs.
- **N** : le nombre de petits carrés de la lame.

3.4.3 Dosage des antioxydants

Afin d'évaluer le profil du stress oxydatif, nous avons ciblé l'organe principal de la production des spermatozoïdes, les testicules. Pour cette raison, les biomarqueurs du stress oxydatif : activité Catalase (CAT), taux du Glutathion réduit (GSH) et les niveaux du Malondialdéhyde (MDA) ont été quantifiés.

3.4.3.1 Préparation de l'homogénat

100 mg du tissu testiculaire de chaque rat sont broyés à l'aide d'un homogénéisateur à ultrasons (SONICS Vibra cell™) dans 1 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6), 1 ml d'EDTA (20 mM) et 1 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,5). Les aliquotes sont ensuite centrifugés à 5 000 tours/minute pendant 10 minutes à 4 °C.

Les mêmes modes opératoires de l'étude « *in vitro* » ont été utilisés pour les 03 paramètres : Activité CAT, taux de GSH et les niveaux MDA (**voir partie matériel et méthodes Chapitre 02**).

3.4.4 Etude histopathologique

Les tissus testiculaires et épидидymaires sont soumis à une évaluation histopathologique telle que décrite précédemment par Luna, (1968). Les échantillons de testicules et d'épididymes sont fixés dans une solution de formol neutre à 10 %. La déshydratation des échantillons est réalisée à l'aide d'un automate de déshydratation. Puis, l'inclusion dans de la paraffine est réalisée à l'aide d'une table d'inclusion (Slee MPC/C), qui consiste à enrober l'échantillon dans un moule contenant la paraffine qui sera par la suite refroidi. Les échantillons sont ensuite coupés en fines lamelles de 4 à 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome rotatif (Slee). Les sections découpées sont étalées et collées sur des lames avant d'être réhydratées, un déparaffinage est ensuite réalisé à l'aide d'une plaque chauffante (45-60°) pendant 15 min. Les coupes définitives sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine, puis examinées au microscope optique (Leica ATC 2000 Microscope, Wetzlar, Allemagne) et photographiées à l'aide d'un smartphone (Samsung Galaxy S20) monté sur le microscope optique, équipé d'un module photo doté d'une qualité d'image très claire, au grossissement x40.

3.4.5 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM). Toutes les données expérimentales sont analysées à l'aide d'un test d'analyse de variance

à un facteur (ANOVA) avec le logiciel Graph Pad Prism (9.0.0). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

III. Résultats

1 Paramètres physiologiques

Comme indiqué dans le Tableau (08), la prise de poids et la consommation alimentaire ont significativement augmenté ($p < 0.01$) chez les animaux traités par EE2 et/ou LNG par rapport aux témoins. En revanche, une diminution significative est observée dans l'indice de poids du testicule ($p < 0.001$), de l'épididyme ($p < 0.01$) et de la vésicule séminale ($p < 0.01$ pour EE2 et $p < 0.05$ pour LNG et EE2/LNG) chez les rats traités par rapport aux témoins. De plus, l'indice de poids de ces organes sexuels a significativement diminuée ($p < 0.05$) dans le groupe exposé à l'EE2 par rapport aux animaux traités par LNG et la mixture EE2/LNG.

Tableau 08 : Poids corporel, poids relatif des organes (testicule, épидидyme et vésicule séminale) et consommation alimentaire moyenne chez les rats témoins et traités par l'EE2, LNG et leur mixture EE2/LNG.

<i>Paramètres</i>	<i>Témoin</i>	<i>EE2 (1 µg/kg PC)</i>	<i>LNG (5 µg/kg PC)</i>	<i>EE2/LNG</i>
<i>Gain de poids corporel (g)</i>	6.58±1.19	9.48±0.82 ^{***}	8.13±1.12 ^{***}	8.28±0.96 ^{***}
<i>Poids relatif des testicules (g)</i>	0.64±0.02	0.41±0.03 ^{***}	0.47±0.05 ^{***a}	0.43±0.02 ^{***a}
<i>Poids relatif de l'épididyme (g)</i>	0.29±0.06	0.21±0.01 ^{**}	0.26±0.01 ^{**a}	0.24±0.08 ^{**a}
<i>Poids relatif de la vésicule séminale (g)</i>	0.21±0.01	0.16±0.02 ^{**}	0.19±0.07 ^{*a}	0.20±0.01 ^a
<i>Consommation alimentaire moyenne (g)</i>	132.2±4.01	149.2±2.57 ^{**}	147.6±3.60 ^{**}	143±4.16 ^{**}

Les valeurs avec des indices sont statistiquement différentes avec une valeur de ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$) par rapport au groupe témoin. Les moyennes ne partageant pas la même lettre sont significativement différentes ($p < 0,05$) est représentent la différence intergroupe. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne ($n = 6$).

2 Etude biochimique

2.1 Profil lipidique sérique

Les résultats présentés dans la Figure (49) ont révélé que les taux du cholestérol total lors du traitement avec l'EE2 ont diminué de manière significative ($p = 0.01$), et très hautement significative ($p = 0.0004$) avec la mixture EE2/LNG. Tandis qu'une augmentation significative est observée des taux de LDL chez les rats exposés à l'EE2 ($p = 0.03$), et hautement significative avec la mixture ($p = 0.002$) pendant quatre semaines par rapport aux témoins. Ainsi, une réduction des taux de HDL hautement significative chez les rats exposés à l'EE2, et significative chez ceux exposés à la mixture ($p = 0.003$ et $p = 0.02$), respectivement.

De plus, nous observons une augmentation significative ($p = 0.005$) du taux des triglycérides chez les rats traités avec l'EE2 par rapport aux témoins.

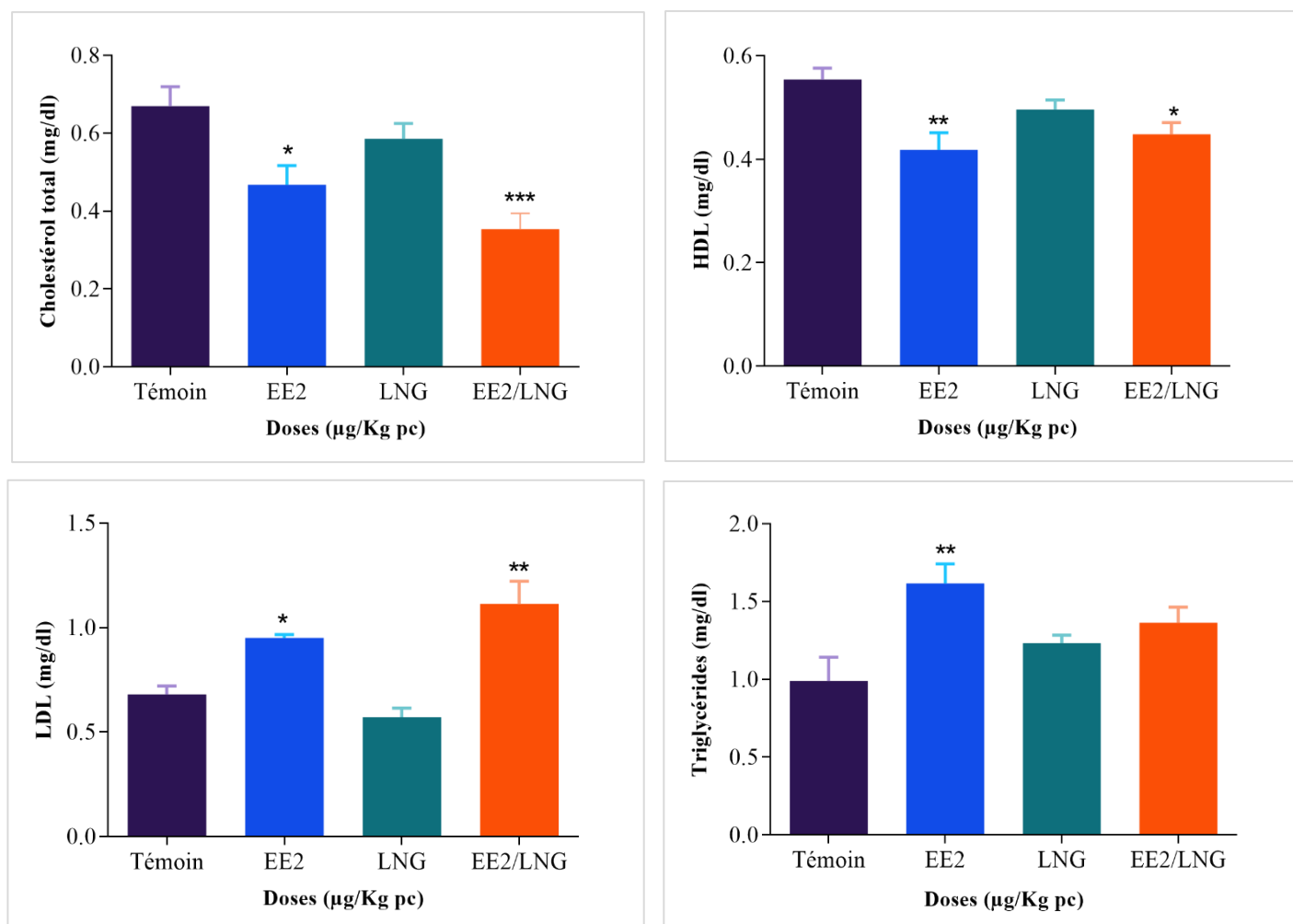


Figure 49 : Niveaux du cholestérol, HDL, LDL et triglycérides chez les rats témoins et traités par l'EE2, LNG et leur mixture EE2/LNG. Les valeurs sont présentées sous forme de

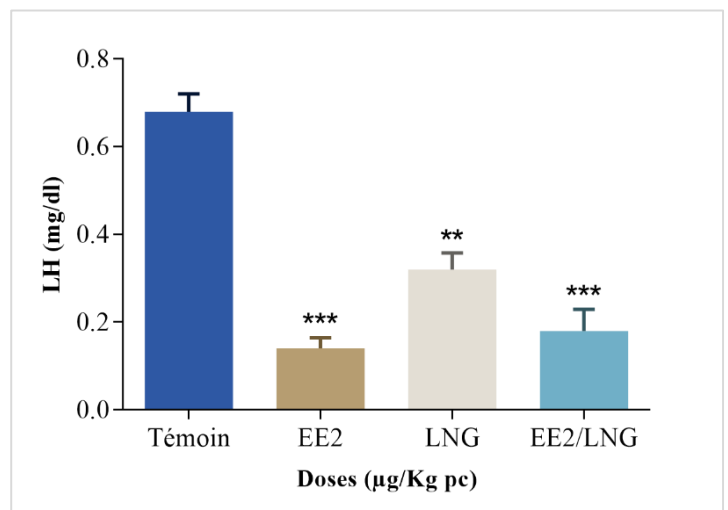
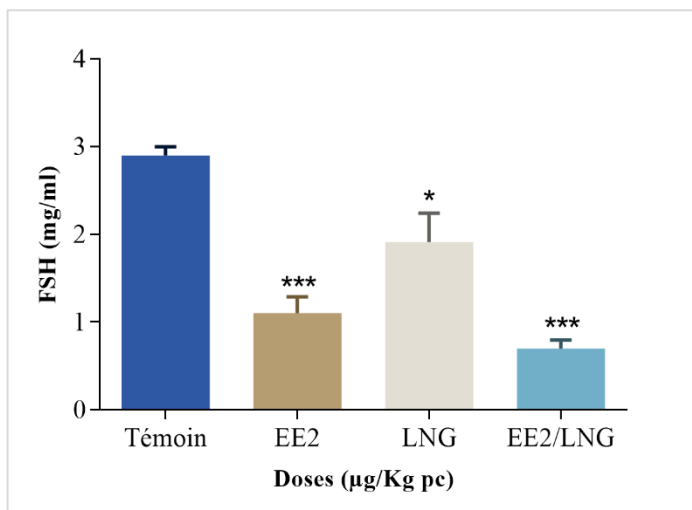
moyenne \pm erreur standard de la moyenne (n = 6). Les valeurs avec des indices sont statistiquement différentes avec une valeur de (*p < 0.01, **p < 0.001)

2.2 Evaluation des taux d'hormones sexuelles sériques

La figure (50) montre un effondrement dans les seuils d'hormones nécessaires à la fertilité masculine.

Ainsi, nous observons un déficit hormonal très hautement significatif dans les concentrations sériques de la FSH (p = 0.0002, p = 0.0003), LH (p < 0.0001, p < 0.0001), et la testostérone (p < 0.0001, p < 0.0001) particulièrement dans les groupes des rats exposés à l'EE2 et la mixture EE2/LNG, respectivement, pendant quatre semaines.

Nous notons que cet affaiblissement est également constaté chez les rats exposés au LNG, avec une diminution significative du niveau de FSH (p = 0.02) et une diminution très significative (p = 0.0001) de la concentration de l'hormone sérique LH. Cependant, la testostérone a montré une diminution très hautement significative (p < 0.0001).



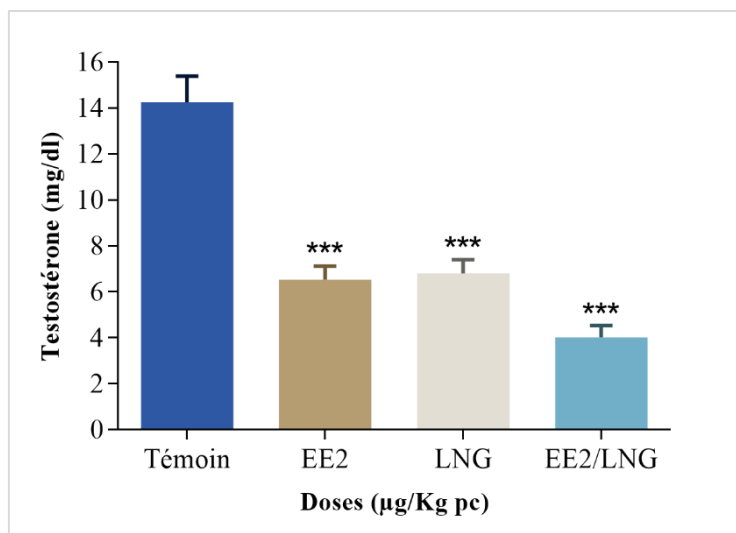


Figure 50 : Niveaux sériques de FSH, LH et testostérone chez les rats témoins et traités par l'EE2, LNG et la combinaison EE2/LNG. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne (n = 6). Les valeurs avec des indices sont statistiquement différentes avec une valeur de (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$)

3 Evaluation de la physiologie des spermatozoïdes

Dans le but d'estimer l'impact de traitement par les deux hormones EE2 et LNG ainsi que leur mixture sur l'activité reproductrice des rats mâles, nous avons examiné les paramètres biologiques des spermatozoïdes tel que la concentration et le pourcentage de mobilité de ces derniers.

3.1 Impact du traitement sur la concentration et la mobilité des spermatozoïdes

Les fluctuations de la concentration des spermatozoïdes ainsi que leur mobilité sont présentées dans le tableau (09) et les figures (51 et 52).

Les résultats montrent que l'administration orale des doses individuelles d'EE2 et LNG a considérablement réduit la concentration des spermatozoïdes de manière hautement significative dans le groupe traité par EE2 ($p = 0.004$), et significative pour celui traité par LNG ($p = 0.01$), atteignant respectivement 450 et 575 m/ml, comparativement au groupe témoin qui présente une concentration de 865.15 m/ml de spermatozoïdes. Cependant, la diminution de la concentration des spermatozoïdes dans le groupe traité par la mixture EE2/LNG est très hautement significative ($p = 0.001$) par rapport aux témoins, atteignant 326.6 m/ml.

Nos résultats montrent une dégradation remarquable de la mobilité des spermatozoïdes induite par ces hormones par rapport au témoin. Cette altération a été hautement significative chez les rats traités par les deux molécules EE2 et LNG séparément ($p = 0.001$ et $p = 0.0004$), respectivement. Le traitement par la mixture a engendré une diminution très hautement significative ($p < 0.0001$), atteignant un taux de 7.33 % de mobilité, par rapport aux témoins 70.72 % de mobilité.

Tableau 09 : Variations de la concentration et de mobilité des spermatozoïdes chez les rats témoins et traités par EE2, LNG et leur mixture pendant 4 semaines d'exposition.

	Témoin	EE2	LNG	EE2/LNG
Concentrations (Million/ml)	865.15±33.7	450±58.3**	575±55.9*	326.6±36.4***
Mobilité (%)	70.72±4.09	27.08±5.45**	40±2.35**	7.33±2.92***

*Les valeurs avec des indices sont statistiquement différentes avec une valeur de ($*p < 0,05$; $**p < 0,001$; $***p < 0,0001$). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard de la moyenne ($n = 6$).

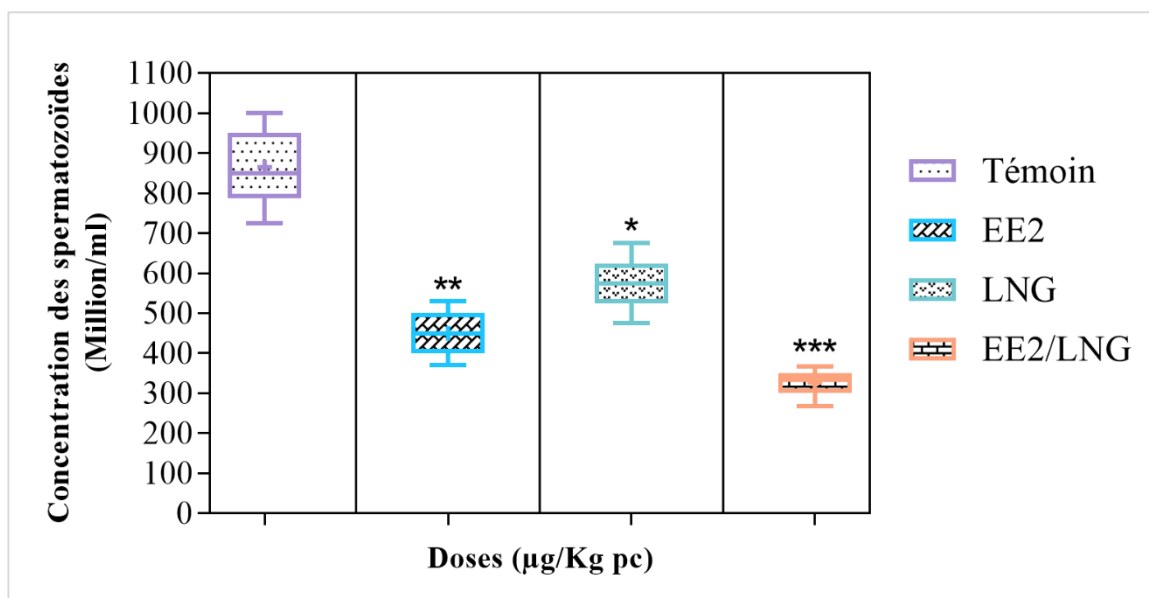


Figure 51 : Changement de la concentration des spermatozoïdes chez les groupes témoins et traités par EE2, LNG et EE2/LNG après 4 semaines d'exposition

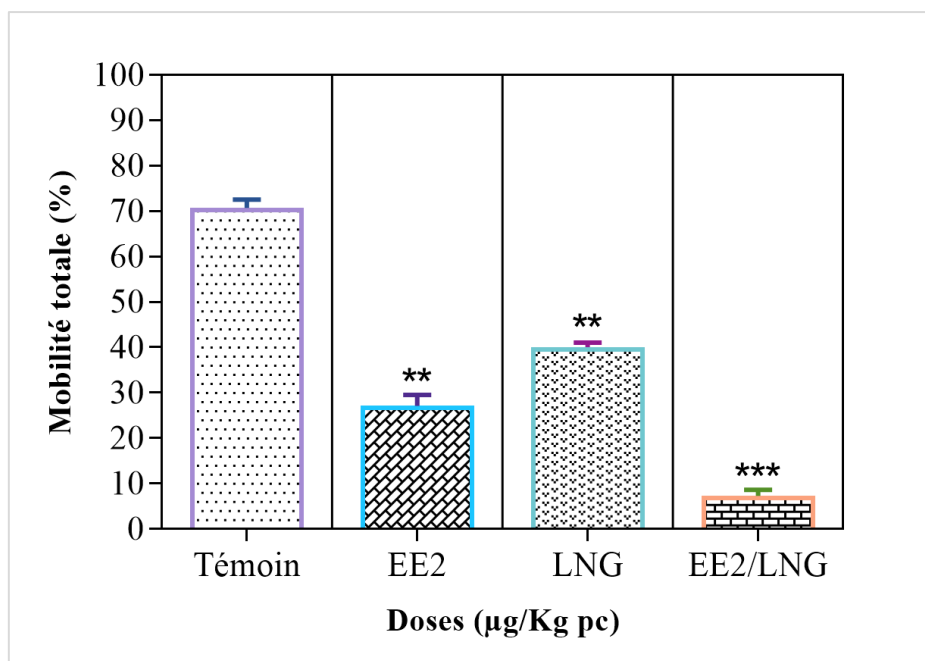


Figure 52 : Pourcentage de mobilité totale des spermatozoïdes chez les rats témoins et traités par l'EE2, LNG et la combinaison EE2/LNG après 4 semaines d'exposition

4 Dosage des antioxydants

Dans cette partie de l'étude, nous avons analysé le profil antioxydant au niveau des testicules des rats après gavage oral d'une durée de 4 semaines par des doses journalières de l'EE2, LNG et leur combinaison.

Comme montré dans la Figure (53) et le Tableau (10), et après administration de 1 µg/kg de PC d'EE2 et 5 µg/kg de pc de LNG séparément pendant 4 semaines, aucun changement significatif n'a été observé dans l'activité CAT dans les testicules des deux groupes traités. Néanmoins, lors du traitement avec la mixture EE2/LNG, l'activité a significativement diminué (2.64 µmol/mg de protéine) ($p < 0.001$) au niveau des testicules par rapport au rats témoins (10.45 µmol/mg de protéine).

En outre, nous n'avons constaté aucun changement significatif des niveaux du taux de GSH dans les testicules des rats traités par les deux hormones séparées EE2 et LNG, où le taux est proche de celui du témoin qui est de 52.82 µmol/mg de protéine. Par ailleurs, une réduction significative ($p = 0.001$) est observée chez les rats traités par la mixture EE2/LNG avec un taux de 34.34 µmol/mg.

En ce qui concerne la concentration des niveaux de MDA, nous constatons une forte peroxydation lipidique au niveau des testicules des rats traités par le LNG et la mixture EE2/LNG comparativement aux témoins, ce phénomène s'est traduit par une augmentation significative ($p = 0.02$) du taux de MDA à travers le traitement par LNG, et hautement significative ($p = 0.005$) dans les testicules des rats traités par la mixture EE2/LNG.

Tableau 10 : Les variations de l'activité CAT ainsi que les concentrations de GSH et MDA dans les testicules des rats témoins et traités par EE2, LNG et EE2/LNG après 4 semaine.

	Témoin	EE2	LNG	EE2/LNG
CAT	10.45±1.07	7.78±1.46*	3.75±1.57***	2.64±0.74***
GSH	52.82±4.30	45.82±4.62	42.48±1.26	34.34±4.72*
MDA	0.69±0.41	0.83±0.22	1.30±0.19*	1.48±0.22**

Les valeurs avec des indices sont statistiquement différentes avec une valeur de ($p=0,033$; ** $p=0,02$; *** $p<0,001$). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard ($n = 6$).

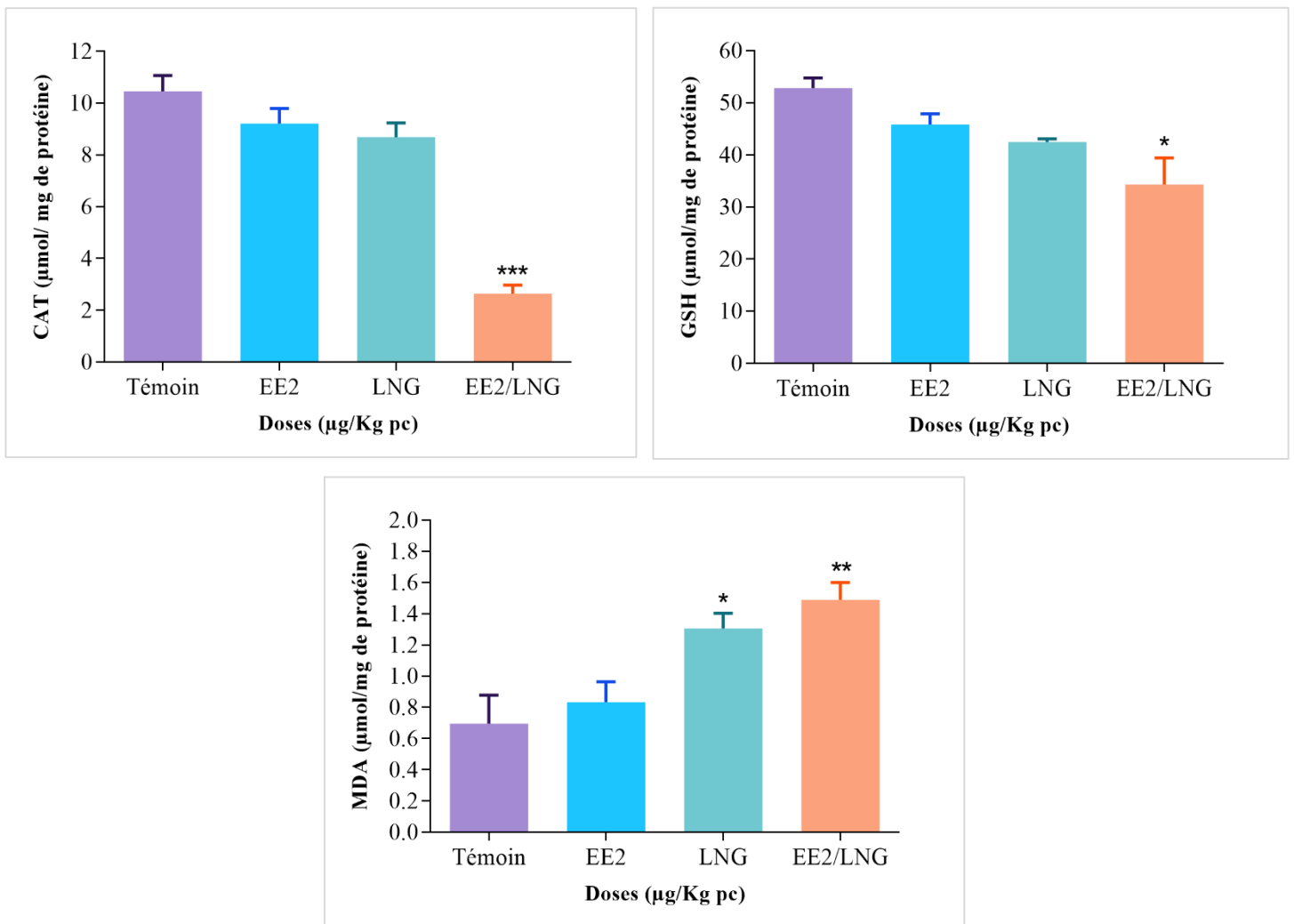


Figure 53 : Activité de la CAT, niveau de GSH et taux de MDA dans les testicules des rats témoins et traités par EE2, LNG et leur mixture EE2/LNG pendant 4 semaine

5 Etude histopathologique

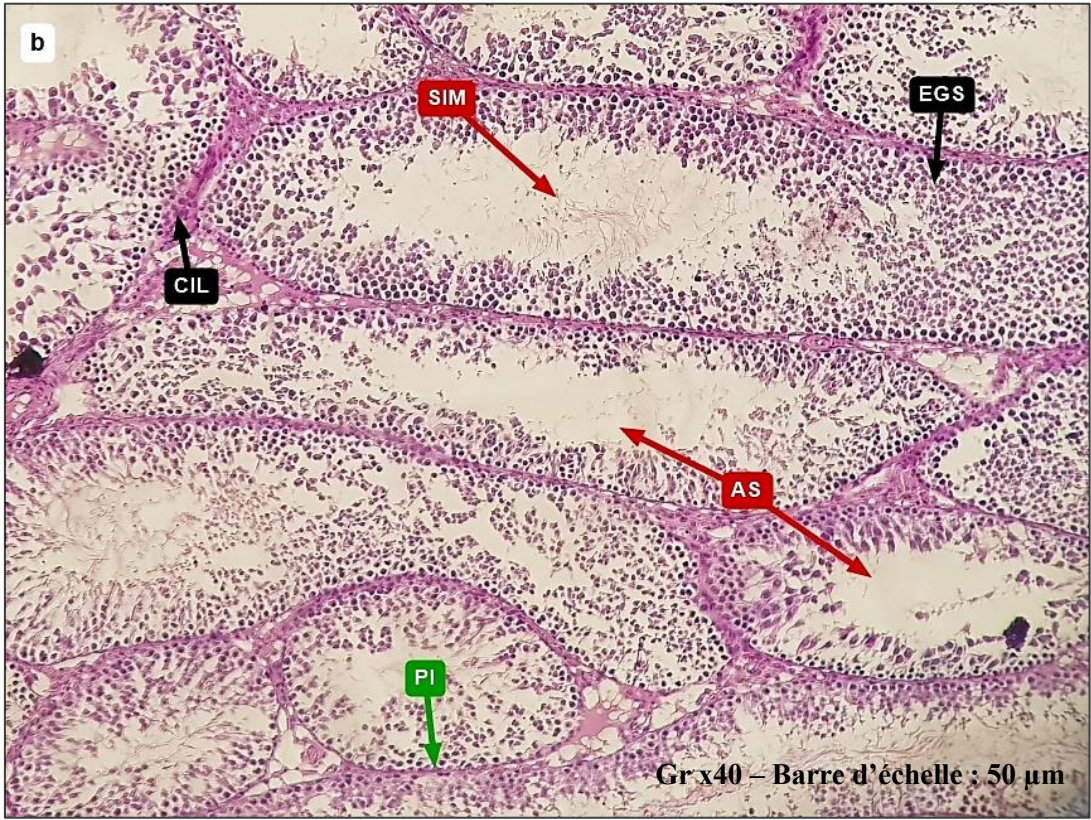
5.1 Au niveau des testicules

La planche (01) représente les modifications histologiques observée au niveau des testicules des rats témoins et traités par EE2, LNG et leur mixture EE2/LNG.

Le témoin présente une architecture histologique normale et une paroi intacte (**PI**) avec une spermatogenèse active et une cellularité interstitielle importante, les tubes séminifères sont bordés d'une couche de cellules de Sertoli, de cellules géantes et comblés par des spermatozoïdes, des spermatogonies alignées par un épithélium germinatif stratifié (**EGS**) indiquant un stade de développement des spermatozoïdes. On observe la présence de spermatozoïdes matures (**SM**) dans la lumière des tubules séminifères avec des cellules interstitielles de Leydig (**CIL**) situées entre les tubules séminifères (Planche 1a).

Cependant, nous constatons au niveau des testicules des rats traités par EE2 et LNG, un épithélium germinatif stratifié intact (**EGS**) des tubules séminifères, des cellules interstitielles de Leydig (**CIL**) non proéminentes et une paroi intacte (**PI**), mais ont un aspect hétérogène, avec une réduction du nombre ou absence totale de spermatozoïdes (**AS**) (quelques tubes séminifères dépourvus de spermatozoïdes), et la présence de spermatozoïdes immatures (**SIM**) et d'autres matures (**SM**) (Planche 1b, c).

Alors que le traitement par la mixture a mis en évidence un parenchyme testiculaire peu atrophique, et une paroi endommagée (**PE**) des tubes séminifères, avec une absence totale des spermatozoïdes (**AS**), une hyperplasie (augmentation du nombre) de cellules de Leydig dégénérés (**CLD**) dans le tissu interstitiel est observée, provoquant des tumeurs à cellules de Leydig (œdème), ainsi qu'une fibrose du tissu interstitiel (**FIT**) est observée (Planche 1d).



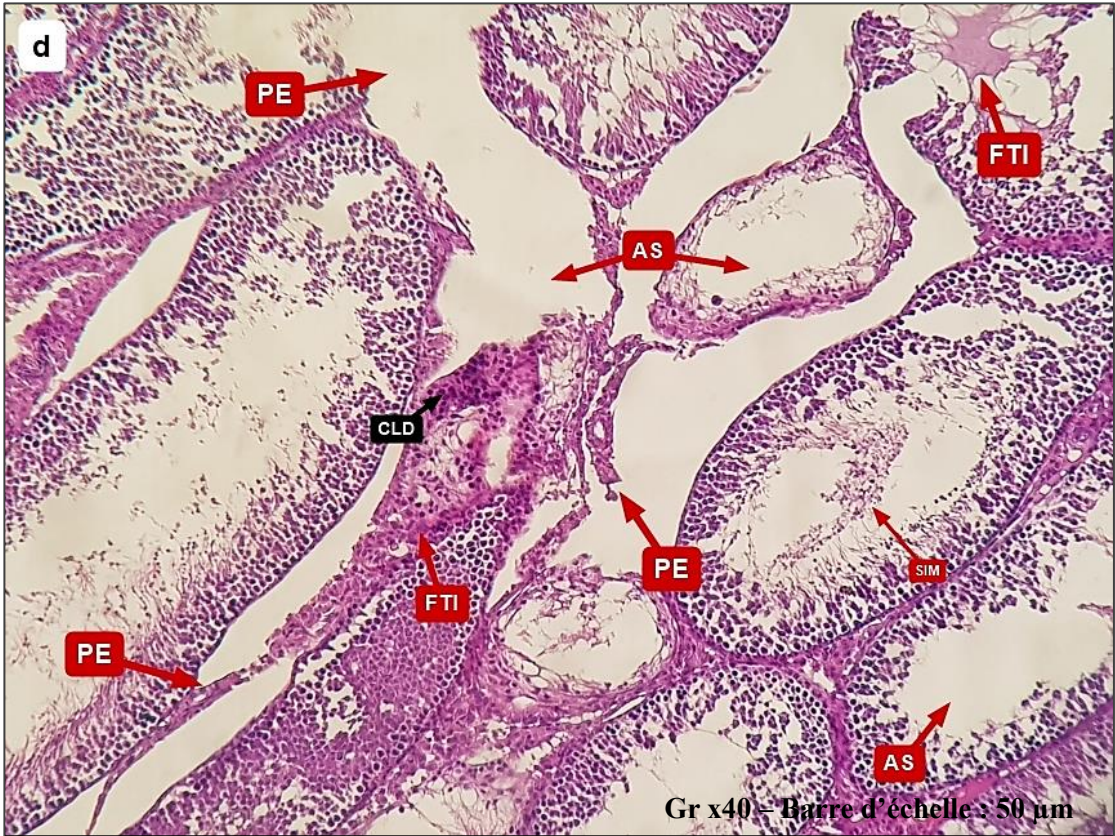
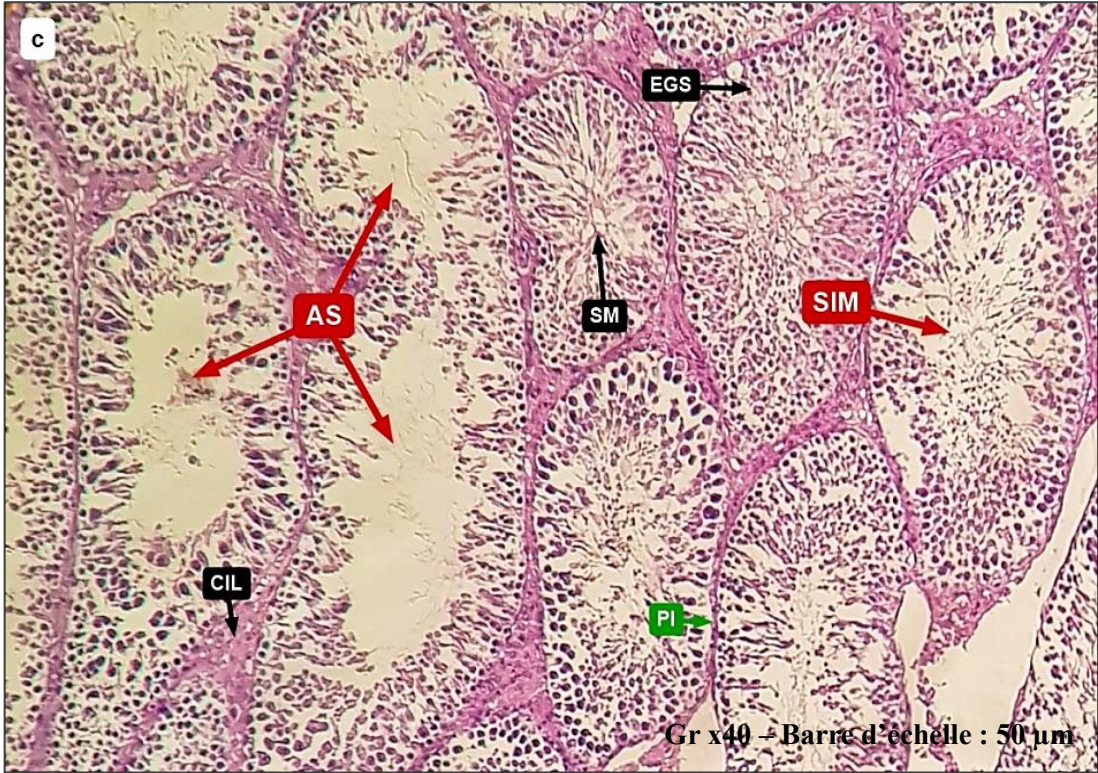


Planche 1 : Histologie des testicules de rats témoins et traités par EE2, LNG et EE2/LNG. (a)

Coupe de testicule d'un rat témoin montrant des tubes séminifères bien sains avec une spermatogenèse active et une cellularité interstitielle distinguée. (b) Coupe de testicule de rats traités par EE2, (c) Coupe de testicule de rats traités par LNG, et (d) Coupe de testicule de rats traités par la mixture EE2/LNG montrant une vacuolisation. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des tissus testiculaires (Gr 40x). Barre d'échelle : 50 µm.

5.2 Au niveau de l'épididyme

La planche (02) représente les changements histologiques des sections de l'épididyme des rats témoin et traités par EE2, LNG et leur mixture EE2/LNG.

Les sections d'épididymes des rats témoins ont un aspect normal avec des canaux épидидymaires (**CE**) bordés d'un épithélium pseudostratifié (**EPS**) de hauteur normale recouvert de stéréocils. Les lumières sont remplies de spermatozoïdes matures (**SM**) ainsi que de débris cellulaires (Planche 2a).

Il en est de même pour les rats traités par l'EE2, qui ont un aspect presque identique à la normale, avec quelques canaux montrant des spermatozoïdes immature (**SIM**) ou vides (**CEV**) (Planche 2b).

Chez les rats traités par le LNG, la densité des spermatozoïdes est relativement faible, les canaux épидидymaires sont déformés (**CED**) et contiennent des spermatozoïdes immatures (**SIM**) et d'autres presque vides (**CEV**) (Planche 2c).

La plupart des canaux épидидymaires dans le cas de la mixture EE2/LNG sont dépourvus de spermatozoïdes (canaux épидидymaires vides) (**CEV**) et comprennent plusieurs épithéliums germinaux détachés (**EGD**) avec de nombreuses formations de cellules géantes multinucléées (**CGM**) (Planche 2d).



Planche 2 : Histologie de l'épididyme des rats témoins et traités par EE2, LNG et EE2/LNG.

(a) Coupe d'épididyme d'un rat témoin montrant une structure histologique intacte et une densité normale de spermatozoïdes. (b) Coupe d'épididyme d'un rat traité par EE2. (c) Coupe d'épididyme d'un rat traité par LNG. (d) Coupe d'épididyme d'un rat traité par la mixture EE2/LNG. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine des tissus testiculaires (40x). Barre d'échelle : 50 μm .

IV. Discussion

Au fil des dernières décennies, les produits pharmaceutiques, bien qu'ayant sauvé des millions de vies, ont émergé comme une nouvelle catégorie de contaminants environnementaux. Un large éventail de contaminants émergents réglementés et d'origine synthétique présentent des concentrations de l'ordre du nanogramme ou du microgramme, qui sont relativement inférieures à celles d'autres contaminants présents dans les milieux aquatiques (Samal *et al.*, 2022), et peuvent avoir des effets nocifs chroniques et aigus sur la flore et la faune sauvage (Marsalek, 2008). Parmi ces substances émergentes, les contraceptifs hormonaux qui, même à des concentrations environnementales faibles, représentent toujours une grande menace pour les organismes vivants et l'écosystème (Patel *et al.*, 2019), tel est le cas pour l'éthinylestradiol (EE2) et lévonorgestrel (LNG) (Rodrigues *et al.*, 2021 ; Ríos-Sossa *et al.*, 2022). Ces hormones pharmaceutiques sont l'un des principaux groupes de contraceptifs qui peuvent avoir un effet toxique sur les organismes vivants, et doivent faire l'objet d'études en raison de leurs effets potentiels sur la santé humaine et environnementale, leur nature omniprésente et de leur dégradation difficile puisqu'ils persistent pendant de longues périodes dans l'environnement en raison de leurs structures stables (Adeel *et al.*, 2017). Avec l'augmentation de la consommation de ces hormones, ils se retrouvent dans les plans d'eau, et peuvent par conséquent, exercer un impact sur la fertilité (Sengupta *et al.*, 2018 ; Walker *et al.*, 2021).

Suite à nos investigations sur la toxicité potentielle que peuvent avoir ces polluants contraceptifs émergents seuls ou en mixture sur le modèle alternatif *D. magna*, ainsi que leur capacité à provoquer des perturbations potentielles des cycles reproducteurs, traduites par les malformations et la masculinisation de la descendance de ces dernières, nous avons entrepris cette étude sur la reprotoxicité de deux polluants contraceptifs émergents : l'éthinylestradiol (EE2) et du lévonorgestrel (LNG), chez les rats mâles *Wistar* adultes, ainsi que sur leurs éventuelles interactions avec l'activité endocrinienne. L'accent a été mis sur l'évaluation de l'impact des résidus de ces substances couramment consommées sur divers paramètres de reproduction, y compris les changements physiologiques, les niveaux hormonaux et lipidiques sériques, les caractéristiques du sperme et les changements histopathologiques dans les tissus testiculaires et épидидymaires, ainsi que sur le stress oxydatif que peuvent générer ces stéroïdes au niveau du tissu testiculaire.

La consommation de stéroïdes est reconnue comme l'un des facteurs aggravants de la détérioration du système reproducteur masculin (Lin *et al.*, 2020). C'est pourquoi nous avons

testé les deux hormones synthétiques EE2 et LNG dans un rapport de 1:5, similaire à celui détecté dans la plupart des pilules contraceptives de type 2 largement utilisées par les femmes. Cette étude a été menée sur une période de quatre semaines, avec une administration quotidienne par gavage des doses de 1 et 5 µg/kg de poids corporel (pc) d'EE2 et LNG, respectivement.

Dans un premier temps, nous avons mesuré la consommation alimentaire, le poids corporel des rats, ainsi que le poids de leurs organes reproducteurs tels que les testicules, l'épididyme et la vésicule séminale. Ces paramètres sont cruciaux dans les études toxicologiques, fournissant des indications importantes sur la croissance et le fonctionnement global de l'organisme des rats ainsi que leur virilité.

Étant donné que la présence de stéroïdes peut influencer la consommation alimentaire, et la croissance des animaux, il était important de suivre également ces paramètres. Cortés et Alfaro, (2014), suggèrent que l'augmentation observée du poids corporel et de la consommation alimentaire chez les animaux traités peut être attribuée à des perturbations hormonales affectant les processus métaboliques.

Comme indiqué dans nos résultats, nous avons montré une consommation alimentaire accrue suivie d'une prise de poids corporel significative chez les animaux traités par EE2 et/ou LNG par rapport aux témoins. En accord avec nos résultats, Seta *et al.* (2008) affirment qu'une exposition à de faibles doses orales à l'œstrogène pur EE2 au cours du développement modifie le comportement reproducteur et la physiologie chez les rats adultes. Dans ce contexte, l'étude menée par Vosges *et al.* (2008) affirme que la croissance des rats mâles exposés à de l'eau contaminée par des doses minimales d'EE2 est relativement plus élevée comparativement aux rats témoins. À ce sujet, un lien entre les œstrogènes sexuels et l'insuline dans les tissus cibles est mis en avant par Alonso *et al.* (2008), soulignant que des concentrations élevées de stéroïdes sexuels chez les rats peuvent contribuer à la résistance à l'insuline. Ainsi, Sitruk-Ware et Nath, (2013) indiquent que la composante œstrogénique des contraceptifs affecte la sensibilité à l'insuline, confirmé par une étude sur des rats montrant que l'œstradiol peut augmenter la sécrétion d'insuline au niveau des cellules bêta des îlots pancréatiques (Nadal *et al.*, 2001). González *et al.* (2002) confirment aussi que des doses élevées d'œstradiol détériorent le mécanisme glucidique et diminuent la sensibilité à l'insuline.

En ce qui concerne le progestatif LNG, des rapports suggèrent que la progestérone accélère le diabète chez les souris (Picard *et al.*, 2002), et certains progestatifs peuvent moduler

la libération d'insuline par le pancréas (Sitruk-Ware et Nath, 2013). Patiño *et al.* (2008) suggèrent que l'action des progestatifs sur la régulation glycémique pourrait aussi impliquer une action directe sur les cellules bêta pancréatiques, peut-être en modifiant le taux de libération d'insuline (Howell *et al.*, 1977), en diminuant le nombre de leurs récepteurs au niveau périphérique, ou une altération des mécanismes de réponse post-récepteur, conduisant à un hyperinsulinisme compensatoire. Effectivement, Wynn *et al.* (1979) ont démontré que le LNG est le plus puissant pour stimuler la sécrétion d'insuline, cependant, cette stimulation conduit ultérieurement à la diminution de sa sensibilité, induisant ainsi une résistance à l'insuline, par la suite une augmentation du stockage du glycogène dans le foie.

En somme, ces résultats suggèrent que les contraceptifs hormonaux, en particulier ceux contenant des œstrogènes et des progestatifs (EE2 et/ou LNG), peuvent influencer la régulation glycémique en déséquilibrant la sécrétion d'insuline et sa résistance, avec des conséquences potentielles tel que l'élévation des niveaux de faim, ce qui contribue à une suralimentation, traduite en un surpoids corporel (Woods *et al.*, 2006).

En revanche, une diminution significative est observée dans l'indice de poids des testicules, l'épididyme et de la vésicule séminale chez tous les rats traités par rapport aux témoins. De plus, l'indice de poids de ces organes sexuels a diminué significativement dans le groupe exposé à l'EE2 par rapport aux animaux traités par LNG et la mixture EE2/LNG. Ces résultats s'accordent avec plusieurs études qui ont déduit une diminution du poids de ces organes après exposition aux hormones EE2 et LNG, dont celle de Lin *et al.* (2020), qui ont rapporté que la vésicule séminale s'est significativement atrophiée après une exposition à l'EE2 pendant 7 jours. Les mêmes résultats sont observés par Iwas *et al.* (1995) après 4 semaines de traitement par l'EE2. Aussi, Atanassova *et al.* (2000) ; Sharpe *et al.* (2003) ont compté une diminution du poids et du volume des testicules des rats injectés par l'EE2.

Quant au LNG, administré seul ou en **mixture**, Stuart *et al.* (2022) ont rapporté que sa combinaison avec le **quinestrol** (un œstrogène synthétique **similaire** à l'EE2) a engendré des réductions significatives du poids des vésicules épидидymaires et séminales, expliquant ainsi, nos résultats à propos de la combinaison (EE2/LNG). Les preuves ci-dessus suggèrent que l'exposition à l'EE2 et LNG, seuls ou en combinaison, provoquent des dommages au système reproducteur masculin, entraînant une réduction de la fertilité (Lin *et al.*, 2020). En effet, puisque la taille des testicules et de l'épididyme, ainsi que leurs fonctions, sont souvent corrélées avec le taux de la testostérone (Cameron, 2007 ; Preston *et al.*, 2012), **nous suggérant**

que la réduction du poids des deux organes pourrait être due à l'affaiblissement de la quantité de testostérone plasmatique.

Les contraceptifs oraux peuvent induire des changements dans le métabolisme des lipides et des glucides, y compris une augmentation des taux sériques de **triglycérides**, de **cholestérol** des lipoprotéines de basse densité (**LDL**) et d'insuline, ainsi qu'une diminution des taux de cholestérol des lipoprotéines de haute densité (**HDL**) (Godsland *et al.*, 1990 ; Wiegratz *et al.*, 1998).

Le cholestérol est une molécule clé, transporté par des lipoprotéines dans le sang, et impliquée dans la stéroïdogénèse, servant de précurseur à la production d'hormones stéroïdiennes (Walker *et al.*, 2021). Parmi les lipoprotéines, les lipoprotéines de basse densité (LDL) qui transportent environ 75 % du cholestérol total qui est conduit par les particules de lipoprotéines de haute densité (HDL) (Jacobson et coll., 2015 ; Zhang *et al.*, 2022).

Les triglycérides sont la principale forme de stockage des acides gras dans les cellules et en circulation (Alves-Bezerra et Cohen, 2017 ; Duran et Pradhan, 2021) ; le foie est l'organe central du métabolisme de ces acides gras qui proviennent de la biosynthèse plasmatique (Zhang *et al.*, 2022). Des taux élevés de triglycérides, connus sous le nom d'hypertriglycéridémie, et sont souvent associés avec des anomalies métaboliques, telles que l'obésité, la résistance à l'insuline et un faible taux de cholestérol à lipoprotéines de haute densité (HDL) (également appelé bon cholestérol) (Talayero et Sacks, 2011 ; Nordestgaard, 2016).

Un lien potentiel entre les lipides sériques et la fertilité humaine est possible, car le cholestérol est la principale source de synthèse des stéroïdes et androgènes (tel que la testostérone), et joue un rôle déterminant dans la stéroïdogénèse et la spermatogénèse (Gwynne *et al.*, 1982).

Nos résultats concernant les profils lipidiques sérique ont révélé une diminution significative du **cholestérol** total exclusivement avec les rats exposés à l'EE2 pendant quatre semaines par rapport aux témoins, et une diminution du taux **HDL** lors du traitement avec l'EE2 et la mixture EE2/LNG, respectivement. Ainsi, nous avons constaté une augmentation significative du **LDL** lors du traitement par EE2 et la mixture. Cependant, Nous avons également mis en évidence une augmentation du taux de **triglycérides** chez tous les rats traités par rapport aux témoins, particulièrement chez les rats traités par l'EE2.

Plusieurs travaux sont en accord avec nos résultats, Dolgov *et al.* (1986) ont constaté une diminution des taux de cholestérol total chez des rat *Wistar* mâles après seulement 3 jours d'exposition à l'EE2. Ainsi, selon Weinstein *et al.* (1986), l'EE2 a réduit les concentrations du cholestérol total et d'apolipoprotéine A-I dans le sérum des rats femelles et mâles. Le cholestérol est un précurseur essentiel interférant dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, y compris les androgènes comme la testostérone (Walker *et al.*, 2021). Lorsque le taux de cholestérol augmente dans l'organisme, cela peut fournir un substrat en excès, peut être convertie en hormones stéroïdiennes, à travers un processus connu sous le nom de stéroïdogénèse, par une série de réactions enzymatiques dans des cellules spécialisées telles que les cellules de Leydig dans les testicules (Schug *et al.*, 2011 ; Rone *et al.*, 2012). Par conséquent, les perturbations de la capacité du testicule à former des stéroïdes en excès peuvent entraîner des anomalies du développement, et des dysfonctionnements conduisant à la stérilité (Walker *et al.*, 2021). Une autre hypothèse suggère que L'EE2 peut altérer la conversion du cholestérol pendant la biosynthèse de la testostérone en inhibant l'activité de l'enzyme P450_{sc} (P450 side-chain cleavage enzyme) dans les cellules de Leydig, ce qui affecte le transfert du cholestérol plasmatique dans les mitochondries (Lin *et al.*, 2020).

En ce qui concerne l'augmentation du taux de LDL, des études ont confirmé que l'EE2 à des doses pharmacologiques infimes augmente considérablement la synthèse et l'expression du récepteur des LDL dans le foie des rats mâles (Guyton, 2006 ; Al-Fartosi *et al.*, 2017). Cependant, **la diminution du taux sérique de HDL** pourrait être attribuable à une hypertriglycéridémie influencée par un métabolite réactif formé lors de la biotransformation (Maralla *et al.*, 2012 ; Talbi, 2020).

Par rapport à la mixture (EE2/LNG), l'étude de Al-Fartosi *et al.* (2017) corrobore nos résultats, montrant qu'une administration orale d'un contraceptif oestroprogestatif qui contient du LNG et de l'EE2 à des rats mâles pendant 60 jours, induit une diminution significative du niveau de **HDL**, avec une baisse non significative du **cholestérol**. Par conséquent, Godsland *et al.* (1990) ont déduit que les contraceptifs oraux combinés peuvent augmenter le taux de cholestérol LDL. En particulier, la **progestérone** contenue dans ces contraceptifs combinés peut aussi réduire le HDL en augmentant l'activité de la lipase hépatique.

L'augmentation des triglycérides chez les rats exposés aux deux hormones individuelles ainsi qu'à leur mélange est plus prononcée, surtout chez ceux exposés à l'EE2. Des travaux affirment que l'EE2 augmente la sécrétion hépatique de lipoprotéines riches

en triglycérides (Schaefer *et al.*, 1983). Ainsi, des études ont démontré que le traitement par EE2 est associé à une résistance à l'insuline, à une dérégulation du glucose et à une augmentation des taux de triglycérides sérique (Michael et Olatunji, 2018 ; Adeyanju *et al.*, 2018 ; Olaniyi *et al.*, 2021). En plus, Jin *et al.* (2014) ont rapporté une augmentation sérique des acides gras libres (AGL), une accumulation de lipides hépatiques et une induction de la teneur en triglycérides dans les souris mâles exposés à l'EE2 ; et ont expliqué que cette augmentation est due à une surproduction d'ARNm d'un certain nombre de gènes clés impliqués à la fois dans la voie de synthèse et de transport des AGL à partir du sang. L'augmentation de la quantité d'AGL est partiellement consommée sous forme d'énergie par β -oxydation dans les mitochondries, et une partie est utilisée pour synthétiser les triglycérides dans le foie, ce qui entraîne une augmentation des niveaux de triglycérides et une accumulation de lipides sériques (Jin *et al.*, 2014).

Les effets néfastes observés par les perturbateurs endocriniens sur le système reproducteur masculin augmentent de jour en jour (Ghosh *et al.*, 2022). Il est évident que les stéroïdes synthétiques exercent leurs effets en imitant les hormones endogènes, en antagonisant les hormones normales et en modifiant le schéma naturel de synthèse ou de métabolisme hormonal par l'activation ou la répression des récepteurs hormonaux nucléaires, y compris les récepteurs des œstrogènes (ER), les récepteurs des androgènes (AR), les récepteurs thyroïdiens (TR), les récepteurs rétinoïdes, et autres (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009 ; Jin *et al.*, 2014). Par conséquent, ils perturbent différents paramètres hormonaux liés aux systèmes endocrinien et reproducteur, ce qui se traduit par un blocage de la spermatogenèse (Scholz et Gutzeit, 2000 ; Wang *et al.*, 2010).

La contraception masculine hormonale est obtenue par la suppression des hormones LH et FSH, et une diminution de la testostérone intra-testiculaire ce qui, à son tour, conduit à la suppression fiable et réversible de la spermatogenèse, provoquant une azoospermie (absence totale de spermatozoïde dans leur sperme) ou une oligospermie sévère (une concentration anormalement faible en spermatozoïdes dans le sperme) (Lue *et al.*, 2009).

La spermatogenèse implique des interactions cellule-cellule et l'expression des gènes orchestrée par les hormones LH et FSH. La FSH régule la prolifération et la maturation des cellules germinales de manière indépendante et en combinaison avec la LH, qui stimule la production de de la testostérone (McLachlan *et al.*, 2002 ; Anderson et Baird, 2002). En conséquence, la testostérone est essentiellement considérée comme nécessaire à la fois pour la

virilisation des organes génitaux externes masculins et, en combinaison avec la FSH, elles déclenchent et maintiennent une spermatogenèse efficace (Oduwole *et al.*, 2021).

Nos résultats ont montré un effondrement hormonal très hautement significatif des concentrations sériques de la FSH, LH, et la testostérone, dans tous les groupes traités par rapport aux témoins, cependant, ce déficit est plus prononcé dans les groupes exposés à l'EE2 et la mixture EE2/LNG, respectivement, après quatre semaines.

Les effets de l'EE2 sur les niveaux d'hormones LH et testostérone sont étudiés chez des rats mâles dans une étude réalisée par Lin *et al.* (2020), et ont révélé une réduction des niveaux plasmatiques de LH associée à une régulation négative de l'expression du récepteur de l'hormone lutéinisante (LHR) dans les cellules de Leydig, traduite par une diminution des niveaux plasmatiques de testostérone chez les rats mâles.

L'EE2 perturbe la régulation hormonale de la production de testostérone en affectant des voies stéroïdogènes activées par le récepteur de LH et le calcium, et par conséquent, cela inhibe l'étape initiale de la stéroïdogénèse en supprimant l'expression de la protéine régulatrice aigüe stéroïdogéniques (StAR) et l'activité de l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du P450_{scc}, entraînant une production réduite de prégnénolone (précurseur chimique naturel de l'ensemble des hormones stéroïdiennes) et donc des niveaux diminués de testostérone et de dihydrotestostérone (DHT) (Kumar *et al.*, 1994 ; Garcia-Reyero *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 2020). D'autres études sont en accords avec nos résultats concernant le niveau de testostérone et FSH sériques, ainsi, Atanassova *et al.* (2000) ; Sharpe *et al.* (2003) ont observé une réduction de ces hormones après l'administration de l'EE2.

En ce qui concerne la combinaison EE2/LNG, une étude récente effectuée par (Su *et al.*, 2019) sur des souris suisses mâles adultes, a rapporté que trois ratios de différentes doses oestroprogestatifs de (quinestrol/LNG) ont tous réduit les taux sériques de testostérone, FSH et LH. De même, une mixture de bisphénol/EE2 a engendré une baisse significative des taux sériques de testostérone et LH dans des rats mâles (Jeminiwa *et al.*, 2021).

La qualité des spermatozoïdes est indirectement altérée, comme démontré dans nos conclusions précédentes, l'altération notable des profils lipidiques et hormonaux, associée à l'atrophie des organes reproducteurs tels que les testicules, l'épididyme et la vésicule séminale, suggère que ces changements auront certainement des répercussions sur la fonction testiculaire et donc, la qualité de la spermatogenèse. Cette dernière, à son tour, impliquée dans la détermination des aspects ultimes de la fertilité masculine (Walker *et al.*, 2021).

Chez l'homme, de plus en plus de recherches suggèrent que les perturbateurs endocriniens tel que les hormones synthétiques ont des conséquences préjudiciables sur le système reproductif, provoquant une altération de la qualité du sperme et une dysgénésie testiculaire (Ghosh *et al.*, 2022). C'est pour cette raison que cette étape de notre étude est consacrée à l'examen approfondi du produit final de ce processus complexe : les spermatozoïdes. Cela implique la considération de deux éléments essentiels, à savoir la concentration et la motilité, qui sont cruciaux pour évaluer la qualité de la reproduction masculine.

Dans la présente étude, nos résultats démontrent que l'administration orale de doses individuelles d'EE2 et de LNG a entraîné une diminution considérable de la concentration des spermatozoïdes, réduisant celle-ci à près de la moitié par rapport aux témoins, en particulier avec l'utilisation de leur combinaison. Ainsi, une dégradation remarquable de la mobilité des spermatozoïdes induite par ces deux hormones individuellement par rapport au témoin, mais toujours plus prononcée lors de l'administration de leur mixture.

Dans ce contexte, Walker *et al.* (2021) ont rapporté que l'exposition aux perturbateurs endocriniens est liée à une altération de la motilité des spermatozoïdes, à travers la perturbation de leur intégrité structurelle en affectant la fonction mitochondriale (qui fournit de l'énergie pour le mouvement des spermatozoïdes), ainsi, en interférant avec les voies de signalisation à divers stades développementaux essentielles à leur motilité. En effet, une exposition de rats mâles à l'EE2 du 7^{ème} jour prénatal au 18^{ème} jour postnatal a entraîné une diminution des poids des testicules et des vésicules séminales, induisant une réduction de la concentration des spermatozoïdes à l'âge adulte (Howdeshell *et al.*, 2008a). De manière similaire, les expositions à l'EE2 sont associées à une maturation sexuelle altérée (Nash *et al.*, 2004), une fécondité réduite (Fenske *et al.*, 2005) et à une perturbation de la spermatogenèse (Xu *et al.*, 2008). De plus, beaucoup d'effets du Bisphénol A (BPA) et du Bisphénol S (BPS) rapportés dans la littérature sont associés aux voies de signalisation des œstrogènes de manière similaire à l'EE2 (Program, 2018). Des études ont montré que l'administration de BPS pendant 28 jours diminue la concentration quotidienne de spermatozoïdes et a augmenté les dommages à l'ADN des spermatozoïdes chez des rats adultes (Ullah *et al.*, 2017).

Concernant LNG, un essai contrôlé randomisé ayant recruté 36 hommes blancs a montré que la combinaison de LNG et d'énanthate de testostérone (médicament androgène et stéroïde) entraîne une incidence plus élevée d'azoospermie et d'oligospermie sévère par rapport à l'énanthate de testostérone seul (Chao *et al.*, 2014).

Jeminiwa *et al.* (2021) stipulent que la combinaison EE2 + BPS + BPA augmente l'expression de Dhh (Desert Hedgehog protein, nécessaire pour la progression des cellules germinales à travers le processus de spermiogenèse), notant que la signalisation de Dhh est altérée à travers sa surexpression, et peut affecter par la suite la fonction des cellules de Sertoli, perturber la spermatogenèse et diminuer le nombre de spermatozoïdes primaires (La Sala *et al.*, 2015). Ainsi, l'implication de ces produits chimiques agissant seuls ou en combinaison ont la capacité d'interférer avec les interactions paracrines (mode de signalisation) entre les cellules testiculaires et, par conséquent, un retard du développement testiculaire, siège principal de la maturation des spermatozoïdes (Jeminiwa *et al.*, 2021). Une autre étude menée par (Su *et al.*, 2019) confirme nos résultats, notant que l'administration d'une mixture oestroprogestative similaire à la nôtre de LNG/quinestrol à des souris suisses mâles adultes, réduit significativement la densité et la mobilité des spermatozoïdes, expliquant ce phénomène par la capacité des œstrogènes à supprimer la spermatogenèse en bloquant l'axe HPG (Sharpe *et al.*, 2003), et la progestérone qui faiblement peut affecté la production d'androgènes (Anderson and Baird, 2002).

Ainsi, plusieurs hypothèses concernant la diminution de la qualité des spermatozoïdes sont associées aux bilans lipidiques et hormonaux étudiés. Nos résultats semblent appuyer l'hypothèse émise par Talbi *et al.* (2022) qui expliquent que la baisse de la concentration des spermatozoïdes est corrélée à la réduction significative de la testostérone et du poids des testicules, qui sont les responsables majeurs de la production de ces derniers. Ainsi, le dysfonctionnement de la spermatogenèse, endommagée par l'altération des niveaux sériques d'hormones sexuelles masculines (LH, FSH et testostérone) chez les rats pourrait éventuellement indiquer une infertilité en affectant les voies stéroïdogènes (Dissanayaka *et al.* 2019). Finalement, la diminution du taux de cholestérol, un précurseur essentiel intervenant dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, notamment la testostérone, peut provoquer des perturbations dans la capacité des testicules à produire des stéroïdes endogènes en quantité excessive, conduisant ainsi à la stérilité (Mobisson *et al.*, 2023).

Étant donné que la spermatogenèse et la stéroïdogénèse des cellules de Leydig testiculaires sont vulnérables au stress oxydatif, la faible abondance en oxygène qui caractérise ce tissu peut constituer un élément important des mécanismes par lesquels les testicules se protègent des dommages causés par les radicaux libres (Chen *et al.*, 2005). De plus, les testicules contiennent une gamme élaborée d'enzymes antioxydantes et de piègeurs de radicaux libres pour garantir

que les fonctions spermatogéniques et stéroïdogéniques de cet organe jumeau ne soient pas impactées par le stress oxydatif (Aitken *et al.*, 2008).

Malgré la protection antioxydante dont bénéficient ces organes, une grande variété de facteurs endogènes et exogènes sont connus pour perturber ces défenses et générer un état de stress oxydatif (Aitken *et al.*, 2008). Dans ce travail, nous avons examiné les changements possibles des biomarqueurs du stress oxydatif CAT, GSH et MDA au niveau du tissu testiculaire.

Seule la combinaison EE2/LNG a entraîné une réduction prononcée de l'activité CAT et des niveaux de GSH, ainsi qu'une forte peroxydation lipidique traduite par l'augmentation significative des taux de MDA.

Peu d'études ont été réalisées pour enquêter sur l'impact des combinaisons d'hormones synthétiques et le stress oxydatif au niveau des testicules. Aitken et Roman, (2008) ont démontré que la suppression de la testostérone intra-testiculaire des rats mâles par des stéroïdes exogènes, y compris des œstrogènes, entraîne également la suppression de l'expression des enzymes antioxydantes CAT et GSH, provoquant une augmentation concomitante des dommages par peroxydation, la perturbation de la spermatogenèse et une augmentation de l'apoptose des cellules germinales. Aussi, Chaki *et al.* (2006) ont confirmé qu'une administration d'œstradiol à des rats mâles pendant 4 semaines entraîne une augmentation significative de la peroxydation avec une chute considérable des activités de la superoxyde dismutase (SOD) et de la CAT. Une autre étude effectuée par Shen *et al.* (2011) sur le rongeur *Meriones unguiculatus*, confirme qu'une administration de quinessrol pendant 15 jours augmente les niveaux de MDA dans leurs tissus testiculaires causé par un stress oxydatif.

Les modifications de la concentration de ces enzymes antioxydantes testiculaire chez les rats traités par rapport aux témoins peuvent être attribuées à la modification de l'architecture cellulaire du testicule (Mobisson *et al.*, 2023). En effet, le stress oxydatif affecte la fonction spermatique en altérant la fluidité membranaire, la perméabilité et en affectant la compétence fonctionnelle des spermatozoïdes (Collodel *et al.*, 2015). Ainsi, il est possible que les toxicités reproductives observées dans cette étude soient dues au stress oxydatif résultant d'une diminution des enzymes antioxydantes, ce qui pourrait altérer le processus de spermatogenèse.

Il faut préciser que la régulation de la spermatogenèse englobe un ensemble complexe d'interactions endocrines, paracrines et métaboliques qui impliquent les cellules de Sertoli, de Leydig, périvitubulaires et germinales, maintenant la prolifération et la différenciation des

cellules spermatogénèse (Saez, 1994 ; Anderson et Baird, 2002 ; McLachlan *et al.*, 2002). La plus importante de ces voies de régulation implique l'axe HPG, qui coordonne les fonctions essentielles grâce à l'action des glycoprotéines hétérodimériques, des hormones FSH et LH, ainsi qu'au maintien d'une concentration élevée de testostérone intra-testiculaire (Oduwole *et al.*, 2021).

Dans cette étude, nous avons examiné des coupes histologiques des deux sièges principaux de la production et la maturation des spermatozoïdes, à savoir les testicules et l'épididyme.

Nous avons mis en évidence que les testicules des rats traités par EE2 et LNG individuellement présentent un aspect hétérogène avec une réduction focale du nombre de spermatozoïdes (quelque tubes dépourvus de spermatozoïdes). Ainsi, les rats exposés à la mixture révèlent un parenchyme peu atrophique avec une réduction importante des spermatozoïdes dans la plupart des tubules séminifères. De plus, les sections d'épididymes des rats traités par l'EE2 seul révèlent un aspect presque identique à celui du témoin. Quant à ceux exposés à LNG seul ou en mélange avec l'EE2, ont les canaux épидидymaires presque dépourvus de spermatozoïdes matures (contenant que des spermatozoïdes immatures).

Il est notable que les altérations histologiques observées sont moins graves chez les rats traités par les deux hormones individuellement que chez ceux exposés à la combinaison. Ceci confirme nos résultats selon lesquels l'activité des biomarqueurs du stress oxydatif CAT et GSH dans les testicules est désactivée lorsqu'ils sont exposés séparément à l'EE2 et au LNG. De plus, l'histologie montre des tissus intacts avec une matrice cellulaire préservée et un aspect morphologique normal.

Ainsi, ces hormones n'ont pas provoqué d'attaques chimiques sur les cellules ni entraîné des dommages significatifs, bien qu'elles aient altéré d'autres équilibres lipidiques et hormonaux, comme le révèlent nos résultats. Ceci est expliqué par le fait que les hormones appliquent leurs effets par le phénomène **d'hormèse**, où des doses élevées normalement toxiques et génératrices de stress, ne se montrent pas délétères, contrairement à leurs faibles doses, bien élucidés dans la féminisation des poissons mâles, l'immobilisation des néonates des crustacés d'eau douce *D. magna* (Belhamzaoui *et al.*, 2023), et l'interférence avec le système endocrinien chez l'homme (Budeli *et al.*, 2022). En conséquence, le métabolisme peut être affecté par l'assimilation des œstrogènes et la progestérone en raison de leurs affinités spécifiques, lesquelles pourraient agir en antagonisant les hormones normales, et par conséquent, altérer le schéma naturel de synthèse ou de métabolisme hormonal (Jin *et al.*, 2014). Cela est confirmé par la diminution de la

concentration et de la qualité des spermatozoïdes à l'intérieur des cellules génératrices de spermatozoïdes, où l'on constate qu'elles sont légèrement vides avec EE2 et LNG séparées, voire totalement vides, avec la combinaison par rapport aux témoins.

Certaines recherches ont mis l'accent sur le fait que les perturbateurs endocriniens, en particulier le BPA, similaire dans ces voies de signalisation à l'EE2 (Program, 2018), inhibent la production d'ATP, probablement par une perturbation mitochondriale qui entraîne une altération de la motilité des spermatozoïdes (Rahman *et al.*, 2017). Les perturbateurs endocriniens entraînent un milieu hormonal anormal qui entraîne une aneuploïdie des spermatozoïdes et des effets transgénérationnels potentiels (Ghosh *et al.*, 2022). Zhang *et al.* (2019) affirment que l'exposition aux perturbateurs endocriniens entraîne les lésions des cellules de Sertoli soit en augmentant l'apoptose des spermatocytes, soit en régulant à la hausse les protéines apoptotiques. Les cellules de Sertoli nourrissent le développement des spermatocytes, absorbent l'excès de cytoplasme et accélèrent la spermatogenèse liée à la testostérone, et si la cellule de Leydig n'a pas réussi à produire de la testostérone, cela peut entraîner l'effondrement de la transcription du gène médié par le récepteur des androgènes lié à la testostérone qui est nécessaire à la spermatogenèse (Ghosh *et al.*, 2022). Selon Lue et al. (2009), l'association de LNG (lévonorgestrel) et d'undécanoate de testostérone (TU) entraîne une suppression plus rapide et plus profonde de la spermatogenèse que la testostérone seule. Cet effet est probablement dû à une suppression marquée du CYP17A1 dans les cellules de Leydig, induite par une suppression plus importante des gonadotrophines (LH et FSH). Les gonadotrophines stimulent normalement les cellules de Leydig à produire de la testostérone via le CYP17A1. La réduction des taux de gonadotrophines due au traitement combiné par LNG et TU entraîne une diminution correspondante de la production de testostérone (Lue *et al.*, 2009). Cette réduction de la testostérone est essentielle au maintien de la spermatogenèse, ce qui conduit à la suppression spermatogénique observée. Par conséquent, l'association de LNG et de TU peut supprimer efficacement la spermatogenèse par un double mécanisme impliquant des voies hormonales et enzymatiques dans les testicules.

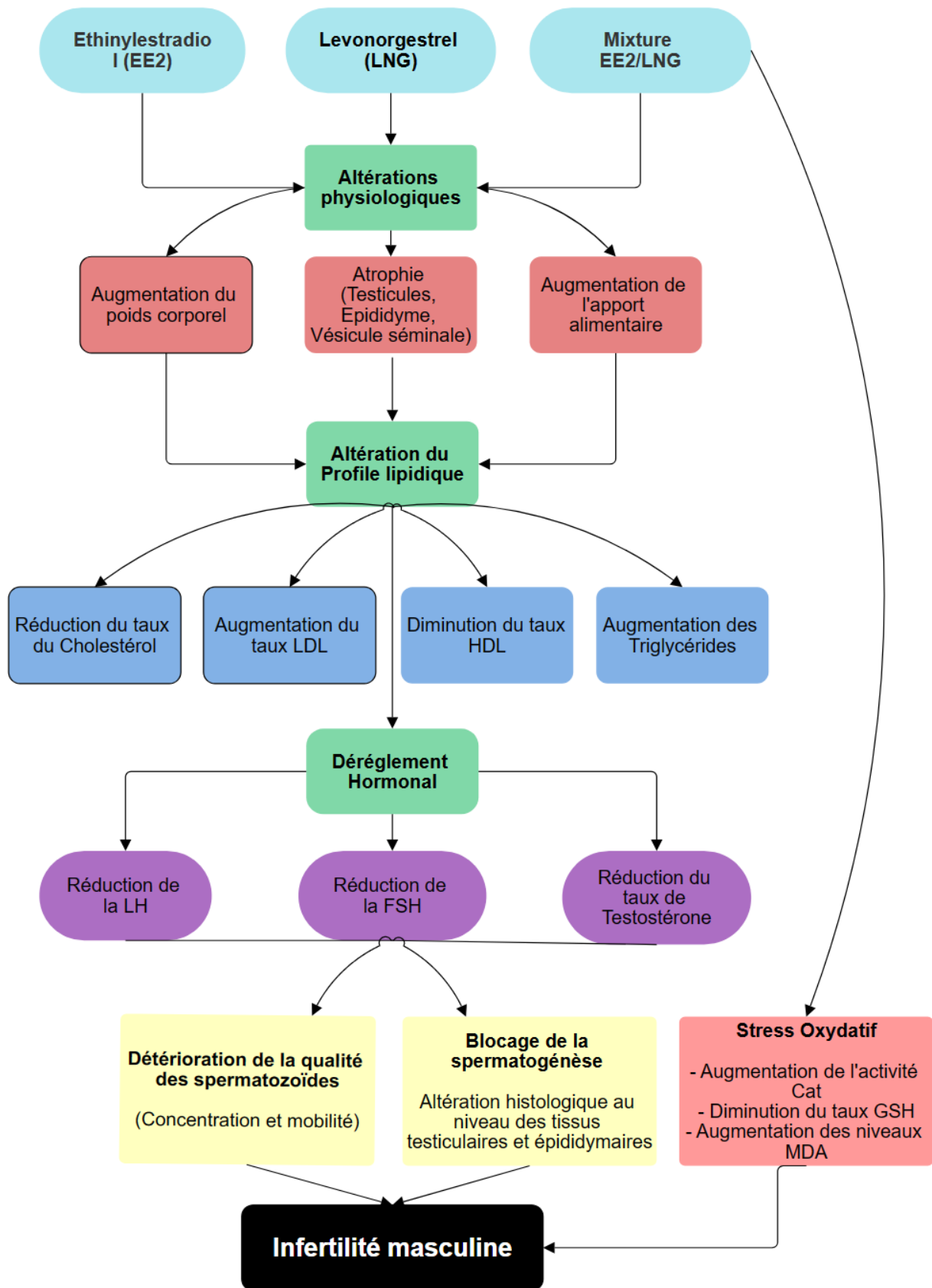


Figure 54 : Récapitulatif des impacts induits par les hormones synthétiques EE2, LNG et leur mixture sur la fertilité masculine des rats mâles *Wistar*

V. Conclusion

En conclusion, l'étude met en lumière une reprotoxicité significative induite par les faibles concentrations d'EE2 et/ou LNG chez les rats mâles traduite par leur impact néfaste sur la fertilité masculine, comme démontré à travers les différentes altérations des profils lipidiques, hormonaux, et histopathologiques, associée à l'atrophie des organes génitaux, ce qui suggère que ces changements sont responsable du blocage de la spermatogenèse, entraînant des répercussions sur la production et la maturation des spermatozoïdes.

Ainsi, en réponse à notre question à propos des faibles concentrations, nous confirmons leur toxicité illustrant ainsi, le phénomène d'hormèse. De plus, l'effet du mélange est significativement plus prononcé en raison de la synergie entre les deux molécules et du puissant caractère de l'œstrogène, générant un stress oxydatif au niveau des testicules, se manifestant par une désintégration du tissu testiculaire.

Les changements observés dans divers paramètres soulignent la nécessité de recherches complémentaires pour élucider les mécanismes sous-jacents. Les études futures devraient explorer les relations dose-réponse potentielles, les effets à long terme et la réversibilité des altérations observées. De plus, l'examen des voies moléculaires impliquées dans les réponses hormonales, lipidiques et de stress oxydatif contribuerait à une compréhension plus complète de la toxicité reproductive de ces hormones contraceptives, notamment l'EE2 et sa combinaison avec d'autres substances émergentes dans l'environnement.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

"Qu'en est-il de la faune sauvage ?" Cette interrogation capitale s'érige au cœur de notre réflexion, tracée au fil des résultats de cette investigation qui s'est penchée sur les impacts dévastateurs des hormones contraceptives éthinylestradiol (EE2) et lévonorgestrel (LNG) sur la biodiversité. Nos recherches approfondies, tant *in vitro* avec *Daphnia magna* qu'*in vivo* avec les rats, révèlent un tableau alarmant.

Notre étude dévoile un impact significatif de ces hormones sur la fertilité des rats mâles, illustrant ainsi la vulnérabilité des mammifères supérieurs à ces composés émergents. De plus, la masculinisation de la descendance de *D. magna*, révèle la perturbation potentielle des cycles reproducteurs chez des organismes cruciaux pour l'équilibre écologique aquatique.

Les effets constatés sur ces deux groupes d'organismes, bien que préoccupants en eux-mêmes, soulèvent une question beaucoup plus vaste et inquiétante : quel est l'impact de ces hormones sur l'ensemble de la faune sauvage, au-delà des rats et des daphnies ? Les répercussions potentielles de ces composés sur diverses espèces, qu'elles soient terrestres ou aquatiques, demeurent une préoccupation majeure.

Par conséquent, l'interférence de ces hormones avec les mécanismes hormonaux et les réponses reproductives de divers organismes suggère une menace généralisée pour la biodiversité. Ainsi, la persistance de ces substances dans l'environnement, combinée à leurs effets délétères observés, pourrait contribuer à des perturbations écologiques significatives et même à des risques d'extinction pour certaines espèces.

En conclusion, cette thématique souligne l'urgence de poursuivre les recherches sur les impacts écologiques des hormones contraceptives émergentes, et l'exploration de leur influence sur l'ensemble de la faune sauvage devrait être une priorité, avec des implications cruciales pour la conservation de la biodiversité et la préservation des écosystèmes. Face à ces défis, des mesures préventives et une sensibilisation accrue s'imposent pour minimiser les conséquences potentielles sur notre environnement naturel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abbott, W. S. (1925).** Abbott's formula. *J. Econ. Entomol*, 18, 267-268.
- Abdel-Daim, M. M., Abd Eldaim, M. A., & Hassan, A. G. (2015).** Trigonella foenum-graecum ameliorates acrylamide-induced toxicity in rats: Roles of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and DNA damage. *Biochemistry and Cell Biology*, 93(3), 192-198.
- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017).** Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment international*, 99, 107-119.
- Adeyanju, O. A., Soetan, O. A., Soladoye, A. O., & Olatunji, L. A. (2018).** Oral hormonal therapy with ethinylestradiol–levonorgestrel improves insulin resistance, obesity, and glycogen synthase kinase-3 independent of circulating mineralocorticoid in estrogen-deficient rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(6), 577-586.
- Africander, D., Verhoog, N., & Hapgood, J. P. (2011).** Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids*, 76(7), 636-652.
- Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008).** Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*, 154-171.
- Al-Fartosi Khalid G., Mohannad A. Gati, & Afrah N. Faris. (2017).** Effect of oral contraceptive on thyroid hormones and lipid profile of male rats. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 167–170.
- Almeida, Â., Silva, M. G., Soares, A. M., & Freitas, R. (2020).** Concentrations levels and effects of 17alpha-Ethinylestradiol in freshwater and marine waters and bivalves: A review. *Environmental research*, 185, 109316.
- Al-Odaini, N. A., Zakaria, M. P., Yaziz, M. I., & Surif, S. (2010).** Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1217(44), 6791-6806.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Carrera, M. P., Cederroth, C. R., Baquie, M., Gauthier, B. R., ... & Nadal, A. (2008).** Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER α . *PloS one*, 3(4), e2069.
- Alves, M. G., Rato, L., Carvalho, R. A., Moreira, P. I., Socorro, S., & Oliveira, P. F. (2013).** Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cellular and molecular life sciences*, 70, 777-793.
- Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2017).** Triglyceride metabolism in the liver. *Comprehensive physiology*, 8(1), 1.

- Andaluri, G., Suri, R. P., & Kumar, K. (2012).** Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost. *Environmental Monitoring and Assessment*, *184*, 1197-1205.
- Anderson, R. A., & Baird, D. T. (2002).** Male contraception. *Endocrine reviews*, *23*(6), 735-762.
- Ankley, G. T., Coady, K. K., Gross, M., Holbech, H., Levine, S. L., Maack, G., & Williams, M. (2018).** A critical review of the environmental occurrence and potential effects in aquatic vertebrates of the potent androgen receptor agonist 17 β -trenbolone. *Environmental toxicology and chemistry*, *37*(8), 2064-2078.
- Aris, A. Z., Shamsuddin, A. S., & Praveena, S. M. (2014).** Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment international*, *69*, 104-119.
- Atanassova, N., McKinnell, C., Turner, K. J., Walker, M., Fisher, J. S., Morley, M., ... & Sharpe, R. M. (2000).** Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology*, *141*(10), 3898-3907.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., & Tyagi, R. D. (2007).** Présence et devenir des hormones stéroïdiennes dans les stations de traitement des eaux usées. *Revue des Sciences de l'Eau*, *20*(1), 89-108.
- Avberšek, M., Šömen, J., & Heath, E. (2011).** Dynamics of steroid estrogen daily concentrations in hospital effluent and connected waste water treatment plant. *Journal of environmental monitoring*, *13*(8), 2221-2226.
- Baker, M. E. (2011).** Insights from the structure of estrogen receptor into the evolution of estrogens: Implications for endocrine disruption. *Biochemical pharmacology*, *82*(1), 1-8.
- Baker, M. E. (2019).** Steroid receptors and vertebrate evolution. *Molecular and cellular endocrinology*, *496*, 110526.
- Baptissart, M., Vega, A., Martinot, E., Pommier, A. J., Houten, S. M., Marceau, G., ... & Volle, D. H. (2014).** Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatology*, *60*(3), 1054-1065.
- Belhaj, D., Athmouni, K., Frikha, D., Kallel, M., El Feki, A., Maalej, S., ... & Ayadi, H. (2017).** Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethynylestradiol. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*, 7392-7402.

Références bibliographiques

- Belhaj, D., Baccar, R., Jaabiri, I., Bouzid, J., Kallel, M., Ayadi, H., & Zhou, J. L. (2015).** Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). *Science of the total Environment*, 505, 154-160.
- Belhaj, D., Frikha, D., Jerbi, B., Athmouni, K., Kallel, M., Maalej, S., ... & Ayadi, H. (2018).** Effect of 17 α -ethinylestradiol exposure on phycocyanin metabolite production and antioxidant system of *Phormidium versicolor* NCC466. In *Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions: Proceedings of Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI-1), Tunisia 2017* (pp. 467-469). Springer International Publishing.
- Belhamzaoui, K., Djebbar, M.R., Tichati, L., Laouabdia Sellami, M., Berrebbah, H., Rouabhi, R. (2023).** Response Against Ethinyl Estradiol and Levonorgestrel of *Daphnia Magna*: Immobilization and Oxidative Stress Assessment. *Journal of Chemical Health Risks*, 13(6), 145-157.
- Benhamdi A. (2014).** Etude des enzymes de stress oxydatif chez *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. en réponse du sol par antimoine. Thèse de Biochimie et Biotechnologie, Université de Constantine I , Algérie, 146 p.
- Besse, J. P., & Garric, J. (2009).** Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental pollution*, 157(12), 3485-3494.
- Bittman, E. L. (2016).** Timing in the testis. *Journal of biological rhythms*, 31(1), 12-36.
- Boersma, M. and P. Spaak (1998).** "Predator-mediated plasticity in morphology, life history, and behavior of daphnia: the uncoupling of responses. *The American Naturalist August* 152(2), 237-248.
- Bonnes G., Desclaude J., Drogoul C., Gadou R., Jussian R., Leloc H.A., Montemas L. & Robin G., 1998.** Reproduction des mammifères d'élevage. *Collection INRAP*, Paris : ed Foucher, 237 p.
- Bouchard, P. (2021).** Histoire des stéroïdes reproductifs. *médecine/sciences*, 37(11), 1011-1013.
- Bownik, A. (2017).** *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *Science of the total environment*, 601, 194-205.
- Bownik, A., Jasieczek, M., & Kosztowny, E. (2020).** Ketoprofen affects swimming behavior and impairs physiological endpoints of *Daphnia magna*. *Science of the total environment*, 725, 138312.

- Bownik, A., Ślaska, B., Bochra, J., Gumieniak, K., & Gałek, K. (2019).** Procaine penicillin alters swimming behaviour and physiological parameters of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 18662-18673.
- Bownik, A., Stępniewska, Z., & Skowroński, T. (2015).** Effects of ectoine on behavioural, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 168, 2-10.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brockmeier, E. K., Scott, P. D., Denslow, N. D., & Leusch, F. D. (2016).** Transcriptomic and physiological changes in Eastern Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to progestins and anti-progestagens. *Aquatic toxicology*, 179, 8-17.
- Budeli, P., Ekwanzala, M. D., & Momba, M. N. B. (2022).** Hormetic effect of 17 α -ethynylestradiol on activated sludge microbial community response. *Frontiers in Microbiology*, 13, 961736.
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978).** [30] Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). Academic press.
- Buettner, G. R. (1993).** The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 300(2), 535-543.
- Cabeza, M., Vilchis, F., Lemus, A. E., de León, L. D., & Pérez-Palacios, G. (1995).** Molecular interactions of levonorgestrel and its 5 α -reduced derivative with androgen receptors in hamster flanking organs. *Steroids*, 60(9), 630-635.
- Caldwell, D. J., Mastrocco, F., Anderson, P. D., Länge, R., & Sumpter, J. P. (2012).** Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethinylestradiol. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(6), 1396-1406.
- Caldwell, D. J., Mastrocco, F., Hutchinson, T. H., Länge, R., Heijerick, D., Janssen, C., ... & Sumpter, J. P. (2008).** Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone, 17 α -ethinyl estradiol. *Environmental science & technology*, 42(19), 7046-7054.
- Cameron, D. (2007).** Structure and Function of the Male Reproductive System, in xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, p 1-9
- Campbell, A. K., Wann, K. T., & Matthews, S. B. (2004).** Lactose causes heart arrhythmia in the water flea *Daphnia pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(2), 225-234.

Références bibliographiques

- Cappelletti, V., Hauser, T., Piazza, I., Pepelnjak, M., Malinowska, L., Fuhrer, T., ... & Picotti, P. (2021).** Dynamic 3D proteomes reveal protein functional alterations at high resolution in situ. *Cell*, *184*(2), 545-559.
- Cardoso, P. G., Resende-de-Oliveira, R., & Rocha, E. (2019).** Combined effects of increased temperature and levonorgestrel exposure on zebrafish female liver, using stereology and immunohistochemistry against catalase, CYP1A, HSP90 and vitellogenin. *Environmental pollution*, *252*, 1059-1067.
- Carreau, S., & Hess, R. A. (2010).** Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1546), 1517-1535.
- Carvalho, R. N., Arukwe, A., Ait-Aissa, S., Bado-Nilles, A., Balzamo, S., Baun, A., ... & Lettieri, T. (2014).** Mixtures of chemical pollutants at European legislation safety concentrations: how safe are they?. *Toxicological Sciences*, *141*(1), 218-233.
- Castro, F. J. D., Santos, D. R. D., Buongiorno, C. R., Cortez, F. S., Pereira, C. D., Choeri, R. B., & Cesar, A. (2014).** Ecotoxicological assessment of four pharmaceuticals compounds through acute toxicity tests. *O Mundo da Saúde, São Paulo*.
- Chaki, S. P., Misro, M. M., Gautam, D. K., Kaushik, M., Ghosh, D., & Chainy, G. B. (2006).** Estradiol treatment induces testicular oxidative stress and germ cell apoptosis in rats. *Apoptosis*, *11*, 1427-1437.
- Chao, J., Page, S. T., & Anderson, R. A. (2014).** Male contraception. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *28*(6), 845-857.
- Chen, H., Liu, J., Luo, L., Baig, M. U., Kim, J. M., & Zirkin, B. R. (2005).** Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Experimental gerontology*, *40*(8-9), 728-736.
- Chen, T. S., Chen, T. C., Yeh, K. J. C., Chao, H. R., Liaw, E. T., Hsieh, C. Y., ... & Yeh, Y. L. (2010).** High estrogen concentrations in receiving river discharge from a concentrated livestock feedlot. *Science of the total environment*, *408*(16), 3223-3230.
- Chevalier J. (2014).** Utilisation du comportement natatoire de *Daphnia magna* comme indicateur sensible et précoce de toxicité pour l'évaluation de la qualité de l'eau. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, France, 153 p.
- Chèvre N. (2000).** Etude et modélisation des effets écotoxicologiques d'un micropolluant organique sur *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Thèse de doctorat, Ecole Polytechnique fédérale de Lausanne, Lausanne, Suisse, 206 p.
- Claiborne, A. J. F. C. P. (1985).** Handbook of methods for oxygen radical research. *Florida: CRC Press, Boca Raton*, 283-284.

Références bibliographiques

- Clermont Y. (1972).** Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 52 : 198-236.
- Clubbs, R. L., & Brooks, B. W. (2007).** *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3), 385-398.
- Colbourne, J. K., Pfrender, M. E., Gilbert, D., Thomas, W. K., Tucker, A., Oakley, T. H., ... & Boore, J. L. (2011).** The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*, 331(6017), 555-561.
- Collodel, G., Moretti, E., Micheli, L., Menchiari, A., Moltoni, L., & Cerretani, D. (2015).** Semen characteristics and malondialdehyde levels in men with different reproductive problems. *Andrology*, 3(2), 280-286.
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., & Wiegand, C. (2011).** Molecular effects and bioaccumulation of levonorgestrel in the non-target organism *Dreissena polymorpha*. *Environmental pollution*, 159(1), 38-44.
- Cortés, M. E., & Alfaro, A. A. (2014).** The effects of hormonal contraceptives on glycemic regulation. *The Linacre Quarterly*, 81(3), 209-218.
- Critchley, H. O., Wang, H., Jones, R. L., Kelly, R. W., Drudy, T. A., Gebbie, A. E., ... & Glasier, A. F. (1998).** Morphological and functional features of endometrial decidualization following long-term intrauterine levonorgestrel delivery. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(5), 1218-1224.
- D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., & Samperi, R. (2003).** Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment*, 302(1-3), 199-209.
- Dave, G., & Herger, G. (2012).** Determination of detoxification to *Daphnia magna* of four pharmaceuticals and seven surfactants by activated sludge. *Chemosphere*, 88(4), 459-466.
- Dawidowicz, P., & Loose, C. J. (1992).** Metabolic costs during predator-induced dielvertical migration of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 37(8), 1589-1595.
- De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (2003).** The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(7), 1632-1641.
- De Meester, L. (1993).** "Genotype, fish-mediated chemicals, and phototactic behavior in *Daphnia magna*." *Ecology* 74(5): 1467-1474.

Références bibliographiques

- De Meester, L. and C. Cousyn (1997).** "The change in phototactic behaviour of a *Daphnia magna* clone in the presence of fish kairomones: The effect of exposure time." *Hydrobiologia* 360: 169-175.
- De Rooij, D. G. (2001).** Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction-Cambridge-*, 121(3), 347-354.
- Degen, G., Bolt, H. (2000).** Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 73 (7), 433–441.
- Della Seta, D., Farabollini, F., Dessì-Fulgheri, F., & Fusani, L. (2008).** Environmental-like exposure to low levels of estrogen affects sexual behavior and physiology of female rats. *Endocrinology*, 149(11), 5592-5598.
- Dericks-Tan, J. S. E., Koch, P., & Taubert, H. D. (1983).** Synthesis and release of gonadotropins: effect of an oral contraceptive. *Obstetrics & Gynecology*, 62(6), 687-690.
- Desbrow, C. E. J. R., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., & Waldock, M. (1998).** Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental science & technology*, 32(11), 1549-1558.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., ... & Gore, A. C. (2009).** Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293-342.
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., & Laforsch, C. (2010).** Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*—A multigenerational study. *Chemosphere*, 79(1), 60-66.
- Dissanayake, D. M. I. H., Keerthirathna, W. L. R., & Peiris, L. D. C. (2019).** Male Infertility Problem A Contemporary Review on Present Status and Future Perspective.
- Djebbi, E., Yahia, M. N. D., Farcy, E., Pringault, O., & Bonnet, D. (2022).** Acute and chronic toxicity assessments of 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethinylestradiol (EE2) on the calanoid copepod *Acartia clausi*: Effects on survival, development, sex-ratio and reproduction. *Science of the Total Environment*, 807, 150845.
- Dodson, S. I., Hanazato, T., & Gorski, P. R. (1995).** Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus* kairomone. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 14(1), 43-50.
- Dolgov, A. V., Gordienko, I. A., & Dushkin, M. I. (1986).** Effect of 17 alpha-ethinyl estradiol on the blood serum lipid indices of rats. *Farmakologiya i Toksikologiya*, 49(6), 51-53.
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990).** [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 421-431). Academic press.

Références bibliographiques

- D'Souza, R., Gill-Sharma, M. K., Pathak, S., Kedia, N., Kumar, R., & Balasinor, N. (2005).** Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 241(1-2), 41-48.
- Duan, S., Fu, Y., Dong, S., Ma, Y., Meng, H., Guo, R., ... & Li, Y. (2022).** Psychoactive drugs citalopram and mirtazapine caused oxidative stress and damage of feeding behavior in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 230, 113147.
- Duquesne, S., & Küster, E. (2010).** Biochemical, metabolic, and behavioural responses and recovery of *Daphnia magna* after exposure to an organophosphate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 353-359.
- Duran, E. K., & Pradhan, A. D. (2021).** Triglyceride-rich lipoprotein remnants and cardiovascular disease. *Clinical Chemistry*, 67(1), 183-196.
- Dutta, S. K., Inamdar, S. P., Tso, J., & Aga, D. S. (2012).** Concentrations of free and conjugated estrogens at different landscape positions in an agricultural watershed receiving poultry litter. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223, 2821-2836.
- Dzieweczynski, T. L., & Hebert, O. L. (2013).** The effects of short-term exposure to an endocrine disrupter on behavioral consistency in male juvenile and adult Siamese fighting fish. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 64, 316-326.
- Ebert D. (2005).** Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
- Ebert, D. (2011).** A genome for the environment. *Science*, 331(6017), 539-540.
- Endrikat, J., Gerlinger, C., Richard, S., Rosenbaum, P., & Düsterberg, B. (2011).** Ovulation inhibition doses of progestins: a systematic review of the available literature and of marketed preparations worldwide. *Contraception*, 84(6), 549-557.
- Ewing, L. L., & Zirkin, B. (1983, January).** Leydig cell structure and steroidogenic function. In *Proceedings of the 1982 Laurentian Hormone Conference* (pp. 599-635). Academic Press.
- Faheem, M., & Lone, K. P. (2018).** Oxidative stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 53.
- Fan, W. H., Cui, M. M., Shi, Z. W., Tan, C., & Yang, X. P. (2012).** Enhanced Oxidative Stress and Physiological Damage in *Daphnia magna* by Copper in the Presence of Nano-TiO₂. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1-7 p.
- Faure A.K. (2007).** Exploration du génome et de l'épigénome dans les troubles de la spermatogenèse chez l'homme. Thèse de Biologie, Université Joseph Fourier, Grenoble I, France, 133 p.

Références bibliographiques

- Fawcett, D. W. (1993).** Sistema Reprodutor Masculino". In: Tratado de Histología. México: *Interamericana-McGraw-Hill*, 11, 802–857.
- Fekete-Kertesz, I., Kunglne-Nagy, Z., & Molnar, M. (2016).** Ecological impact of micropollutants on aquatic life determined by an innovative sublethal endpoint *Daphnia magna* heartbeat rate. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 11(2), 345-354.
- Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C., & Segner, H. (2005).** An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(5), 1088-1098.
- Fent, K. (2015).** Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment. *Environment international*, 84, 115-130.
- Fernando, C. H., Paggi, J. C., & Rajapaksa, R. (1987).** *Daphnia* in tropical lowlands. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol*, 45, 107-141.
- Finney, D. J. (1952).** LD 50 value determined using Karber's method (Revised). *Probit Anal*, Second. ed. *Univ Press, Cambridge*.
- Fodor, I., Urbán, P., Scott, A. P., & Pirger, Z. (2020).** A critical evaluation of some of the recent so-called 'evidence' for the involvement of vertebrate-type sex steroids in the reproduction of mollusks. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 516, 110949.
- Fuertes, I., Piña, B., & Barata, C. (2020).** Changes in lipid profiles in *Daphnia magna* individuals exposed to low environmental levels of neuroactive pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*, 733, 139029.
- Furuhagen, S., Fuchs, A., Lundström Belleza, E., Breitholtz, M., & Gorokhova, E. (2014).** Are pharmaceuticals with evolutionary conserved molecular drug targets more potent to cause toxic effects in non-target organisms?. *PloS one*, 9(8), e105028.
- Gadd, J. B., Tremblay, L. A., & Northcott, G. L. (2010).** Steroid estrogens, conjugated estrogens and estrogenic activity in farm dairy shed effluents. *Environmental Pollution*, 158(3), 730-736.
- Gagné, F., Blaise, C., & André, C. (2006).** Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(3), 329-336.
- García, A. A., Coto, P. L., & González, C. G. (2008).** Síndrome metabólico, obesidad y terapia hormonal de sustitución. *Rev Española Obesidad*, 6(6), 340-50.
- García-García, G., Sarma, S. S. S., Núñez-Orti, A. R., & Nandini, S. (2014).** Effects of the mixture of two endocrine disruptors (ethinylestradiol and levonorgestrel) on selected ecological

- endpoints of *Anuraeopsis fissa* and *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *International Review of Hydrobiology*, 99(1-2), 166-172.
- Garcia-Reyero, N., Kroll, K. J., Liu, L., Orlando, E. F., Watanabe, K. H., Sepúlveda, M. S., ... & Denslow, N. D. (2009).** Gene expression responses in male fathead minnows exposed to binary mixtures of an estrogen and antiestrogen. *BMC genomics*, 10, 1-17.
- Garrel, C., Ceballos-Picot, I., Germain, G., & Al-Gubory, K. H. (2007).** Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂ α -induced luteal cell death in vivo. *Free radical research*, 41(3), 251-259.
- Gasmi, S., Chafaa, S., Lakroun, Z., Rouabhi, R., Touahria, C., Kebieche, M., & Soulimani, R. (2019).** Neuronal apoptosis and imbalance of neurotransmitters induced by acetamiprid in rats. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 11, 305-311.
- Ge, R., & Hardy, M. P. (2007).** Regulation of Leydig cells during pubertal development. *The Leydig cell in health and disease*, 55-70.
- Gee, D. (2006).** Late lessons from early warnings: Toward realism and precaution with endocrine-disrupting substances. *Environmental health perspectives*, 114(Suppl 1), 152-160.
- Ghosh, A., Tripathy, A., & Ghosh, D. (2022, March).** Impact of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on reproductive health of human. In *Proceedings of the zoological society* (Vol. 75, No. 1, pp. 16-30). New Delhi: Springer India.
- Giri, P., & Pal, C. (2014).** Ecotoxicological aspects of pharmaceuticals on aquatic environment. *American Journal of Drug Discovery*, 1(1), 10-24.
- Godsland, I. F., Crook, D., Simpson, R., Proudler, T., Felton, C., Lees, B., ... & Wynn, V. (1990).** The effects of different formulations of oral contraceptive agents on lipid and carbohydrate metabolism. *New England Journal of Medicine*, 323(20), 1375-1381.
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990).** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257), 425-430.
- Goldsworthy, G. J., Mordue, W., & Guthkelch, J. (1972).** Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*, 18(3), 545-551.
- Goncalves R. (2018).** Interaction entre la signalisation estrogénique et la vitamine D dans les cellules testiculaire. Thèse de doctorat, en cotutelle internationale entre l'Université de Caen Normandie – France et cotutelle avec Universidade Federal de Santa Catarina, BRESIL, 187 p.
- González, C., Alonso, A., Grueso, N. A., Díaz, F., Esteban, M. M., Fernández, S., & Patterson, A. M. (2002).** Role of 17 β -estradiol administration on insulin sensitivity in the rat: implications for the insulin receptor. *Steroids*, 67(13-14), 993-1005.

Références bibliographiques

- Goodsell, P. J., Underwood, A. J., & Chapman, M. G. (2009).** Evidence necessary for taxa to be reliable indicators of environmental conditions or impacts. *Marine Pollution Bulletin*, 58(3), 323-331.
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., ... & Zoeller, R. T. (2015).** EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine reviews*, 36(6), E1-E150.
- Goto, T., & Hiromi, J. (2003).** Toxicity of 17 α -ethynylestradiol and norethindrone, constituents of an oral contraceptive pill to the swimming and reproduction of cladoceran *Daphnia magna*, with special reference to their synergetic effect. *Marine pollution bulletin*, 47(1-6), 139-142.
- Gunnarsson, L., Snape, J. R., Verbruggen, B., Owen, S. F., Kristiansson, E., Margiotta-Casaluci, L., ... & Tyler, C. R. (2019).** Pharmacology beyond the patient—The environmental risks of human drugs. *Environment international*, 129, 320-332.
- Guyton, A. C. (2006).** *Text book of medical physiology*. China.
- Gwynne, J. T., & Strauss III, J. F. (1982).** The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocrine reviews*, 3(3), 299-329.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974).** Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Haider, S. G. (2004).** Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol*, 233(4), 181-241.
- Halliwell, B. (2006).** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Halliwell, B. B., & Poulsen, H. E. (2006).** Oxidative stress. In *Cigarette smoke and oxidative stress* (pp. 1-4). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1986).** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 246(2), 501-514.
- Hamid, H., & Eskicioglu, C. (2012).** Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research*, 46(18), 5813-5833.
- Hanazato, T. (1999).** Anthropogenic chemicals (insecticides) disturb natural organic chemical communication in the plankton community. *Environmental Pollution*, 105(1), 137-142.
- Havens, S. M., Hedman, C. J., Hemming, J. D., Mieritz, M. G., Shafer, M. M., & Schauer, J. J. (2020).** Occurrence of estrogens, androgens and progesterones and estrogenic activity in

Références bibliographiques

surface water runoff from beef and dairy manure amended crop fields. *Science of the total environment*, 710, 136247.

Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., & Smith, C. E. (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy research and technique*, 73(4), 241-278.

Hess, R. A., & De Franca, L. R. (2009). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*, 1-15.

Hodgson E. (2004). A Textbook of Modern Toxicology, 4th Edition Wiley. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.

Hogan, N. S., Currie, S., LeBlanc, S., Hewitt, L. M., & MacLatchy, D. L. (2010). Modulation of steroidogenesis and estrogen signalling in the estuarine killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to ethinylestradiol. *Aquatic toxicology*, 98(2), 148-156.

Holstein, A. F., Schulze, W., & Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1-16.

Homola, E., & Chang, E. S. (1997). Methyl farnesoate: crustacean juvenile hormone in search of functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 117(3), 347-356.

Howdeshell, K. L., Furr, J., Lambright, C. R., Wilson, V. S., Ryan, B. C., & Gray Jr, L. E. (2008). Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat. *Toxicological Sciences*, 102(2), 371-382.

Howell, S. L., Tyhurst, M., & Green, I. C. (1977). Direct effects of progesterone on rat islets of Langerhans in vivo and in tissue culture. *Diabetologia*, 13, 579-583.

Hu, Y., Yan, X., Shen, Y., Di, M., & Wang, J. (2019). Occurrence, behavior and risk assessment of estrogens in surface water and sediments from Hanjiang River, Central China. *Ecotoxicology*, 28, 143-153.

Hua, J., Han, J., Guo, Y., & Zhou, B. (2015). The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology*, 166, 1-9.

Huang, D. J., Wang, S. Y., & Chen, H. C. (2004). Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Chemosphere*, 57(11), 1621-1627.

International Standards Organisation ISO 6341., 2012. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. International Standards Organisation, Geneva, Switzerland.

International Standards Organisation, 1996. Water quality-Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)- Acute toxicity test. ISO 6341. Geneva, Switzerland.

Iwase, T., Sano, F., Murakami, T., & Inazawa, K. (1995). MALE REPRODUCTIVE TOXICITY OF ETHINYLESTRADIOL ASSOCIATED WITH 4 WEEKS DAILY DOSING PRIOR TO MATING IN RATS (< SPECIAL ISSUE> TESTICULAR TOXICITY). *The Journal of Toxicological Sciences*, 20(3), 265-279.

Jacobson, T. A., Ito, M. K., Maki, K. C., Orringer, C. E., Bays, H. E., Jones, P. H., ... & Brown, W. V. (2015). National lipid association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia: part 1—full report. *Journal of clinical lipidology*, 9(2), 129-169.

Jaser, W., Severin, G. F., Jütting, U., Jüttner, I., Schramm, K. W., & Kettrup, A. (2003). Effects of 17 α -ethinylestradiol on the reproduction of the cladoceran species *Ceriodaphnia reticulata* and *Sida crystallina*. *Environment international*, 28(7), 633-638.

Jeminiwa, B. O., Knight, R. C., Abbot, K. L., Pondugula, S. R., & Akingbemi, B. T. (2021). Gonadal sex steroid hormone secretion after exposure of male rats to estrogenic chemicals and their combinations. *Molecular and cellular endocrinology*, 533, 111332.

Jeong, T. Y., Yoon, D., Kim, S., Kim, H. Y., & Kim, S. D. (2018). Mode of action characterization for adverse effect of propranolol in *Daphnia magna* based on behavior and physiology monitoring and metabolite profiling. *Environmental pollution*, 233, 99-108.

Jin, Y., Lin, X., Miao, W., Wu, T., Shen, H., Chen, S., ... & Fu, Z. (2014). Chronic exposure of mice to environmental endocrine-disrupting chemicals disturbs their energy metabolism. *Toxicology letters*, 225(3), 392-400.

Jin, Y., Wang, L., & Fu, Z. (2013). Oral exposure to atrazine modulates hormone synthesis and the transcription of steroidogenic genes in male peripubertal mice. *General and comparative endocrinology*, 184, 120-127.

Jobling, S., & Owen, R. J. (2011). Ethinyl oestradiol: bitter pill for the precautionary principle. *European Environment Agency*.

Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., ... & Tyler, C. R. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic toxicology*, 65(2), 205-220.

Références bibliographiques

- Johnson, A. C., & Williams, R. J. (2004).** A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental science & technology*, 38(13), 3649-3658.
- Jones, B. L., Walker, C., Azizi, B., Tolbert, L., Williams, L. D., & Snell, T. W. (2017).** Conservation of estrogen receptor function in invertebrate reproduction. *BMC evolutionary biology*, 17, 1-10.
- Kahlenborn, C., Peck, R., & Severs, W. B. (2015).** Mechanism of action of levonorgestrel emergency contraception. *The Linacre Quarterly*, 82(1), 18-33.
- Kamischke, A., Diebäcker, J., & Nieschlag, E. (2000).** Potential of norethisterone enanthate for male contraception: pharmacokinetics and suppression of pituitary and gonadal function. *Clinical Endocrinology*, 53(3), 351-358.
- Kashian, D. R., & Dodson, S. I. (2004).** Effects of vertebrate hormones on development and sex determination in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(5), 1282-1288.
- Kato, Y., Kobayashi, K., Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., & Iguchi, T. (2007).** Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. *Journal of Endocrinology*, 193(1), 183.
- King, O. C., van de Merwe, J. P., McDonald, J. A., & Leusch, F. D. (2016).** Concentrations of levonorgestrel and ethinylestradiol in wastewater effluents: Is the progestin also cause for concern?. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(6), 1378-1385.
- Kirigaya, A., Hayashi, S., Iguchi, T., Sato, T. (2006).** Developmental effects of ethinylestradiol on reproductive organs of female mice. *In vivo* 20, 867–874.
- Kleiven, O. T., Larsson, P., & Hobæk, A. (1992).** Sexual Reproduction in *Daphnia magna* Requires Three Stimuli. *Oikos*, 65(2), 197–206. <https://doi.org/10.2307/3545010>
- Konan K.M. (2019).** Plomb et infertilité masculine : Paramètres spermatiques, mise en évidence du phénomène d'apoptose et évaluation de l'expression des gènes Par RT-PCR chez le rat Wistar. Thèse de doctorat, Université Félix-Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 153 p.
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., & Faust, M. (2009).** State of the Art Report on Mixture Toxicity—Final Report, Executive Summary. *University of London School of Pharmacy, London, UK*.
- Kovacevic, V., Simpson, A. J., & Simpson, M. J. (2019).** The concentration of dissolved organic matter impacts the metabolic response in *Daphnia magna* exposed to 17 α -

ethynylestradiol and perfluorooctane sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 468-478.

Krawetz, S. A., De Rooij, D. G., & Hedger, M. P. (2009). Molecular aspects of male fertility: International Workshop on Molecular Andrology. *EMBO reports*, 10(10), 1087-1092.

Kumar, S., Blumberg, D. L., Canas, J. A. & Maddaiah, V. T. (1994). Human chorionic gonadotropin (hCG) increases cytosolic free calcium in adult rat Leydig cells. *Cell Calcium* 15, 349–355.

Kuster, M., López de Alda, M. J., & Barceló, D. (2005). Estrogens and progestogens in wastewater, sludge, sediments, and soil. *Water Pollution: Emerging Organic Pollution in Waste Waters and Sludge, Vol. 2*, 1-24.

La Farre, M., Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991-1007.

La Sala, G., Marazziti, D., Di Pietro, C., Golini, E., Matteoni, R., & Tocchini-Valentini, G. P. (2015). Modulation of Dhh signaling and altered Sertoli cell function in mice lacking the GPR37-prosaposin receptor. *The FASEB Journal*, 29(5), 2059-2069.

Lass, S., & Spaak, P. (2003). Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia*, 491(1), 221-239.

Laurenson, J. P., Bloom, R. A., Page, S., & Sadrieh, N. (2014). Ethinyl estradiol and other human pharmaceutical estrogens in the aquatic environment: a review of recent risk assessment data. *The AAPS journal*, 16, 299-310.

Lee, D.H. (2018). Evidence of the possible harm of endocrine-disrupting chemicals in humans: ongoing debates and key issues. *Endocrinol. Metabol*, 33, 44–52.

Leeson C.R. (1963). Observations on the fine structure of rat interstitial tissue. *Acta Anat*, 52, 34-48.

Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Prost, M. (2001). Oxidative stress and human disease. Current knowledge and perspectives for prevention. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*, 30(21), 1076-1081.

Lewis, R. A., Taylor, D., Natavio, M. F., Melamed, A., Felix, J., & Mishell Jr, D. (2010). Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on cervical mucus quality and sperm penetrability. *Contraception*, 82(6), 491-496.

Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental pollution*, 187, 193-201.

Références bibliographiques

- Lin, P. H., Kuo, T. H., Chen, C. C., Jian, C. Y., Chen, C. W., Wang, K. L., ... & Wang, S. W. (2020).** Downregulation of testosterone production through luteinizing hormone receptor regulation in male rats exposed to 17 α -ethynylestradiol. *Scientific reports*, 10(1), 1576.
- Liu, J., Shen, J., Lu, G., Xu, X., Yang, H., Yan, Z., & Chen, W. (2020).** Multilevel ecotoxicity assessment of environmentally relevant bisphenol F concentrations in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 240, 124917.
- Liu, M., Wan, X., Yin, Y., Li, Y. X., Sun, F., Zhang, Z., & Wang, Y. L. (2012).** Subfertile effects of quinestrol and levonorgestrel in male rats. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(2), 297-308.
- Livingstone, D. R. (2001).** Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8), 656-666.
- Ludwig S. (2011).** Comportement d'un perturbateur endocrinien et d'un non perturbateur endocrinien vis-à-vis de la toxicité cellulaire chez le rat. Thèse de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université Paris-Sud, France, 337 p.
- Lue, Y., Wang, C., Cui, Y., Wang, X., Sha, J., Zhou, Z., ... & Swerdloff, R. S. (2009).** Levonorgestrel enhances spermatogenesis suppression by testosterone with greater alteration in testicular gene expression in men. *Biology of reproduction*, 80(3), 484-492.
- Luna, L. G. (1968).** Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (pp. xii-258).
- Luna, T. O., Plautz, S. C., & Salice, C. J. (2015).** Chronic Effects of 17 α -Ethinylestradiol, Fluoxetine, and the Mixture on Individual and Population-Level End Points in *Daphnia magna*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 68, 603-611.
- Lushchak, V. I. (2011).** Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.
- Maes H. (2011).** Fate of ethinylestradiol in the aquatic environment and the associated effects on organisms of different trophic levels. Thèse de doctorat, Université de RWTH Aachen, Allemagne, 246 p.
- Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Nataraj, B., Ramesh, M., & Kadirvelu, K. (2018).** Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): a multi biomarker study. *Aquatic Toxicology*, 196, 132-145.
- Manar R. (2008).** Effets populationnels du chlordane sur les microcrustacés cladocères *Daphnia sp.* Dans une perspective d'évaluation des risques. Thèse de doctorat, en cotutelle entre

l'Université de Hassan II, Mohammedia-Maroc et l'Université Paul Verlaine - Metz, France, 169 p.

Maqdasy, S., Trousson, A., Tauveron, I., Volle, D. H., Baron, S., & Lobaccaro, J. M. A. (2016). Once and for all, LXR α and LXR β are gatekeepers of the endocrine system. *Molecular aspects of medicine*, 49, 31-46.

Maralla, S., Kesireddy, S. R., & Wudayagiri, R. (2012). Effect of ginger consumption on serum makers of general metabolism, liver and kidney functions and lipid profiles in ethanol induced withdrawal rats. *J Pharm Res*, 5(1), 485-91.

Maranho, L. A., Baena-Nogueras, R. M., Lara-Martín, P. A., DelValls, T. A., & Martín-Díaz, M. L. (2014). Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species. *Environmental research*, 134, 353-365.

Mark, U., Solbe, J. (1998). Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database - V - The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species. *Chemosphere* 36(1): 155-166.

Markov, G. V., Gutierrez-Mazariegos, J., Pitrat, D., Billas, I. M., Bonneton, F., Moras, D., ... & Laudet, V. (2017). Origin of an ancient hormone/receptor couple revealed by resurrection of an ancestral estrogen. *Science advances*, 3(3), e1601778.

Marsalek, J. (2008). Pharmaceuticals and personal care products (PPCP) in Canadian urban waters: a management perspective. In *Dangerous pollutants (xenobiotics) in urban water cycle* (pp. 117-130). Springer Netherlands.

Martin-Creuzburg, D., Westerlund, S. A., & Hoffmann, K. H. (2007). Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). *General and comparative endocrinology*, 151(1), 66-71.

Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Chamorro, C., Herraiz, P., de Paz, P., & Anel, L. (2006). Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, 65(3), 471-485.

Martins, J., Teles, L. O., & Vasconcelos, V. (2007). Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, 33(3), 414-425.

Massarin S. (2010). Etude des effets de l'uranium sur le budget énergétique et la dynamique de population de *Daphnia magna*. Thèse de Doctorat, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), France, 228 p.

- Massawe, A.W., Makundi, R.H., Zhang, Z.B., Mhamphi, G.G., Liu, M., Li, H.J., Belmain, S.R. (2018).** Effect of synthetic hormones on reproduction in *Mastomys natalensis*. *J. Pest. Sci.* *91* (1), 157–168.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M. G., Ricciardi, F., & Blaise, C. (2008).** Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environment international*, *34*(4), 531-545.
- McLachlan, R. I., O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., De Kretser, D. M., Pratis, K., & Robertson, D. M. (2002).** Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent progress in hormone research*, *57*(1), 149-179.
- Meksem, L., Rouabhi, R., Djebbar-Berrebbah, H., & Djebbar, M. R. (2007).** The impact of propiconazole (Tilt 250 EC) on the growth and the breathing of hard wheat isolated roots (*Triticum durum*, GTA and Vitron varieties).
- Michael, O. S., & Olatunji, L. A. (2018).** Ameliorative effect of nicotine exposure on insulin resistance is accompanied by decreased cardiac glycogen synthase kinase-3 and plasminogen activator inhibitor-1 during oral oestrogen-progestin therapy. *Archives of physiology and biochemistry*, *124*(2), 139-148.
- Michelson, A. M. (1982).** Oxygen radicals. *Agents and actions. Supplements*, *11*, 179-201.
- Miller, T. H., Bury, N. R., Owen, S. F., MacRae, J. I., & Barron, L. P. (2018).** A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environmental pollution*, *239*, 129-146.
- Mo, N., Zhang, M., Wang, R., Xia, S., Meng, F., Qian, Y., & Li, M. (2019).** Effects of α -ethinyl estradiol (EE2) and diethylhexyl phthalate (DEHP) on growth performance, antioxidant status and immune response of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *226*, 108615.
- Mobisson, S. K., Onyebuagu, P. C., Wopara, I., Ukoh, I. E., Woha, J. B., Boma, H. & Obembe, A. O. (2023).** Impact of Cannabidiol Oil and Prednisolone on Sex Hormones, Oxidative Stress Markers, Lipid Profile, and Testes Histology on Cadmium Induced Toxicity in Male Wistar Rats. *Cell*, *14*(10).
- Montgomery, T. M., Brown, A. C., Gendelman, H. K., Ota, M. & Clotfelter, E. D. (2014).** Exposure to 17 α -ethinylestradiol decreases motility and ATP in sperm of male fighting fish *Betta splendens*. *Environ. Toxicol.* *29*, 243–252.
- Moralí, G., Lemus, A. E., Munguía, R., García, G. A., Grillasca, I., & Perez-Palacios, G. (2002).** Hormone-like behavioral effects of levonorgestrel and its metabolites in the male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *73*(4), 951-961.

Références bibliographiques

- Mortimer, D., & Mortimer, S. T. (2013).** Manual methods for sperm motility assessment. *Spermatogenesis: Methods and Protocols*, 61-75.
- Moumeni W. (2016).** Etude de la toxicité d'un Cyclohexanedione (herbicide) sur deux modèles biologiques d'eau douce : Paramecium tetraurelia et Daphnia magna. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie, 171 p.
- Mu, X., & Leblanc, G. A. (2004).** Synergistic interaction of endocrine-disrupting chemicals: Model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 23(4), 1085-1091.
- Muysen, B. T. A., & Janssen, C. R. (2007).** Age and exposure duration as a factor influencing Cu and Zn toxicity toward Daphnia magna. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3), 436-442.
- Nadal, A., Díaz, M., & Valverde, M. A. (2001).** The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *Physiology*, 16(6), 251-255.
- Narváez, J. F., Grant, H., Gil, V. C., Porrás, J., Sanchez, J. C. B., Duque, L. F. O., ... & Quintana-Castillo, J. C. (2019).** Assessment of endocrine disruptor effects of levonorgestrel and its photoproducts: Environmental implications of released fractions after their photocatalytic removal. *Journal of hazardous materials*, 371, 273-279.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R. (2004).** Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112 (17), 1725–1733.
- Nikkilä, E. A., Tikkanen, M., & Kuusi, T. (1983).** Effects of progestins on plasma lipoproteins and heparin releasable lipases. In *Progesterone and progestins*. Raven Press.
- Noguchi, T. (2002).** Dual role of triplet localization on the accessory chlorophyll in the photosystem II reaction center: photoprotection and photodamage of the D1 protein. *Plant and cell physiology*, 43(10), 1112-1116.
- Nordestgaard, B. G. (2016).** Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease: new insights from epidemiology, genetics, and biology. *Circulation research*, 118(4), 547-563.
- Noss, C., Dabrunz, A., Rosenfeldt, R. R., Lorke, A., & Schulz, R. (2013).** Three-dimensional analysis of the swimming behavior of Daphnia magna exposed to nanosized titanium dioxide. *PloS one*, 8(11), e80960.

- Nunes, B., Leal, C., Rodrigues, S., & Antunes, S. C. (2018). Assessment of ecotoxicological effects of ciprofloxacin in *Daphnia magna*: life-history traits, biochemical and genotoxic effects. *Water Science and Technology*, 2017(3), 835-844.
- Oda, S., Kato, Y., Watanabe, H., Tatarazako, N., & Iguchi, T. (2011). Morphological changes in *Daphnia galeata* induced by a crustacean terpenoid hormone and its analog. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(1), 232-238.
- Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., Morita, M., & Iguchi, T. (2005). Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere*, 61(8), 1168-1174.
- Oduwole, O. O., Huhtaniemi, I. T., & Misrahi, M. (2021). The roles of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone in spermatogenesis and folliculogenesis revisited. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12735.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., & Markert, B. (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*, 9, 383-397.
- Ojogoro, J. O., Chaudhary, A. J., Campo, P., Sumpter, J. P., & Scrimshaw, M. D. (2017). Progesterone potentially degrades to potent androgens in surface waters. *Science of the total environment*, 579, 1876-1884.
- Ojogoro, J. O., Scrimshaw, M. D., & Sumpter, J. P. (2021). Steroid hormones in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 792, 148306.
- Olaniyi, K. S., Sabinari, I. W., & Olatunji, L. A. (2021). Oral ethinylestradiol–levonorgestrel therapy counteracts fructose-induced renal metabolic impairment in female rats. *Endocrine and Metabolic Science*, 4, 100099.
- Oliveira, C., Almeida, J. R., Guilhermino, L., Soares, A. M., & Gravato, C. (2013). Swimming velocity, avoidance behavior and biomarkers in *Palaemon serratus* exposed to fenitrothion. *Chemosphere*, 90(3), 936-944.
- Oliveira, C., Almeida, J., Guilhermino, L., Soares, A. M., & Gravato, C. (2012). Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquatic toxicology*, 124, 209-216.
- Olivera, E. R., & Luengo, J. M. (2019). Steroids as environmental compounds recalcitrant to degradation: Genetic mechanisms of bacterial biodegradation pathways. *Genes*, 10(7), 512.
- Olmstead, A. W., & LeBlanc, G. A. (2001). Temporal and quantitative changes in sexual reproductive cycling of the cladoceran *Daphnia magna* by a juvenile hormone analog. *Journal of Experimental Zoology*, 290(2), 148-155.

- Organization for Economic Cooperation and Development, 1998.** OECD Guidelines for Testing of Chemicals : *Daphnia magna* Reproduction Test. Procedure 211. Paris, France.
- Orlando, E. F., & Guillette Jr, L. J. (2007).** Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals. *Environmental Research*, 104(1), 163-173.
- Örn, S., Holbech, H., Madsen, T. H., Norrgren, L. & Petersen, G. I. (2003).** Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquat. Toxicol.* 65, 397–411.
- Oropesa, A. L., & Guimarães, L. (2020).** Occurrence of levonorgestrel in water systems and its effects on aquatic organisms: a review. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 254*, 57-84.
- Pal, A., Gin, K. Y. H., Lin, A. Y. C., & Reinhard, M. (2010).** Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the total environment*, 408(24), 6062-6069.
- Pan, Y., Yan, S. W., Li, R. Z., Hu, Y. W., & Chang, X. X. (2017).** Lethal/sublethal responses of *Daphnia magna* to acute norfloxacin contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic. *Scientific reports*, 7(1), 40385.
- Parrott, J. L., & Blunt, B. R. (2005).** Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 20(2), 131-141.
- Partridge, C., Boettcher, A. & Jones, A. G. (2010).** Short-term exposure to a synthetic estrogen disrupts mating dynamics in a pipefish. *Horm. Behav.* 58, 800–807.
- Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman Jr, C. U., & Mohan, D. (2019).** Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical reviews*, 119(6), 3510-3673.
- Patiño Maraver, V. M., Díaz-Toledo Núñez de Arenas, B., & del Barrio Fernández, P. G. (2008).** Anticoncepción en la Mujer con Diabetes. *Av. diabetol*, 24(3), 205-209. 205-209.
- Pauwels, B., Wille, K., Noppe, H., De Brabander, H., Van de Wiele, T., Verstraete, W., & Boon, N. (2008).** 17 α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 β -estradiol and estriol. *Biodegradation*, 19, 683-693.
- Pessoa, G. P., de Souza, N. C., Vidal, C. B., Alves, J. A., Firmino, P. I. M., Nascimento, R. F., & dos Santos, A. B. (2014).** Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 490, 288-295.

Références bibliographiques

- Petersen, C., & Söder, O. (2006).** The sertoli cell—a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone research*, 66(4), 153-161.
- Picard, F., Wanatabe, M., Schoonjans, K., Lydon, J., O'Malley, B. W., & Auwerx, J. (2002).** Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to β -cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15644-15648.
- Pietrzak, B., Bednarska, A., & Grzesiuk, M. (2010).** Longevity of *Daphnia magna* males and females. *Hydrobiologia*, 643, 71-75.
- Preston, B. T., Stevenson, I. R., Lincoln, G. A., Monfort, S. L., Pilkington, J. G., & Wilson, K. (2012).** Testes size, testosterone production and reproductive behaviour in a natural mammalian mating system. *Journal of animal ecology*, 81(1), 296-305.
- Program, N.T. (2018).** NTP Research Report on the CLARITY-BPA Core Study: a Perinatal and Chronic Extended-Dose-Range Study of Bisphenol A in Rats.
- Rahman, Md.S., W.S. Kwon, P.C. Karmakar, S.J. Yoon, B.Y. Ryu, and M.G. Pang. 2017.** Gestational exposure to Bisphenol A affects the function and proteome profile of F1 spermatozoa in adult mice. *Environmental Health Perspectives* 125: 238–245.
- Rasool, S., Ahmad, A., Siddiqi, T. O., & Ahmad, P. (2013).** Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. *Acta physiologiae plantarum*, 35, 1039-1050.
- Rato, L., Alves, M. G., Socorro, S., Duarte, A. I., Cavaco, J. E., & Oliveira, P. F. (2012).** Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology*, 9(6), 330-338.
- Razekenari, A. M., Fereidouni, A. E., Movahedinia, A., & Neyshabouri, E. Z. (2023).** Impacts of sublethal concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2) on growth, reproductive performance, and survival in red cherry shrimp *Neocaridina davidi* (Crustacea, Atyidae) during consecutive spawnings. *Aquatic Toxicology*, 259, 106519.
- Ren, J., Chung-Davidson, Y. W., Jia, L., & Li, W. (2019).** Genomic sequence analyses of classical and non-classical lamprey progesterone receptor genes and the inference of homologous gene evolution in metazoans. *BMC evolutionary biology*, 19, 1-17.
- Ren, Z., Zha, J., Ma, M., Wang, Z., & Gerhardt, A. (2007).** The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*. *Environmental monitoring and assessment*, 134, 373-383.
- Ringelberg, J. (1964).** "The positively phototactic reaction of *Daphnia magna* Straus: a contribution of the understanding of diurnal vertical migration." *Netherlands Journal of Sea Research* 2(3), 319-406.

- Ríos-Sossa, R., García-Londoño, J. J., Gil-Ramírez, D., Patiño, A. C., Cardona-Maya, W. D., Quintana-Castillo, J. C., & Narváez-Valderrama, J. F. (2022).** Assessment of levonorgestrel leaching in a landfill and its effects on placental cell lines and sperm cells. *Water*, *14*(6), 871.
- Rodrigues, S., Silva, A. M., & Antunes, S. C. (2021).** Assessment of 17 α -ethinylestradiol effects in *Daphnia magna*: life-history traits, biochemical and genotoxic parameters. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*, 23160-23173.
- Rodríguez, E. M., Medesani, D. A., & Fingerman, M. (2007).** Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *146*(4), 661-671.
- Rone, M.B., Midzak, A.S., Issop, L., Rammouz, G., Jagannathan, S., Fan, J., Ye, X., Blonder, J., Veenstra, T., Papadopoulos, V. (2012).** Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Molecular Endocrinology*, *26*, 1868–1882.
- Roosen, F. and R. Lürling (2001).** "Behavioural response of *Daphnia* to olfactory cues from food, competitors and predators." Oxford University Press.
- Routledge, E., Desbrow, C., Brighty, G., Waldock, M. (1998).** Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.* *32*, 1549–1558.
- Runnalls, T. J., Beresford, N., Kugathas, S., Margiotta-Casaluci, L., Scholze, M., Scott, A. P., & Sumpter, J. P. (2015).** From single chemicals to mixtures—Reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, *169*, 152-167.
- Runnalls, T. J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A. P., & Sumpter, J. P. (2013).** Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environmental science & technology*, *47*(4), 2077-2084.
- Runnalls, T. J., Margiotta-Casaluci, L., Kugathas, S., & Sumpter, J. P. (2010).** Pharmaceuticals in the aquatic environment: steroids and anti-steroids as high priorities for research. *Human and Ecological Risk Assessment*, *16*(6), 1318-1338.
- Ruwanpura, S. M., McLachlan, R. I., & Meachem, S. J. (2010).** Hormonal regulation of male germ cell development. *The Journal of endocrinology*, *205*(2), 117-131.
- Saez, J. M. (1994).** Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine reviews*, *15*(5), 574-626.

Références bibliographiques

- Säfholm, M., Jansson, E., Fick, J., & Berg, C. (2015).** Mixture effects of levonorgestrel and ethinylestradiol: estrogenic biomarkers and hormone receptor mRNA expression during sexual programming. *Aquatic Toxicology*, *161*, 146-153.
- Samal, K., Mahapatra, S., & Ali, M. H. (2022).** Pharmaceutical wastewater as Emerging Contaminants (EC): Treatment technologies, impact on environment and human health. *Energy Nexus*, *6*, 100076.
- Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010).** Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, *175*(1-3), 45-95.
- Schaefer, E. J., Foster, D. M., Zech, L. A., Lindgren, F. T., Brewer JR, H. B., & Levy, R. I. (1983).** The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *57*(2), 262-267.
- Scheele, C. W. (1777).** *Carl Wilhelm Scheele's d. Königl. Schwed. Acad. d. Wissenschaft Mitglied, Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer.* Swederus; Crusius.
- Scholz, S., & Gutzeit, H. O. (2000).** 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology*, *50*(4), 363-373.
- Schug, T.T., Janesick, A., Blumberg, B., Heindel, J.J. (2011).** Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *27*, 204–215.
- Schulze W. & Rehder U., 1984.** Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tissue Res*, *237*, 395-407.
- Scott, A. P. (2018).** Is there any value in measuring vertebrate steroids in invertebrates?. *General and Comparative Endocrinology*, *265*, 77-82.
- Sedes, L., Thirouard, L., Maqdasy, S., Garcia, M., Caira, F., Lobaccaro, J. M. A., ... & Volle, D. H. (2018).** Cholesterol: a gatekeeper of male fertility?. *Frontiers in endocrinology*, *9*, 369.
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C. R., Maack, G., Pascoe, D., ... & Wenzel, A. (2003).** Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and environmental safety*, *54*(3), 302-314.
- Sengupta, P., Borges Jr, E., Dutta, S., & Krajewska-Kulak, E. (2018).** Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Human & experimental toxicology*, *37*(3), 247-255.

- Sharma, P., & Chadha, P. (2021).** Bisphenol A induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* after acute exposure. *Saudi journal of biological sciences*, 28(8), 4738-4750.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. (2003).** Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125(6), 769–784.
- Sharpe RM, Rivas A, Walker M, McKinnell C & Fisher JS. (2003).** Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. *International Journal of Andrology* (26), 26–36.
- Shen, C., Wei, J., Wang, T., & Wang, Y. (2019).** Acute toxicity and responses of antioxidant systems to dibutyl phthalate in neonate and adult *Daphnia magna*. *PeerJ*, 7, e6584.
- Shen, W., Shi, D., Wand, D., Guo, Y., Hai, S., & Yue, Z. (2011).** Quinestrol treatment induced testicular damage via oxidative stress in male mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Experimental animals*, 60(5), 445-453.
- Shen, X., Chang, H., Sun, D., Wang, L., & Wu, F. (2018).** Trace analysis of 61 natural and synthetic progestins in river water and sewage effluents by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Water research*, 133, 142-152.
- Shetty, G., Wilson, G., Hardy, M. P., Niu, E., Huhtaniemi, I., & Meistrich, M. L. (2002).** Inhibition of recovery of spermatogenesis in irradiated rats by different androgens. *Endocrinology*, 143(9), 3385-3396.
- Shimizu, N., Ogino, C., Kawanishi, T., & Hayashi, Y. (2002).** Fractal analysis of *Daphnia* motion for acute toxicity bioassay. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 17(5), 441-448.
- Sies, H. (1985).** Oxidative stress: Introductory remarks. (Sies H, Ed.). *Oxidative stress*, 1-8.
- Sies, H. (1986).** Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058-1071.
- Silva, F. R., Leite, L. D., & Wassermann, G. F. (2002).** Rapid signal transduction in Sertoli cells. *European Journal of Endocrinology*, 147(3), 425-433.
- Simão, F. C., Martínez-Jerónimo, F., Blasco, V., Moreno, F., Porta, J. M., Pestana, J. L., ... & Barata, C. (2019).** Using a new high-throughput video-tracking platform to assess behavioural changes in *Daphnia magna* exposed to neuro-active drugs. *Science of the total environment*, 662, 160-167.

- Sitruk-Ware, R., and A. Nath. (2013).** Characteristics and metabolic effects of estrogen and progestins contained in oral contraceptive pills. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism* 27, 13–24.
- Skinner, M. K. (2005).** Sertoli cell secreted regulatory factors. *Sertoli cell biology*, 1, 107-120.
- Smith, H., Hughes, G. A., Douglas, G. H., Hartley, D., McLoughlin, B. J., Siddall, J. B., ... & Phillips, P. C. (1963).** Totally synthetic (\pm)-13-alkyl-3-hydroxy and methoxy-gona-1, 3, 5 (10)-trien-17-ones and related compounds. *Experientia*, 19(8), 394-396.
- Steinbach, C., Lutz, I., Šandová, M., Pech, M., Šálková, E., Bořík, A., ... & Kroupová, H. K. (2023).** Effects of the synthetic progestin levonorgestrel on some aspects of thyroid physiology in common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 310, 136860.
- Stirling, G. and D. A. Roff (2000).** Behaviour plasticity without learning: phenotypic and genetic variation of naïve *Daphnia* in an ecological trade-off. *Animal Behaviour* 59(5), 929-941.
- Stocco D.M. (1997).** A StAR search: implications in controlling steroidgenesis. *Biol Reprod*, 56, 328-336.
- Stuart, A. M., Herawati, N. A., Risnelli, Sudarmaji, Liu, M., Zhang, Z., ... & Hinds, L. A. (2022).** Reproductive responses of rice field rats (*Rattus argentiventer*) following treatment with the contraceptive hormones, quinestrol and levonorgestrol. *Integrative Zoology*, 17(6), 1017-1027.
- Su, Q., Chen, Y., Qin, J., Li, H., Liu, M., Zhang, Z., & Liu, Q. (2019).** Ratio-dependent effects of quinestrol and levonorgestrel compounds (EP-1) on reproductive parameters of adult male Swiss mice. *Pesticide biochemistry and physiology*, 160, 181-186.
- Su, Q.Q., Chen, Y., Qin, J., Wang, T.L., Wang, D.H., Liu, Q.S. (2016).** Effects of mifepristone and quinestrol on the fertility of female Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) in different reproductive phases. *Anim. Biol.* 66 (2), 133–143.
- Su, Q.Q., Chen, Y., Qin, J., Wang, T.L., Wang, D.H., Liu, Q.S. (2017).** Responses in reproductive organs, steroid hormones and CYP450 enzymes in female Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) over time after quinestrol treatment. *Pestic. Biochem. Physiol.* 143, 122–126.
- Su, Q.Q., Huang, X.L., Qin, J., Liu, Q.S. (2015).** Assessment of effects of mifepristone administration to lactating mice on the development and fertility of their progeny. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 41 (4), 575–581.

Références bibliographiques

- Sutter-Dub, M. T. (2002).** Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids*, 67(2), 77-93.
- Svigruha, R., Fodor, I., Győri, J., Schmidt, J., Padisák, J., & Pirger, Z. (2021).** Effects of chronic sublethal progestogen exposure on development, reproduction, and detoxification system of water flea, *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment*, 784, 147113.
- Szulkin, M., P. Dawidowicz and S. I. Dodson (2006).** Behavioural uniformity as a response to cues of predation risk. *Animal Behaviour* 71(5), 1013-1019.
- Talayero, B. G., & Sacks, F. M. (2011).** The role of triglycerides in atherosclerosis. *Current cardiology reports*, 13, 544-552.
- Talbi A. (2020).** Evaluation des effets nocifs de l'éthanol et utilisation de *Silybum marianum* comme un modèle de détoxification naturels sur les biomarqueurs chez les rats *Wistar*. Thèse de doctorat, Université Badji-Mokhtar Annaba, Algérie, 101 p.
- Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Morita, M., & Iguchi, T. (2003).** Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere*, 53(8), 827-833.
- Teal S, Edelman A. (2021).** Sélection de la contraception, efficacité et effets indésirables : une revue. *JAMA*, 326(24), 2507–2518.
- Thorpe, K. L., Cummings, R. I., Hutchinson, T. H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J. P., & Tyler, C. R. (2003).** Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental science & technology*, 37(6), 1142-1149.
- Tkaczyk, A., Bownik, A., Dudka, J., Kowal, K., & Ślaska, B. (2021).** *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of the Total Environment*, 763, 143038.
- Torres, N. H., Aguiar, M. M., Ferreira, L. F. R., Américo, J. H. P., Machado, Â. M., Cavalcanti, E. B., & Tornisielo, V. L. (2015).** Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 1-13.
- Tostatin J., Rossi D. & Martin P.M., 2004.** Physiologie des androgens chez l'homme adulte. *Prog Uro*, 14 : 639-660.
- Toumi H. (2013).** Ecotoxicité de la deltaméthrine et du malathion sur différentes souches de « *Daphnia magna* » (Crustacea, Cladocera) : apport de la protéomique dans la recherche de nouvelles cibles cellulaires. Thèse de doctorat, en cotutelle entre l'Université de Lorraine – France et l'Université de Carthage – Tunisie, 208 p.

- Tran, T. K. A., Yu, R. M. K., Islam, R., Nguyen, T. H. T., Bui, T. L. H., Kong, R. Y. C., ... & MacFarlane, G. R. (2019).** The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Environmental pollution*, 248, 1067-1078.
- Tung P. S., Skinner M. K. & Fritz I.B. (1984a).** Cooperativity between Sertoli cells and peritubular myoid cells in the formation of the basal lamina in the seminiferous tubule. *Ann NY Acad Sci*, 438, 435-446.
- Ullah, H., Ambreen, A., Ahsan, N., Jahan, S. (2017).** Bisphenol S induces oxidative stress and DNA damage in rat spermatozoa in vitro and disrupts daily sperm production in vivo. *Toxicol. Environ. Chem.* 99 (5–6), 953–965.
- Uttieri, M., Grazia Mazzocchi, M., Nihongi, A., Ribera D'Alcalà, M., Strickler, J. R., & Zambianchi, E. (2004).** Lagrangian description of zooplankton swimming trajectories. *Journal of plankton research*, 26(1), 99-105.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003).** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Van Pelt, A. M., De Rooij, D. G., Van Der Burg, B., Van Der Saag, P. T., Gustafsson, J. A., & Kuiper, G. G. (1999).** Ontogeny of estrogen receptor- β expression in rat testis. *Endocrinology*, 140(1), 478-483.
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs Jr, D. R., Lee, D. H., ... & Myers, J. P. (2012).** Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*, 33(3), 378-455.
- Vandenbergh, G. F., Adriaens, D., Verslycke, T., & Janssen, C. R. (2003).** Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2), 216-222.
- Vethaak, A. D., Lahr, J., Schrap, S. M., Belfroid, A. C., Rijs, G. B., Gerritsen, A., ... & de Voogt, P. (2005).** An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*, 59(4), 511-524.
- Volle, D. H., & Lobaccaro, J. M. A. (2007).** Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the “foie gras”, the steroids and sex?. *Molecular and cellular endocrinology*, 265, 183-189.

- Vosges, M., Braguer, J. C., & Combarous, Y. (2008). Long-term exposure of male rats to low-dose ethinylestradiol (EE2) in drinking water: effects on ponderal growth and on litter size of their progeny. *Reproductive Toxicology*, 25(2), 161-168.
- Vrettakos, C., & Bajaj, T. (2019). Levonorgestrel.
- Walker, C., Garza, S., Papadopoulos, V., & Culty, M. (2021). Impact of endocrine-disrupting chemicals on steroidogenesis and consequences on testicular function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 527, 111215.
- Walker, W. H. (2010). Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1557-1569.
- Wang, H., Wang, Q., Zhao, X.F., Liu, P., Meng, X.H., Yu, T., Ji, Y.L., Zhang, H., Zhang, C., Zhang, Y., Xu, D.X. (2010). Cypermethrin exposure during puberty disrupts testosterone synthesis via downregulating StAR in mouse testes. *Arch. Toxicol.* 84, 53–61
- Wang, J., Sánchez-Roselló, M., Aceña, J. L., Del Pozo, C., Sorochinsky, A. E., Fustero, S., ... & Liu, H. (2014). Fluorine in pharmaceutical industry: fluorine-containing drugs introduced to the market in the last decade (2001–2011). *Chemical reviews*, 114(4), 2432-2506.
- Wang, K. S., Lu, C. Y., & Chang, S. H. (2011). Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of plant growth regulators by *Daphnia magna* embryo assay. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1-3), 520-528.
- Wang, Z., Walker, G. W., Muir, D. C., & Nagatani-Yoshida, K. (2020). Toward a global understanding of chemical pollution: a first comprehensive analysis of national and regional chemical inventories. *Environmental science & technology*, 54(5), 2575-2584.
- Watts, M. M., Pascoe, D., & Carroll, K. (2003). Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A—effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(2), 207-215.
- Weckbecker, G., & Cory, J. G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*, 40(3), 257-264.
- Weinstein, I., Wilcox, H. G., & Heimberg, M. (1986). Effects of high-dose ethinyl estradiol on serum concentrations and hepatic secretion of the very-low-density lipoprotein, triacylglycerol, cholesterol, and apolipoprotein AI in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 876(3), 450-459.
- Weiss, Tollrian, Herbert and Laforsch (2012). "Morphology of the *Daphnia* Nervous System: A Comparative Study on *Daphnia pulex*, *Daphnia lumholtzi*, and *Daphnia longicephala*." *Journal of morphology* 273: 1392-1405.

Références bibliographiques

- Weizel, A., Schlüsener, M. P., Dierkes, G., & Ternes, T. A. (2018). Occurrence of glucocorticoids, mineralocorticoids, and progestogens in various treated wastewater, rivers, and streams. *Environmental science & technology*, 52(9), 5296-5307.
- Wiegratz, I., Jung-Hoffmann, C., Gross, W., & Kuhl, H. (1998). Effect of two oral contraceptives containing ethinyl estradiol and gestodene or norgestimate on different lipid and lipoprotein parameters. *Contraception*, 58(2), 83-91.
- Wiegratz, I., Kutschera, E., Lee, J. H., Moore, C., Mellinger, U., Winkler, U. H., & Kuhl, H. (2003). Effect of four oral contraceptives on thyroid hormones, adrenal and blood pressure parameters. *Contraception*, 67(5), 361-366.
- Wilhelm D., Palmer S. & Koopman P. (2007). Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol Rev*, 87, 1–28.
- Woods, S. C., Lutz, T. A., Geary, N., & Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1471), 1219-1235.
- Wynn, V., Godsland, I., Niththyananthan, R., Adams, P. W., Melrose, J., Oakley, N. W., & Seed, M. (1979). Comparison of effects of different combined oral-contraceptive formulations on carbohydrate and lipid metabolism. *The Lancet*, 313(8125), 1045-1049.
- Xin, N., Jiang, Y., Liu, S., Zhou, Y., & Cheng, Y. (2020). Effects of prednisolone on behavior and hypothalamic–pituitary–interrenal axis activity in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 75, 103325.
- Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen, H., Song, H. (2008). Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 88 (1), 1–8.
- Yadav S.K., Dhote M., Kumar P., Sharma J., Charkrabati T. & Juwarkar A.A. (2010). Differentiation antioxidant enzyme responses of *Jatropha L.* to chromium stress. *J Hazard Mater*, 180, 609-615.
- Yarahmadi, H., Duy, S. V., Hachad, M., Dorner, S., Sauvé, S., & Prévost, M. (2018). Seasonal variations of steroid hormones released by wastewater treatment plants to river water and sediments: Distribution between particulate and dissolved phases. *Science of the total environment*, 635, 144-155.
- Yisa, A. G., Chia, M. A., Gadzama, I. M. K., Oniye, S. J., Sha'aba, R. I., & Gauje, B. (2023). Immobilization, oxidative stress and antioxidant response of *Daphnia magna* to Amoxicillin and Ciprofloxacin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 98, 104078.

- Yu, Q., Geng, J., Zong, X., Zhang, Y., Xu, K., Hu, H., ... & Ren, H. (2019).** Occurrence and removal of progestagens in municipal wastewater treatment plants from different regions in China. *Science of the total environment*, 668, 1191-1199.
- Zagalo, P. M., Ribeiro, P. A., & Raposo, M. (2020).** Detecting Traces of 17 α -Ethinylestradiol in Complex Water Matrices. *Sensors*, 20(24), 7324.
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., & Länge, R. (2009).** Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(12), 2663-2670.
- Zeman F. (2008).** Toxicité d'un mélange binaire sur la daphnie *Daphnia magna* : Etude des effets biologiques de l'uranium et du sélénium seuls et en mélange. Thèse de doctorat, Université de Montpellier II, France, 199 p.
- Zhang, B. H., Yin, F., Qiao, Y. N., & Guo, S. D. (2022).** Triglyceride and triglyceride-rich lipoproteins in atherosclerosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 909151.
- Zhang, H., Wang, X. C., Zheng, Y., & Dzakpasu, M. (2023).** Removal of pharmaceutical active compounds in wastewater by constructed wetlands: Performance and mechanisms. *Journal of Environmental Management*, 325, 116478.
- Zhang, P., Zhao, Y., Zhang, H., Liu, J., Feng, Y., Yin, S., ... & Shen, W. (2019).** Low dose chlorothalonil impairs mouse spermatogenesis through the intertwining of estrogen receptor pathways with histone and DNA methylation. *Chemosphere*, 230, 384-395.
- Zhao, X., Wang, Q., Li, X., Xu, H., Ren, C., Yang, Y., ... & Fang, Y. (2023).** Norgestrel causes digestive gland injury in the clam *Macra veneriformis*: An integrated histological, transcriptomics, and metabolomics study. *Science of The Total Environment*, 871, 162110.
- Zheng, Y., Yuan, J., Gu, Z., Yang, G., Li, T., & Chen, J. (2020).** Transcriptome alterations in female *Daphnia (Daphnia magna)* exposed to 17 β -estradiol. *Environmental pollution*, 261, 114208.
- Zhou, T., Zhang, L., Wang, Y., Mu, Q., & Yin, J. (2019).** Effects of LaCoO₃ perovskite nanoparticle on *Daphnia magna*: accumulation, distribution and biomarker responses. *RSC advances*, 9(42), 24617-24626.
- Zhou, Y., Zha, J., & Wang, Z. (2012).** Occurrence and fate of steroid estrogens in the largest wastewater treatment plant in Beijing, China. *Environmental monitoring and assessment*, 184, 6799-6813.
- Zhu, K.Y. (2008).** Synergism. In: Capinera, J.L. (eds) *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht.

Références bibliographiques

Zimmerman, Y., Eijkemans, M. J. C., Coelingh Bennink, H. J. T., Blankenstein, M. A., & Fauser, B. C. J. M. (2014). The effect of combined oral contraception on testosterone levels in healthy women: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 20(1), 76-105.

Zou, E., & Fingerman, M. (2003). Endocrine disruption of sexual development, reproduction and growth in crustaceans by environmental organic contaminants: current perspectives. *Curr. Top. Pharmacol*, 7(1), 69-80.