

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

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOSURVEILLANCE ENVIRENNEMENTALE



THESE

Présentée en vue de l'obtention d'un Diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCE

Option : Biologie Animale

Spécialité : Biologie Animale et Environnementale

THEME

Impact d'un perturbateur endocrinien œstrogène-mimétique
sur la reproduction d'un poisson ovovivipare d'eau douce
Gambusia affinis (Baird et Girard., 1853)

Présentée par :

BELHAMRA RAHMA

Directeur de thèse :

Pr. Kheireddine OUALI

Université Badji Mokhtar - Annaba

Membres du jury:

Pr. F. SAKRAOUI

Présidente

Université Badji Mokhtar - Annaba

Pr. S. CHOUAHDA

Examinatrice

Université Badji Mokhtar - Annaba

Pr. N. KOUACHI

Examinatrice

Université Mohamed Cherif Messaidia - Souk Ahras

Dr. A. MERGHAD

Examinatrice

Université Mohamed Cherif Messaidia - Souk Ahras

Dr. Y. GASMI

Examinatrice

Université Chadli Benjedid - El Taref

Année universitaire : 2024 / 2025

Remerciements

الحمد لله Avant tout

"Cette thèse est l'aboutissement d'un parcours nourri de savoirs, d'expériences et de réflexions partagés avec de nombreuses personnes, en divers lieux et instants. J'espère que chacun y retrouvera une part de lui-même, et que celles et ceux qui m'ont accompagné dans cette aventure prendront autant de plaisir à la lire que j'en ai éprouvé à la rédiger"

À mon directeur de thèse, **Pr. OUALI Kheiredine**, j'exprime ma profonde reconnaissance pour avoir assuré l'encadrement de ce travail avec un dévouement exemplaire. Je vous adresse mes sincères remerciements pour les conseils pratiques, techniques et scientifiques que vous m'avez prodigués tout au long de cette formation. Je voudrais mettre en lumière la richesse de vos qualités humaines et scientifiques, qui ont su, au fil de nos échanges, m'apporter l'inspiration et la motivation nécessaires à l'avancement efficace de ce travail. Eternelle reconnaissance et merci encore pour TOUT.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury :

Je remercie tout particulièrement **Pr. Ferial Sakraoui**, de l'Université Badji Mokhtar – Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de soutenance. Mes remerciements vont également à **Pr. Salima Chouahda**, de l'Université Badji Mokhtar – Annaba. Je suis également reconnaissant à **Pr. Nouha Kouachi**, de l'Université Mohamed Cherif Messaadia – Souk Ahras. Ma gratitude va aussi à **Dr. Amina Merghad**, de l'Université Mohamed Cherif Messaadia – Souk Ahras. Je remercie **Dr. Yousria Gasmi**, de l'Université Chadli Benjedid – El Taref.

Qui ont accepté d'examiner ce travail
Et pour l'implication et l'intérêt porté à cette recherche.

Toute ma gratitude et reconnaissance envers **Mme OUALI TREA Fouzia**. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour son accompagnement tout au long de ce travail, pour sa confiance, son soutien constant.

Je rends hommage au **Dr Tichati Lazhari** du MCA au Centre de Recherche en Environnement (CRE) – Annaba. Grâce à votre bienveillance et à votre accompagnement, j'ai pu mener à bien ce projet dans les meilleures conditions.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à **Dr SLIMANI Rachid**, Chef du Département Biologie, à l'Université Badji Mokhtar – Annaba pour sa disponibilité.

Ma reconnaissance va aussi à toute l'équipe du Laboratoire de Bio-Surveillance Environnementale (LBSE) de l'Université Badji Mokhtar – Annaba, pour leur collaboration tout au long de cette recherche.

Dédicaces

À mon père **Abdelaziz**, à ma mère **Nacira**,
*Que ce travail soit l'accomplissement des vœux que vous avez tant exprimés,
Et le reflet de vos sacrifices, de votre amour et de votre soutien indéfectible.*

À mon frère **Khalil**
*Exemple constant de persévérance, de courage et de générosité. Merci d'être toujours là pour
m'inspirer et me soutenir.*

À mes petits, la lumière de mes yeux, merci d'apporter tant de joie et d'amour dans ma vie :

Ilyan Badis
Razane
Nazim

À ma douce nièce **Dania**, véritable rayon de soleil dans ma vie.

À mes chères copines fidèles **Meriem** et **Ahlem**

*A mon Mari **Bouakadia Mohamed** et mon Petit Frère **Belhamra Badis** qui ont été arrachés
à mon affection trop tôt*

Votre soutien et vos encouragements n'ont pas été vains.

Résumés

Résumé

Les travaux réalisés s'appuient sur une approche expérimentale intégrée et transversale, visant à évaluer les effets du bisphénol A, un perturbateur endocrinien ubiquitaire, sur les grandes fonctions reproductives, métaboliques et antioxydantes chez *Gambusia affinis*, un poisson culiçiphage d'eau douce, menée sous deux exposition aiguë et chronique :

La toxicité aiguë du bisphénol A a mis en évidence une mortalité cumulative et dose-dépendante, avec une différence marquée entre les sexes. Les mâles ont présenté une sensibilité accrue et précoce à de faibles concentrations, tandis que les femelles ont manifesté une mortalité plus tardive, à des concentrations plus importantes.

La toxicité chronique au bisphénol A a provoqué d'importantes altérations chez *Gambusia affinis*, avec une diminution significative des indices gonado-somatique (IGS) et de condition (K), ainsi qu'une élévation de l'indice hépato-somatique (IHS), traduisant une atteinte des fonctions reproductives et un déséquilibre métabolique prononcé, particulièrement chez les mâles. Chez les femelles, des effets similaires ont été observés, bien que de manière plus progressive. L'effet sur les biomarqueurs a marqué chez les femelles une activation antioxydante précoce mais transitoire (GST, CAT) suivie par une inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), une baisse du glutathion réduit (GSH) et une augmentation du malondialdéhyde (MDA), indiquant un stress oxydatif persistant, plus accentué chez les mâles. Une diminution progressive et dose-dépendante du taux de vitellines, a été enregistrée chez les femelles, indiquant une réduction de la vitellogenèse. Un troubles métaboliques observés chez les mâles des traduit par une baisse des protéines et une accumulation lipidique testiculaire conjugués par des lésions histologiques révéler par un amincissement de l'épithélium germinale, désorganisation des kystes spermatogéniques. L'ensemble de ces observations confirme l'impact profond du BPA sur la fonction gonadique, avec des répercussions directes sur la fertilité et le succès reproducteur.

L'ensemble de ces résultats met en évidence une menace significative du BPA sur la reproduction et la survie des populations de poissons dans les milieux aquatiques contaminés, appelant à une vigilance renforcée dans les politiques de gestion des polluants et à l'utilisation élargie de *Gambusia affinis* comme bioindicateur dans les programmes de biosurveillance.

Mots clés : *Gambusia affinis*, Perturbateur endocrinien, Toxicité aiguë, Toxicité chronique, Bisphénol A, Biomarqueurs, Vitellines.

Abstract

This study is based on an integrated and cross-disciplinary experimental approach aimed at evaluating the effects of bisphenol A (BPA), a ubiquitous endocrine-disrupting compound, on key reproductive, metabolic, and antioxidant functions in *Gambusia affinis*, a freshwater culicivorous fish species. The investigation involved both acute and chronic exposure scenarios.

Acute toxicity of BPA tests revealed a cumulative, dose-dependent mortality pattern with clear sex-related differences. Males showed heightened and early sensitivity even at low concentrations, whereas females exhibited delayed mortality, occurring at higher doses.

Chronic toxicity of BPA exposure induced pronounced physiological alterations. In males, significant reductions in the gonadosomatic index (GSI) and condition factor (K), alongside an increase in the hepatosomatic index (HSI), indicated reproductive impairment and metabolic imbalance. Similar effects were also observed in females, though with a more gradual progression.

Biomarker analysis revealed an early but transient antioxidant enzyme activation (GST, CAT) in females, followed by acetylcholinesterase (AChE) inhibition, glutathione (GSH) depletion, and elevated malondialdehyde (MDA) levels, indicating persistent oxidative stress—more pronounced in males. Additionally, a progressive, dose-dependent decrease in vitellin levels in females pointed to BPA-induced inhibition of vitellogenesis. In males, metabolic disruption was evidenced by testicular lipid accumulation and protein depletion, corroborated by histological damage such as germinal epithelium thinning and disorganization of spermatogenic cysts.

Collectively, these findings confirm the profound gonadal toxicity of BPA and its detrimental impact on reproductive function and fertility in aquatic organisms. The results highlight the potential ecological risk posed by BPA contamination in freshwater ecosystems and underscore the relevance of *Gambusia affinis* as a sensitive bioindicator in environmental monitoring programs.

Keywords: *Gambusia affinis*, Endocrine disruptor, Acute toxicity, Chronic toxicity, Bisphenol A, Biomarkers, Vitellins

ترتكز هذه الدراسة على نهج تجريبي متكامل ومتعدد المجالات، يهدف إلى تقييم التأثيرات الإيكوتوكسكولوجية لمركب البيسفينول أ (BPA)، وهو أحد الملوثات الهرمونية المنتشرة على نطاق واسع، وذلك على الوظائف الحيوية الأساسية لأسماك *Gambusia affinis*، وهي سمكة عذبة مائية تتغذى على يرقات البعوض وتُعد ككائن حي مؤثر بيولوجي فعال في النظم البيئية للمياه العذبة. وقد تم تنفيذ هذه الدراسة تحت ظروف تعرض حادة (96 ساعة) ومزمنة (60 يوماً) لكلا الجنسين.

أظهرت تجارب السمية الحادة أن معدل الوفيات كان تراكمياً ومعتمداً على الجرعة، مع اختلاف واضح بين الذكور والإناث؛ حيث أظهرت الذكور حساسية مبكرة وشديدة حتى عند التركيزات المنخفضة، في حين ظهرت الاستجابة لدى الإناث بشكل متأخر وعند تركيزات أعلى.

أما في ظروف التعرض المزمن، فقد تم تسجيل تغيرات ملحوظة على المستوى المورفومتري والفسبولوجي، حيث أظهرت الذكور انخفاضاً كبيراً في مؤشري الغدد التناسلية (IGS) واللياقة البدنية (K)، وزيادة في مؤشر الكبد (IHS)، مما يعكس اختلالاً وظيفياً في الجهاز التناسلي واضطراباً في التوازن الأيضي. ولوحظت تأثيرات مماثلة لدى الإناث ولكن بوتيرة أبطأ.

على المستوى البيوكيميائي، أظهر النظام المضاد للأكسدة (GST)، (CAT) تنشيطاً مبكراً ولكن مؤقتاً، تلاه تثبيط لإنزيم الأستيل كولين إستيراز (AChE)، ونقص في مستويات الجلوتاثيون المختزل (GSH)، وزيادة في المالونديألديهيد (MDA)، مما يدل على تعرض الكائن الحي للإجهاد التأكسدي، وكان ذلك أكثر وضوحاً لدى الذكور.

أما لدى الإناث، فقد سُجل انخفاض تدريجي ومعتمد على الجرعة في مستويات الفيتيلينات، مما يشير إلى تثبيط عملية تصنيع الفيتيلوجينين، نتيجة لتأثير البيسفينول أ الشبيه بالإستروجين. كما أكدت الملاحظات الهيستولوجية لدى الذكور وجود تلف كبير في الأنسجة الخصوية، تجلّى في ترقق الظهارة الجرثومية وتفكك الخلايا الجرثومية.

تؤكد هذه النتائج مجتمعة أن البيسفينول أ يشكل تهديداً كبيراً للوظائف التناسلية والبقاء البيئي لأسماك المياه العذبة، وتدعم اعتماد *Gambusia affinis* ككائن مؤثر في برامج الرصد الحيوي للمياه الملوثة.

الكلمات المفتاحية: *Gambusia affinis* ، بيسفينول أ ؛ ؛ سمية حادة ؛ السمية المزمنة ، المؤشرات الحيوية، الملوثات الهرمونية

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du BPA.....	14
Tableau 2. Principales ERO radicalaires et non-radicalaires.....	35
Tableau 3 : Position systématique de <i>G. affinis</i>	43
Tableau 4 : Dosage des lipides totaux : réalisation de la gamme d'étalonnage.....	66
Tableau 5: Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des protéines.	67
Tableau 6: Toxicité du bisphénol A (mg/L) à l'égard des adultes femelles de <i>G. affinis</i> après une exposition de 96h : mortalité corrigées (%), mortalité Transformé (%), Probits et une analyse statistique (test de Tukey HSD) : (moyenne \pm SEM ; trois répétitions pour chaque concentration, comportant chacune 10 individus).....	71
Tableau 7: Toxicité du bisphénol A (mg/L) après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h à l'égard des adultes femelles de <i>G. affinis</i> : analyse des probits de la CL ₂₅ , CL ₅₀ et CL ₉₀ (IC : intervalle de confiance).....	73
Tableau 8 : Toxicité du bisphénol A (mg/L) à l'égard des adultes mâles de <i>G. affinis</i> après une exposition de 96h : mortalité corrigées (%), mortalité Transformé (%), Probits et une analyse statistique (test de Tukey HSD) : (moyenne \pm SEM ; trois répétitions pour chaque concentration, comportant chacune 10 individus).....	76
Tableau 9: Toxicité du bisphénol A (mg/L) après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h à l'égard des adultes mâles de <i>G. affinis</i> : analyse des probits de la CL ₂₅ , CL ₅₀ et CL ₉₀ (IC : intervalle de confiance).....	78
Tableau 10: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice gonado-somatique (IGS) des femelles adultes de <i>G. affinis</i>	81
Tableau 11: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice gonado-somatique (IGS) des mâles adultes de <i>G. affinis</i>	83
Tableau 12: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice hépato-somatique (IHS) des femelles adultes de <i>G. affinis</i>	85
Tableau 13: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice hépato-somatique (IHS) des femelles adultes de <i>G. affinis</i>	87
Tableau 14: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice de condition (K) des femelles adultes de <i>G. affinis</i>	89
Tableau 15: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice de condition (K) des mâles adultes de <i>G. affinis</i>	91

Tableau 16 : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur l'activité de l'Acétylcholinestérase (AChE), chez les mâles et les femelles adultes de <i>G. affinis</i> en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀	93
Tableau 17: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur l'activité enzymatique du Glutathione-S transférase (GST), chez les mâles et les femelles adultes de <i>G. affinis</i> en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀	95
Tableau 18 : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur l'activité enzymatique de la Catalase (CAT), chez les mâles et les femelles adultes de <i>G. affinis</i> en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀	97
Tableau 19: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur le taux de Glutathion réduit (GSH), chez les mâles et les femelles adultes de <i>G. affinis</i> en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀	99
Tableau 20: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur le taux de Malondialdéhyde (MDA), chez les mâles et les femelles adultes de <i>G. affinis</i> en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀	101
Tableau 21: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur le taux de vitellines ovariennes (µg/mg de tissus), chez les femelles adultes de <i>G. affinis</i> en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (4,74 mg/L) et CL ₅₀ (7,74 mg/L)	103
Tableau 22: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur les réserves énergétiques : lipides et protéines (µg/mg de tissus), chez les mâles adultes de <i>G. affinis</i> en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (4,74 mg/L) et CL ₅₀ (7,74 mg/L)	107

Liste des figures

Figure 1. Perturbateurs endocriniens d'origines synthétiques	9
Figure 2. Premier avertissement international sur les risques des perturbateurs endocriniens	11
Figure 3. Structure chimique du bisphénol A.....	12
Figure 4. Réaction de formation de Bisphénol A.	13
Figure 5. Divers modes d'action du BPA	15
Figure 6. Structures du BPA comparée à celle du 17 β -œstradiol	16
Figure 7. Activité oestrogénique du BPA via les différents récepteurs cellulaires	17
Figure 8. Les sources potentielles de contact des organismes vivants avec le bisphénol A, contaminant ainsi les différentes matrices environnementales (eau, air et sol).....	19
Figure 9. Représentation des différentes voies de contamination des milieux aquatiques par le bisphénol A.....	23
Figure 10. Exemple de courbes dose-effet.....	32
Figure 11. Exemple de courbes dose-réponse	33
Figure 12. Rôle du stress oxydatif dans la neurodégénérescence	34
Figure 13. La production de GSH et les enzymes dépendantes.....	39
Figure 14. Schéma de la peroxydation lipidique	40
Figure 15. Anatomie externe de <i>Gambusia affinis</i>	44
Figure 16. Morphologie de la nageoire anale chez <i>Gambusia affinis</i> , (a) Nageoire anale chez la femelle, (b) Nageoire anale chez le mâle, (c) Epines hémiales de la nageoire anale chez la femelle, (d) Epines hémiales de la nageoire anale chez le mâle. Echelle = 1000 μ m.....	45
Figure 17. Répartition mondiale signalée de <i>Gambusia affinis</i> . Carte provenant du L'Inventaire National du Patrimoine Naturel.....	46
Figure 18. Localisation géographique du site d'échantillonnage	51
Figure 19. Technique d'échantillonnage de <i>G. affinis</i> (photos personnelles).....	52
Figure 20. Acclimatation de <i>G. affinis</i> au laboratoire (Photo personnelle)	53
Figure 21. Texture en poudre du Bisphénol A	53
Figure 22. Plan expérimentale des tests de toxicité aiguë du bisphénol A.....	54
Figure 23. Dissection des adultes <i>G. affinis</i> (Photo personnelle)	55
Figure 24. Extraction des vitellogénines et vitellines.....	63
Figure 25. Principales étapes d'extraction des métabolites : protéines, glucides, lipides	65

Figure 26. Toxicité du bisphénol A (mg/L), à l'égard des adultes femelles de <i>G. affinis</i> après une exposition de 96h : Mortalité corrigée et classification des concentrations selon le test HSD de Tukey.....	72
Figure 27. Courbe dose-réponse (concentration-effet), exprimant le pourcentage de mortalité corrigée chez les femelles adultes de <i>G. affinis</i> en fonction du logarithme de concentrations de BPA.....	73
Figure 28. Taux de mortalité (%) des adultes femelles de <i>G. affinis</i> exposés au bisphénol A. Après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h.....	74
Figure 29. Taux de survie (%) des adultes femelles de <i>G. affinis</i> exposés au bisphénol A. Après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h.....	74
Figure 30. Toxicité du bisphénol A (mg/L), à l'égard des adultes mâles de <i>G. affinis</i> après une exposition de 96h : Mortalité corrigée et classification des concentrations selon le test HSD de Tukey.....	77
Figure 31. Courbe dose-réponse (concentration-effet), exprimant le pourcentage de mortalité corrigée chez les mâles adultes de <i>G. affinis</i> en fonction du.....	78
Figure 32. Taux de mortalité (%) des adultes mâles de <i>G. affinis</i> exposés au bisphénol A. Après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h.....	79
Figure 33. Taux de survie (%) des adultes mâles de <i>G. affinis</i> exposés au bisphénol A. Après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h.....	79
Figure 34. Variation de l'indice gonado-somatique (IGS) chez les femelles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (6,81 mg/L) et CL ₅₀ (9,37 mg/L) ;	81
Figure 35. Variation de l'indice gonado-somatique (IGS) chez les mâles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (4,74 mg/L) et CL ₅₀ (7,74 mg/L) ; (Moyenne ± SEM ; n = 5).....	83
Figure 36. Variation de l'indice hépato-somatique (IHS) chez les femelles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (6,81 mg/L) et CL ₅₀ (9,37 mg/L), (Moyenne ± SEM ; n = 5).....	84
Figure 37. Variation de l'indice hépato-somatique (IHS) chez les mâles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (4,74 mg/L) et CL ₅₀ (7,74 mg/L), (Moyenne ± SEM ; n = 5).....	86
Figure 38. Variation de l'indice de condition (K) chez les femelles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (6,81 mg/L) et CL ₅₀ (9,37 mg/L), (Moyenne ± SEM ; n = 5).....	88

Figure 39. Variation de l'indice de condition (K) chez les mâles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (4,74 mg/L) et CL ₅₀ (7,74 mg/L), (Moyenne ± SEM ; n = 5).....	90
Figure 40. Variation de l'activité spécifique de l'Acétylcholinestérase (nM/min/mg protéines), chez les mâles et les femelles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀ , (Moyenne ± SEM ; n = 5) ;	93
Figure 41. Variation de l'activité enzymatique de la Glutathion S-transférase (µM/min/mg de protéines), chez les mâles et les femelles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀ , (Moyenne ± SEM ; n = 5) ;	95
Figure 42. Variation de l'activité enzymatique de la Catalase (µmolH ₂ O ₂ /min/mg de protéines), chez les mâles et les femelles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀ , (Moyenne ± SEM ; n = 5) ;	97
Figure 43. Variation de taux de Glutathion réduit (µmol/mg protéines), chez les mâles et les femelles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀ , (Moyenne ± SEM ; n = 5) ;	99
Figure 44. Variation de taux de Malondialdéhyde (nmol / mg protéines), chez les mâles et les femelles adultes de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ et CL ₅₀ , (Moyenne ± SEM ; n = 5) ;	101
Figure 45. Variation du taux de vitellines ovariennes (µg/mg de tissus) chez les adultes femelles de <i>Gambusia affinis</i> pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL ₂₅ (6,81 mg/L) et CL ₅₀ (9,37 mg/L),	103
Figure 46. Analyse en composantes principales (ACP) des biomarqueurs de stress oxydatif chez les mâles et femelles de <i>Gambusia affinis</i> exposés au BPA. L'ACP a été réalisée à partir de cinq biomarqueurs de stress oxydatif : le glutathion réduit (GSH), le malondialdéhyde (MDA), la catalase (CAT), la glutathion S-transférase (GST) et l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE). Chez les mâles (Figure 46 a, b), les deux premiers axes F1 et F2 expliquent respectivement 95,74 % et 2,88 % de la variance totale, tandis que chez les femelles (Figure 46 c, d), ces axes représentent 97,92 % et 1,08 % de la variance. C = Témoin ; BPA = bisphénol A ; CL ₂₅ /CL ₅₀ = concentrations testées ; J = jour d'exposition.....	105

Figure 47. Variation du taux des réserves énergétiques : lipides et protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus) chez les adultes mâles de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL_{25} (4,74 mg/L) et CL_{50} (7,74 mg/L) ; 107

Figure 48. Histologie des testicules de *Gambusia affinis* de poissons témoins (A, B, C) et de poissons traités au BPA (D, E, F) montrant différents stades de la spermatogenèse (A, B et C) 109

Liste des abréviations

AChE	Acétylcholinestérase
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AMPK	AMP-activated protein kinase
BHT	Hydroxytoluène butylé
BPA	Bisphénol A
BSA	Albumine de sérum bovin
BT	Bilirubine totale
CAT	Catalase
CCMH	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CDNB	1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
CL	Concentration létale
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHT	Dihydrotestostérone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque)
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GPR30	Récepteur GPR30
GPXs	Glutathion peroxydases
GSH	Glutathion réduit
GSR	Glutathion réductase
GSS	Glutathion synthase
GST	Glutathion S-transférase
GSTs	Glutathion-S-transférases

H₂O₂	Péroxydase d'hydrogène
HCL	Acide hydrochlorique
HHG	Hypothalamo-hypophysio-gonadique
HO₂	Forme protonnée du radical superoxyde
IGS	Indice gonado-somatique
IHS	Indice hépato-somatique
INPN	Inventaire National du Patrimoine Naturel
KCC2	Transporteur potassium-chlore
LH	Hormone lutéinisante
LOAEL	Niveau le plus bas d'effet observé (Lowest Observed Adverse Effect Level)
MDA	Malondialdéhyde
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NMDA	Récepteurs N-méthyl-D-aspartate
NOEL	Niveau sans effet observé (No Observed Effect Level)
O₂•-	Radical superoxyde
OH•	Radical hydroxyle
PCB	Polychlorobiphényles
PEs	Polluants organiques persistants
PTH	Parathormone
ROO•	Radicaux peroxydes
SERM	Modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes
SO	Stress oxydatif
T	Testostérone
TBA	Acide thiobarbiturique
VTG	Vitellogénine

Sommaire

Résumé	I
Abstract.....	II
ملخص	III
Liste des tableaux	IV
Liste des figures.....	VI
Liste des abréviations	X
I. Introduction	1

CHAPITRE I : LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

1. Généralité sur les perturbateurs endocriniens	7
1.1 Définition.....	7
1.2 Classification des perturbateurs endocriniens.....	8
1.2.1 Origine naturels	8
1.2.2 Origine synthétiques environnementaux.....	9
1.3 Mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens	10
1.4 Risque des perturbateurs endocriniens	11
2. Bisphénol A.....	12
2.1. Généralité.....	12
2.2 Propriétés physico-chimiques	13
2.3 Mode d'action du BPA.....	15
2.4 Activité oestrogénique du BPA.....	16
2.5 Source environnementale du Bisphénol A	18
2.6 Processus d'exposition au Bisphénol A.....	20
2.6.1 Voie orale	20
2.6.2 Voie cutanée	21
2.6.3 Voie inhalatrice.....	22
2.7 Effets écologiques nocifs sur les milieux aquatiques	22
2.8 Toxicité du Bisphénol A.....	24
2.8.1 Toxicité aiguë (court terme)	24
2.8.2 Toxicités chroniques (long terme).....	25
2.8.3 Neurotoxicité	25
2.8.4 Reprotoxicité.....	26

2.8.5 Effet cocktail.....	28
2.9 Dégradation du BPA dans les milieux aquatiques.....	29

CHAPITRE II : TOXICOLOGIE ET STRESS OXYDATIF

1. Notion toxicocinétique.....	31
1.1 Généralité en toxicologie.....	31
1.2 Modulation des effets toxiques.....	31
1.3 �valuation de la toxicité.....	32
1.3.1 Relation dose-effet.....	32
1.3.2 Relation dose-réponse.....	33
1.3.3 Relation dose-dépendant.....	33
2. Le stress oxydant.....	34
2.1 Définitions.....	34
2.2 Espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres.....	35
2.3 Systèmes antioxydants.....	36
2.3.1 Systèmes antioxydants enzymatiques.....	36
2.3.1.1 Acétylcholinestérase.....	36
2.3.1.2 Glutathion-S transférase.....	37
2.3.1.3 La Catalase.....	37
2.3.2 Systèmes non antioxydants enzymatiques.....	38
2.3.2.1 Glutathion réduit.....	38
2.3.2.2 Peroxydation lipidique.....	39

CHAPITRE III : *Gambusia affinis*

1. Intérêt de l'espèce.....	41
2. Historique de l'espèce.....	41
3. Position systématique.....	42
4. Morphologie de l'espèce.....	44
5. Dimorphisme sexuel.....	45
6. Répartition dans le monde.....	46
7. Habitat et �cologie.....	47
8. Cycle biologique.....	47
9. Reproduction et comportement.....	48
10. Régime alimentaire.....	49
11. Ennemis et prédation.....	50

II. MATERIEL ET METHODES	51
1. Présentation du site d'échantillonnage.....	51
2. Stratégie d'échantillonnage.....	52
3. Acclimatation en laboratoire.....	52
4. Protocole expérimental	53
4.1 Application du xénobiotique.....	53
4.2 Test de toxicité.....	54
4.3 Traitement chronique au BPA	55
5. Prélèvement des organes	55
6. Indices biométriques	56
6.1 Indice Gonado-Somatique	56
6.2 Indice Hépat-Somatique	56
6.3 Indice de condition	56
7. Dosage des biomarqueurs	57
7.1 Préparation de L'homogénat.....	57
7.2 Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)	57
7.3 Dosage du Glutathione-S Transferase (GST).....	58
7.4 Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	59
7.5 Dosage du glutathion réduit (GSH).....	60
7.6 Dosage de Malondialdéhyde (MDA)	62
7.7 Extraction et dosage des vitellines.....	63
7.8 Dosage des protéines	64
8. Etude des réserves énergétique des gonades	64
8.1 Dosage des lipides totaux	66
8.2 Dosage des protéines totales.....	66
9. Etude histologique	67
10. Etude statistique.....	69
III. Résultats	70
1. Toxicité aigüe du Bisphénol A.....	70
1.1 Toxicité a l'égard des adultes femelles.....	70
1.2 Toxicité a l'égard des adultes mâles.....	75
2. Indices biométriques	80
2.1 Indice Gonado-Somatique IGS.....	80
2.1.1 Femelles de <i>Gambusia affinis</i>	80

2.1.2 Mâles de <i>Gambusia affinis</i>	82
2.2 Indice Hépat-Somatique (IHS)	84
2.2.1 Femelles de <i>Gambusia affinis</i>	84
2.2.2 Mâles de <i>Gambusia affinis</i>	86
2.3 Indice de condition (K).....	88
2.3.1 Femelles de <i>Gambusia affinis</i>	88
2.3.3 Mâles de <i>Gambusia affinis</i>	89
3. Effet du Bisphénol a sur les biomarqueurs de dommage	92
3.1 Effet sur l'acétylcholinestérase (AChE)	92
3.2 Effet sur le Glutathione-S Transferase (GST)	94
3.3 Effet sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	96
3.4 Effet sur le taux de glutathion réduit (GSH)	98
3.6 Effet sur le taux des vitellines.....	102
3.8 Analyse en Composantes Principales (ACP)	104
4. Effet du bisphénol a sur les réserves énergétiques de <i>Gambusia affinis</i>	106
5. Etude histologiques testiculaires induites par le BPA chez <i>Gambusia affinis</i>	108
IV. Discussion	110
1. Toxicité aigüe du Bisphénol A	110
2. Effet sur les indices biométriques	113
2.1 Effet sur l'indice Gonado-Somatique	113
2.2 Comparaison intersexués de l'indice Gonado-Somatique	114
2.3 Effet sur l'indice hépat-somatique.....	116
2.4 Comparaison intersexués de l'indice hépat-somatique.....	117
2.5 Effet sur l'indice de condition	118
2.6 Comparaison intersexués de l'indice de condition	119
3. Effet du Bisphénol a sur les biomarqueurs de dommage	120
3.1 Effet sur l'acétylcholinestérase (AChE)	120
3.2 Comparaison intersexuée de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE).....	121
3.3 Effet sur Le Glutathione-S Transferase (GST).....	122
3.4 Comparaison intersexuée de l'activité de la GST.....	123
3.5 Effet sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	124
3.6 Comparaison intersexuée de l'activité de la catalase	125
3.7 Effet sur le taux de glutathion réduit (GSH)	126
3.8 Comparaison intersexuée du taux de GSH.....	127

3.9 Effet sur le taux de Malondialdéhyde (MDA).....	127
3.10 Comparaison intersexuée du taux de MDA.....	128
4. Effet sur le taux des vitellines.....	129
5. Effet du Bisphénol a sur les réserves énergétiques <i>de Gambusia affinis</i>	131
6. Etude histologiques testiculaires induites par le BPA chez <i>Gambusia affinis</i>	134
V. Conclusion et perspectives	136
Références Bibliographiques	139
Annexes	142

Introduction

1. Introduction

Les composés perturbateurs endocriniens (EDC) sont des imitateurs potentiels de certaines hormones naturelles comme les substances exogènes qui peuvent stimuler ou supprimer les réponses hormonales (Ghosh *et al.*, 2022; Rosenfeld, 2021; Metcalfe *et al.*, 2022). Ils exercent leur toxicité en interférant avec les mécanismes homéostatiques hormonaux impliqués dans la croissance et le développement de divers tissus des organismes vivants (Cargnelutti *et al.*, 2020). Actuellement, environ 900 produits chimiques ont été identifiés ou considérés comme des perturbateurs endocriniens par l'Union européenne, l'accrétion et la persistance de ces derniers dans l'environnement aquatique constituent une menace pour la vie biologique, comme en témoigne l'empoisonnement chronique et aiguë des poissons et autres organismes aquatiques et peuvent réagir en synergie, cette exposition nocive est actuellement considérée comme l'une des craintes anthropiques les plus sérieuses pour la biodiversité (Plattard *et al.*, 2021 ; UE, 2020).

Parmi les EDC, le bisphénol A (diphénol propane, 2,2-bisphénol propane, BPA) est l'un des bisphénols les plus produits et utilisés au monde (Cesen *et al.*, 2018 ; Ballesteros-Gómez *et al.*, 2022). Il altère le système reproducteur des mâles et des femelles même et le système nerveux à des niveaux d'exposition extrêmement faibles (Cano-Nicolau *et al.*, 2016 ; Molina *et al.*, 2018 ; Vandenberg *et al.*, 2019). Le BPA est un composé anthropique dont le volume de production est le plus élevé, utilisé quotidiennement dans une variété d'applications industrielles partout dans le monde (Huang *et al.*, 2017). En effet, il est présent dans la majorité des matériaux en plastiques fabriqués à base de polycarbonate et dans les résines époxy, il a été détecté dans l'atmosphère, le sol et les milieux aquatiques, ainsi que dans les aliments, la poussière domestique, les produits de consommation et les matrices biotiques (Chang *et al.*, 2019 ; Michalowicz *et al.*, 2014 ; Sharma et Chadha, 2021 ; Afzal *et al.*, 2022). Selon des rapports récents de l'agence de protection de l'environnement (EPA), plus d'un milliard de livres de BPA s'échappent chaque année dans l'environnement, illustrant ainsi l'étendue des problèmes d'exposition potentiels qui peuvent être rencontrés (Shafei *et al.*, 2018). La présence du BPA dans l'environnement aquatique, soulève la question des effets de ce xénobiotique et le risque auquel sont exposées les espèces aquatiques (Caballero-Gallardo *et al.*, 2016 ; Pirontiet *al.*, 2021). Le rejet du bisphénol A dans l'environnement est estimé à 450 tonnes/ ans, il peut être

introduit dans les systèmes aquatiques via plusieurs sources y compris lessivage du sol, lixiviation des rejets domestique et industriels (Schwarzenbach *et al.*, 2010).

Le bisphénol A et ses analogues peuvent être détectés dans les eaux de surfaces les eaux sous terraines les eaux usées ainsi que le sédiment ou l'air (Yu *et al.*, 2023 ; Xing *et al.*, 2022 ; Ali *et al.*, 2023). La sensibilité des antioxydants endogènes chez les poissons pourrait être utilisée comme un bon indicateur d'exposition aux polluants aquatiques, y compris le BPA (Burgos-Aceves *et al.*, 2018 ; Stara *et al.*, 2020 ; Vazirzadeh *et al.*, 2020 ; Sharma et Chadha, 2021). Le dernier peut induire un état de stress oxydatif via son effet pro-oxydant favorisant une hyperproduction de radicaux libres (Messaoudi *et al.*, 2020). Ces derniers pourraient interagir avec les molécules biologiques tel que, les lipides, les protéines et causer de ce fait des perturbations du métabolisme cellulaire (Sayed et Hamed, 2017). En outre, il a été récemment rapporté que le BPA à faible concentration induit des perturbations au niveau des activités des enzymes antioxydantes dans le cerveau, le foie, les branchies et les reins chez la carpe *Hypophthalmichthys nobilis* (Akram *et al.*, 2021).

Les poissons sont largement reconnus comme des bioindicateurs efficaces de la qualité des milieux aquatiques en raison de leur sensibilité élevée aux contaminants environnementaux (Authman *et al.*, 2015 ; Dietrich *et al.*, 2022). Leur capacité à bioaccumuler, métaboliser et intégrer divers polluants dans leurs tissus les rend particulièrement adaptés à l'évaluation des expositions prolongées aux polluants (Okwuosa *et al.*, 2019 ; Katkova-Zhukotskaya et Kalyujnaya, 2023). En outre, leur diversité écologique, leur appartenance à plusieurs niveaux trophiques, ainsi que leur cycle de vie relativement long permettent une interprétation intégrée des effets toxiques dans l'environnement aquatique (Castilhos Ghisi *et al.*, 2020 ; Denslow et Sabo-Attwood, 2015). Le poisson téléostéen *Gambusia affinis* est souvent utilisée en raison de sa large distribution, de son cycle de reproduction court et de sa capacité à refléter les altérations sexuelles induites par des progestatifs et autres EDCs (Olivares-Rubio et Dzul-Caamal, 2015 ; Hou *et al.*, 2019). La reproduction chez les poissons est un processus clé dans la préservation des populations aquatiques et dans la gestion durable de la biodiversité (Miranda et Somoza, 2022). Chez *G. affinis*, le cycle de reproduction est bimodal : une période d'activité sexuelle étendue d'avril à octobre et une phase de repos reproductif d'octobre à mars (Doering *et al.*, 2021). Des études récentes ont confirmé que ce cycle peut être perturbé par des effluents urbains

ou industriels riches en composés œstrogéniques et autres gestagènes, altérant les rythmes hormonaux et la structure gonadique (Mills et Chichester, 2005; Oviya et al., 2023).

Chez les espèces ovovivipares comme *Gambusia affinis*, ces indicateurs sont particulièrement utilisés pour évaluer les réponses aux stress environnementaux. Les contaminants environnementaux, notamment les perturbateurs endocriniens (EDCs), influencent de manière significative ces paramètres. Ils provoquent des déséquilibres du sex-ratio, des baisses de l'indice gonado-somatique, une atrophie gonadique ou encore une diminution de la viabilité et du nombre d'ovocytes (Watkins, 2012 ; Bazzoli et al., 2014). L'indice gonado-somatique (IGS) est un indicateur biologique fondamental qui exprime la proportion du poids des gonades par rapport au poids total du poisson. Il est couramment utilisé pour suivre le cycle reproductif, évaluer le degré de maturité sexuelle, et détecter des fluctuations hormonales liées à l'environnement ou à la saison (Caballero-Huertas et al., 2022 ; Ahammad et al., 2021). Par ailleurs, des facteurs tels que la pollution, la température ou la salinité peuvent influencer le RGS, altérant potentiellement la fertilité et la reproduction (El-Sisy et al., 2024 ; Mekonnen et al., 2025).

L'indice hépato-somatique (IHS) quantifie le pourcentage du poids du foie par rapport au poids corporel total. Il reflète l'état nutritionnel, les réserves énergétiques et les fonctions métaboliques du foie (Mnemba et al., 2022). Cet indicateur est sensible aux variations de l'environnement telles que la qualité de l'eau, les contaminants, et le stress physiologique (Alioua et al., 2021 ; Uedeme-Naa et al., 2019). Une élévation de l'IHS peut indiquer une mobilisation énergétique accrue, tandis qu'une baisse prolongée est souvent liée à une exposition chronique à des toxiques ou à une malnutrition (Jan et al., 2022 ; Saliu et al., 2018). L'indice de condition (K), ou facteur de condition de Fulton, est un indicateur intégratif du bien-être général, de la forme corporelle et de la qualité de l'environnement dans lequel évolue un poisson (Muhammad et al., 2021 ; Solomon et al., 2021). Il est influencé par la croissance, l'alimentation, le sexe, la maturité et le cycle reproducteur (Merrill et Collins, 2015). Une valeur élevée du K est généralement le signe d'un bon état sanitaire et d'une disponibilité alimentaire optimale, alors qu'un indice faible peut signaler un stress environnemental, une contamination ou une dégradation de l'habitat (Ahammad et al., 2021).

Les biomarqueurs sont des outils sensibles et intégrés pour évaluer l'impact de la pollution sur les organismes aquatiques. En tant qu'indicateurs précoces de stress cellulaire, ils

permettent de détecter l'exposition aux xénobiotiques et leurs effets biologiques avant l'apparition de dommages visibles. L'approche multibiomarqueurs, qui combine plusieurs paramètres (ex. : acétylcholinestérase, catalase, glutathion-S-transférase, malondialdéhyde), offre une évaluation complète de la qualité de l'environnement. Toutefois, l'interprétation de ces données reste complexe en raison de l'influence de facteurs naturels (cycle reproductif, saisonnalité, température) sur la variation de ces biomarqueurs. Malgré cela, leur usage est largement validé dans les études écotoxicologiques récentes, notamment sur les bivalves et poissons exposés aux rejets urbains ou industriels, soulignant leur pertinence dans la biosurveillance environnementale (Belmokhtar *et al.*, 2024 ; Chahouri *et al.*, 2022 ; Sharma *et al.*, 2024).

La vitellogénine (Vtg) est aujourd'hui largement reconnue comme un biomarqueur sensible de l'exposition aux perturbateurs endocriniens (EDCs). Ces substances, souvent présentes dans les effluents domestiques ou industriels, peuvent induire une expression anormale de Vtg, notamment chez les mâles ou les juvéniles, chez lesquels cette protéine n'est normalement pas produite (Hiramatsu *et al.*, 2006 ; Hutchinson *et al.*, 2006). La vitellogénine est une phospholipoprotéine de réserve essentielle, synthétisée dans le foie des femelles ovipares sous l'influence des œstrogènes, et transportée via le sang jusqu'aux ovocytes où elle est stockée sous forme de vitelline. Ce dépôt constitue la principale source nutritive pour l'embryon et les premiers stades larvaires, rendant sa qualité et sa quantité déterminantes pour le succès reproductif (Souza *et al.*, 2023 ; Guerrero-Estévez et López-López, 2016). Durant la vitellogenèse, un apport nutritionnel riche en protéines et lipides est nécessaire pour assurer une synthèse optimale de Vtg, précurseur des protéines lipovitelline et phosphovitelline (Pan *et al.*, 2019). Ainsi, l'augmentation de la Vtg chez des individus non reproducteurs constitue un signal précoce de contamination œstrogénique dans l'environnement aquatique, permettant une surveillance biologique efficace (Jin *et al.*, 2009 ; Souza *et al.*, 2023).

En complément des biomarqueurs, les réserves énergétiques, notamment les lipides, sont de puissants indicateurs de l'état physiologique des poissons et de la qualité de leur environnement. Les lipides représentent la principale source d'énergie métabolique, jouant un rôle crucial dans les processus de croissance, de reproduction, de locomotion et notamment de migration chez les espèces anadromes (Smiley *et al.*, 2022 ; Ding *et al.*, 2022). Ils fournissent jusqu'à deux fois plus d'énergie que les protéines et sont stockés principalement dans le foie,

les muscles ou les gonades, selon les stratégies écologiques de chaque espèce (de Sousa Rangel *et al.*, 2021). Une mobilisation accrue de ces réserves peut indiquer une réponse adaptative au stress environnemental, notamment à des contaminants ou à des variations thermiques, ce qui en fait un biomarqueur fonctionnel complémentaire aux indices classiques (Touaibia *et al.*, 2023). L'exposition au bisphénol A induit une accumulation excessive de lipides dans les tissus hépatiques et gonadiques des poissons, traduisant une altération significative de leur métabolisme énergétique et hormonal. Des études récentes ont démontré que le BPA perturbe l'expression des gènes associés à la lipogenèse, inhibe la β -oxydation des acides gras, et engendre une dysrégulation lipidique marquée, en particulier au niveau du foie et des testicules. Cette perturbation métabolique s'accompagne fréquemment de stéatose hépatique, de stress oxydatif, ainsi que de déséquilibres hormonaux, compromettant la santé reproductive des poissons exposés (Zhang *et al.*, 2023 ; Gu *et al.*, 2021). Par ailleurs, une diminution des protéines testiculaires a été corrélée à une altération de la stéroïdogenèse, à une apoptose cellulaire accrue et à des anomalies de la spermatogenèse, réduisant considérablement la fertilité (Alavi *et al.*, 2021). Ces effets délétères peuvent être exacerbés par des stress nutritionnels, qui limitent les ressources nécessaires à la biosynthèse protéique et à la protection cellulaire (Fan *et al.*, 2021).

La recherche sur l'impact du bisphénol A sur les espèces aquatiques est d'une importance cruciale car elle permet de mieux comprendre les risques liés à la pollution chimique dans nos écosystèmes, ce qui peut contribuer à la création d'une gestion efficace pour limiter les risques associés à ces perturbateurs endocriniens. Le présent travail expérimental a pour but d'examiner ces effets toxiques en exposant un poisson culiciphage d'eau douce *Gambusia affinis* à différentes concentrations de BPA dans un environnement contrôlé. Cette approche permet d'observer les effets toxicologiques spécifiques du BPA à deux concentrations (CL_{25} et CL_{50}), sur divers paramètres biologiques divisée en deux volets principaux :

Dans un premier volet, déterminer les effets létaux du BPA chez les adultes mâles et femelles de *Gambusia affinis* en estimant les concentrations létales médianes CL_{25} et CL_{50} aux temps d'exposition de 24 h, 48 h, 72 h et 96 h.

Dans un deuxième volet, évaluer la toxicité chronique (60 jours d'expérience) à différentes concentrations « $CL_{25}/96h$ et $CL_{50}/96h$ » à travers l'analyse de différents paramètres biologiques :

- Paramètres morphométriques et somatiques : indice gonado-somatique (IGS) et indice hépato-somatique (IHS) et indice de condition (K) chez les mâles et femelles ;
- Biomarqueurs biochimiques de stress oxydatif et de détoxification : activité des enzymes AChE, CAT, GST ; taux de glutathion réduit (GSH), malondialdéhyde (MDA) ;
- Indicateurs spécifiques au sexe :
 - ✓ Chez les femelles : dosage de la vitellogénines, marqueur d'exposition aux composés œstrogéno-mimétiques.
 - ✓ Chez les mâles : quantification des réserves énergétiques (lipides et protéines totales).
- Analyse histologique des gonades : pour détecter d'éventuelles altérations structurales et fonctionnelles liées à l'exposition chronique.

Chapitre I

Synthèse bibliographique
Les perturbateurs endocriniens

CHAPITRE I : LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

1. Généralité sur les perturbateurs endocriniens

1.1 Définition

Le terme "perturbateurs endocriniens" désigne un ensemble de "composés ou mélanges de composés qui perturbent le système endocrinien", c'est-à-dire des substances qui interagissent avec l'action des hormones (Zoeller et al., 2022). Le principe de perturbateur endocrinien (ou modulateur endocrinien, *endocrine disruptor* en Anglais) est apparue en 1991, lors d'un colloque réuni à l'initiative de Theo Colborn, le *Wingspread Consensus Statement* (vingt et un scientifiques de quinze disciplines différentes : toxicologie, endocrinologie, biologie, immunologie, etc) (Colborn, 1991). La définition la plus communément admise, est celle proposée par l'OMS en 2002: «Toute molécule ou agent chimique, interférant avec les fonctions du système hormonal d'un organisme vivant, et qui risque d'influer négativement sur les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones, donc susceptible d'avoir des effets néfastes sur la sante » .

Les composés perturbateurs endocriniens (EDC) sont des substances exogènes capable de modifier la réponse hormonale naturelle et d'interférer avec des processus biologiques comme la reproduction et le développement des organismes vivants (Ghosh et al., 2022; Rosenfeld, 2021). Environ 900 produits chimiques sont actuellement répertoriés comme perturbateurs endocriniens par l'Union Européenne (Plattard et al., 2021; UE, 2020). Le concept de perturbation endocrinienne implique un mécanisme toxique qui modifie la capacité des cellules, des tissus ou des organes à répondre correctement aux signaux hormonaux. Cela peut entraîner une variété d'effets néfastes pour la santé, en fonction du type et de l'intensité de l'interaction avec les hormones. Toutefois, il est important de distinguer deux points clés. D'une part, tous les agents chimiques ne perturbent pas uniquement les systèmes hormonaux liés à la reproduction. Certains peuvent affecter d'autres fonctions endocriniennes essentielles, telles que le métabolisme ou la croissance (Guarnotta et al., 2022). En revanche, certaines substances peuvent interagir avec le système hormonal sans pour autant engendrer d'effets nocifs sur la santé. Bien qu'elles puissent influencer l'activité hormonale, elles ne sont pas classées parmi les perturbateurs endocriniens, puisqu'elles ne provoquent aucun effet délétère sur l'organisme.

En effet, seules les substances dont l'interaction avec le système hormonal provoque des effets délétères sont classées comme perturbateurs endocriniens (Guarnotta *et al.*, 2022). Les conséquences des perturbateurs endocriniens sont variées, comprenant des troubles de la fertilité, des malformations génitales, des troubles du comportement, des perturbations du système immunitaire, et des cancers (Li *et al.*, 2024; Schjenken *et al.*, 2021). Les perturbateurs endocriniens possèdent des caractéristiques uniques qui provoquent des effets néfastes même à de faibles doses d'exposition. Contrairement aux substances classiques, ces agents ne suivent pas une relation dose-réponse linéaire, où les effets sont proportionnels à la dose reçue. En effet, certains effets peuvent se manifester à de faibles doses, diminuer à mesure que la dose augmente, puis réapparaître à des niveaux plus élevés, ce qui donne lieu à une relation dose-réponse non monotone (van der Most *et al.*, 2024).

1.2 Classification des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens peuvent être classés selon leur origine, soit anthropique, soit naturelle. Ces substances sont présentes dans l'environnement et la chaîne alimentaire, où elles peuvent avoir des effets négatifs. Les perturbateurs endocriniens d'origine anthropique sont principalement des produits chimiques fabriqués par l'homme, tandis que ceux d'origine naturelle proviennent des plantes et des animaux. Ces substances sont omniprésentes et peuvent interagir avec le système endocrinien des organismes vivants, ce qui soulève des préoccupations en matière de santé publique (Ray *et al.*, 2023; Padmanabhan *et al.*, 2021).

1.2.1 Origine naturels

Les substances naturelles générées par le corps, qu'il s'agisse des humains ou des animaux, appartiennent à une large classe de molécules lipophiles. Elles agissent principalement sur des récepteurs variés, régulant de nombreuses fonctions physiologiques. Parmi elles, on distingue principalement deux grandes catégories d'hormones : les androgènes, tels que la déhydroépiandrostérone (DHEA), la dihydrotestostérone (DHT) et la testostérone (T), et les œstrogènes, comme l'œstrone (E1), l'œstradiol (E2) et l'œstriol (E3). L'activation ou l'inhibition des récepteurs stéroïdes par ces hormones constitue un modèle fréquemment utilisé pour étudier les perturbations endocriniennes, particulièrement l'interférence avec la signalisation des récepteurs des œstrogènes. Des recherches ont démontré la présence d'œstrogènes naturels dans les effluents des stations d'épuration (Amir *et al.*, 2021; Li *et al.*,

2022). En outre, certains végétaux contiennent des phyto-œstrogènes, qui sont des composés d'origine végétale ayant une structure chimique similaire à celle des œstrogènes. Ces derniers, bien que non stéroïdes, agissent comme des perturbateurs endocriniens et se retrouvent dans des aliments comme le soja (Guarnotta *et al.*, 2022).

1.2.2 Origine synthétiques environnementaux

Les PEs d'origine industrielle, en particulier ceux issus de l'industrie agroalimentaire, phytosanitaire et cosmétique, représentent un problème majeur. Chaque année, la liste de ces produits s'allonge, touchant des secteurs variés tels que l'industrie alimentaire, les cosmétiques, les pesticides, les peintures, les plastiques, et les solvants. Ils appartiennent à plusieurs familles : les solvants et leurs déchets (polychlorobiphényles [PCB], dioxines), des plastifiants (2,2'-bis-4-hydroxyphenyl-propane, ou bisphénol-A [BPA]), phtalates), des pesticides (méthoxychlore, chlorpyrifos, dichloro-diphényl-trichloroéthane [DDT]), des fongicides (vinclozoline), des retardateurs de flamme et des agents pharmacologiques (diéthylstilbestrol [Distilbène® , DES] (Jaffiol, 2022) (**Figure 1**). Les œstrogènes synthétiques interagissent avec les hormones endogènes de différentes manières : par compétition, en bloquant ou activant certaines voies métaboliques, ou encore en remplaçant les œstrogènes naturels. Ces interactions sont de plus en plus scrutées dans des études environnementales, mettant en lumière les risques liés à leur présence dans l'eau et les produits du quotidien (Rudel *et al.*, 2021; Goralczyk, 2023).

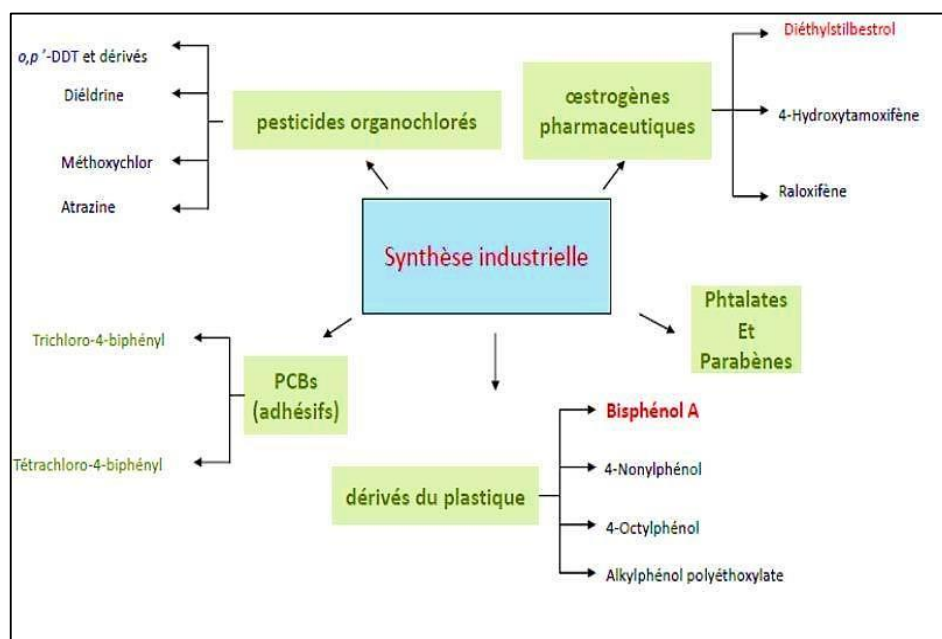


Figure 1. Perturbateurs endocriniens d'origines synthétiques (Jaffiol, 2022)

1.3 Mécanisme d'action des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens peuvent interférer avec les systèmes hormonaux par différents mécanismes d'action. Ayant des interactions avec les récepteurs hormonaux, on modifiant ou bloquant les voies métaboliques naturelles. Ils résultent de diverses actions chimiques, notamment par la compétition avec les récepteurs hormonaux et l'altération de la signalisation des hormones (Guarnotta *et al.*, 2022). Les perturbations chimiques résultent de diverses actions :

- Imitation de l'action des hormones endogènes (effet agoniste) : Certaines substances perturbatrices endocriniennes (PE), ayant une structure chimique similaire à celle des hormones naturelles, peuvent interagir avec les récepteurs hormonaux et activer ces récepteurs, mimant ainsi l'action d'une hormone endogène. Cela entraîne des effets similaires, notamment par l'activation ou l'inhibition de la transcription des gènes. Des exemples incluent le nonylphénol et l'éthinylestradiol, connus pour leurs effets œstrogéniques (Zhao *et al.*, 2024).
- Inhibition des interactions entre les hormones et leurs récepteurs (effet antagoniste) : D'autres PE se lient aux récepteurs hormonaux sans les activer, empêchant ainsi l'hormone endogène de se fixer à son récepteur. Cela bloque l'activité normale des récepteurs, perturbant les fonctions cellulaires liées aux hormones, et inhibe la fixation du complexe hormone/récepteur sur l'ADN, empêchant ainsi l'activation des gènes cibles. Le bisphénol A est un exemple de PE à activité anti-androgénique (Zhang *et al.*, 2022).
- Action sur la synthèse, le transport, le métabolisme et l'excrétion des hormones : Certains PE perturbent les processus métaboliques intracellulaires, modifiant la biosynthèse des hormones par l'interférence avec les enzymes de la stéroïdogénèse, affectant ainsi la production d'androgènes (Zughaibi *et al.*, 2022).
- Altération du développement des récepteurs hormonaux et de leurs fonctions : Les PE peuvent altérer le développement des récepteurs hormonaux, soit en supprimant soit en activant leur développement, affectant ainsi la régulation protéique de ces récepteurs. Par exemple, le bisphénol A modifie la régulation des récepteurs nucléaires par la dégradation protéasomale (Combarous *et al.*, 2022).
- Altération des fonctions hormonales par des interactions avec les hormones : Certains PE interagissent directement avec les hormones, modifiant ainsi leurs messages biologiques et

perturbant les fonctions cellulaires à plusieurs niveaux du système endocrinien (Liang et al., 2023).

1.4 Risque des perturbateurs endocriniens

La déclaration de **Wingspread de 1991** a constitué le premier avertissement international concernant les risques des perturbateurs endocriniens pour la santé humaine (**Figure 2**). Cet événement a marqué un tournant dans la reconnaissance des effets potentiels des perturbateurs endocriniens, soulignant leur capacité à perturber le système hormonal et à affecter non seulement la faune mais aussi les êtres humains. Ce consensus a joué un rôle fondamental dans les recherches et régulations ultérieures sur les produits chimiques influençant le système endocrinien (Gore et al., 2024).

«En raison de leur persistance dans l'environnement et de leur accumulation dans les chaînes alimentaires, de nombreux composés libérés dans la nature par les activités humaines sont capables de dérégler le système endocrinien des animaux. Les hommes sont également affectés par ces composés. La période d'exposition est cruciale, la période embryonnaire étant particulièrement vulnérable. Ses effets se manifestent surtout sur la génération suivante. Les études en laboratoire confirment les perturbations observées dans la nature et permettent de comprendre les mécanismes biologiques en jeu»

Figure 2. Premier avertissement international sur les risques des perturbateurs endocriniens (Wingspread, 1991).

Ces substances chimiques représentent une menace importante tant pour les animaux que pour les humains. Chez les animaux, notamment les poissons, les perturbateurs endocriniens peuvent provoquer des altérations hormonales qui affectent leur reproduction, leur développement et leur comportement (Sibiya et al., 2023). De plus, l'accumulation de ces substances dans les tissus des animaux aquatiques peut avoir des effets neurotoxiques et affecter leur santé reproductive (Kumar et al., 2023). Les humains, quant à eux, sont également vulnérables aux effets des PE. Ces substances sont couramment ingérées via l'alimentation, notamment par la consommation de poissons contaminés. L'exposition aux perturbateurs endocriniens, tels que le BPA et les phtalates, est liée à divers troubles hormonaux chez l'homme, notamment des troubles métaboliques comme la résistance à l'insuline et des risques accrus de diabète (Singh et al., 2023). Ces produits chimiques sont également associés à des effets néfastes sur la fertilité, le développement du cancer et d'autres maladies endocriniennes (Sharma et al., 2023).

2. Bisphénol A

2.1. Généralité

Le bisphénol A [2,2-Bis (4-hydroxyphenyl) propane, $C_{15}H_{16}O_2 = 228.29 \text{ g/mol}$] (**Figure 3**) est un composé synthétique et un additif qui augmente la flexibilité et la durabilité des plastiques (Predieri *et al.*, 2022), appartenant à la famille des phénols connu depuis XXème siècle, synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste russe Aleksandr Pavlovitch Dianin, d'où la nomination initiale «composé Dianin» (Dianin, 1891), qui a combiné du l'acétone avec deux phénols en présence d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique concentré (Goodman *et al.*, 2014). En 1905 il a été mis en évidence par Zincke en utilisant la condensation de l'acétone avec deux correspondants du phénol, et signalé comme étant un œstrogène synthétique dans les années 1930, dans les années 1950, les scientifiques ont découvert que la réaction du BPA avec le phosgène (chlorure de carbonyle) générant une résine dure et transparente connue sous le nom de polycarbonate (Dodds *et Lawson*, 1936 ; Rochester, 2013). En juin 2017, le BPA est classé par le comité des États membres de l'agence européenne des produits chimiques comme substance extrêmement préoccupante dans le règlement REACH « Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of CHemicals » du fait de sa toxicité sur la reproduction puis de ses propriétés de perturbateur endocrinien (ECHA 2020).

Formule brute: $C_{15}H_{16}O_2$

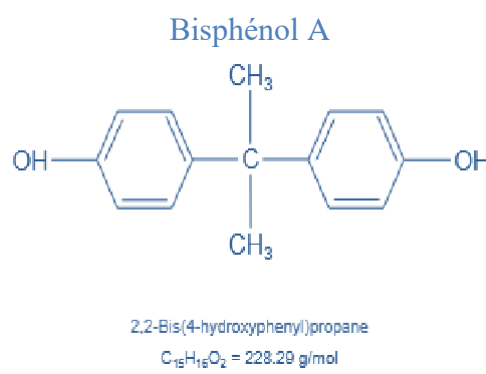


Figure 3. Structure chimique du bisphénol A (Besaratina, 2023)

Le BPA est un perturbateur endocrinien environnemental, même à faible dose, capable de limiter ou de bloquer les récepteurs et de modifier les concentrations hormonales via la perturbation du processus physiologique à savoir l'interférence avec les voies hormonales et les

modifications épigénétiques ce qui affecte les fonctions de l'organisme (Abraham et Chakraborty, 2020 ; Rotimi *et al.*, 2021).

Il est classé comme produit reprotoxique de catégorie 1B par l'agence européenne des substances chimiques (ECHA) et la Commission européenne (directive 94/33/EC), sur les recommandations de l'ANSES, établies à partir des bioindicateurs animales sur les effets du BPA sur la fertilité et le système reproducteur (ANSES 2019). En tant que substance chimique perturbatrice du métabolisme et du système endocrinien, le BPA peut perturber l'homéostasie oxydative par des mécanismes directs ou indirects, incluant l'augmentation des médiateurs oxydatifs et la réduction des enzymes antioxydantes, ce qui entraîne une dysfonction mitochondriale, une altération des voies de signalisation cellulaire et l'induction de l'apoptose (Wang *et al.*, 2019 ;Tavakkoli *et al.*, 2020).

2.2 Propriétés physico-chimiques

La molécule BPA appartient à la famille des diphenylalcalanes hydroxylés ou bisphénols, contient deux groupements fonctionnels phénols, possède des nomenclatures scientifiques : 2,2-Bis (4-hydroxyphenyl) propane aussi 4,4'-(propan-2-ylidène) diphénol ou p, p'isopropylidènebisphénol. Il réagit vigoureusement avec les bases fortes ainsi que les chlorures et anhydrides d'acides, la réaction est exothermique, avec les oxydants puissants, elle peut également être violente et source d'incendie et d'explosion (INERIS, 2022). C'est un composé organique constitué de deux cycles phénoliques liés par du carbone avec deux groupes méthyle qui lui sont reliés (**figure 4**) (Hu *et al.*, 2023).

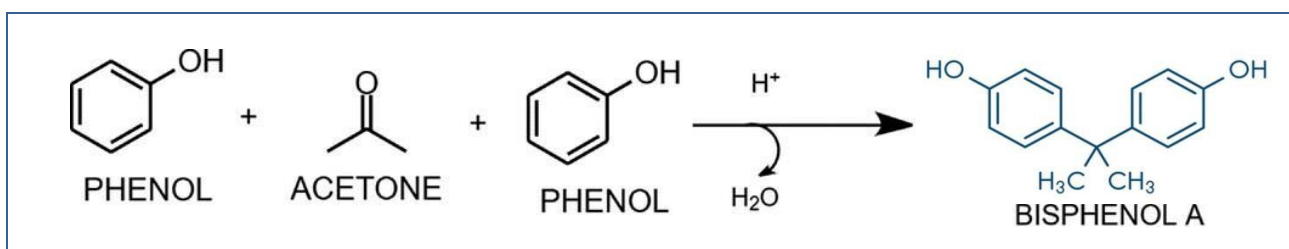


Figure 4 . Réaction de formation de Bisphénol A.

Le bisphénol A est un solide blanc d'une masse volumique de 1,2 g/cm³, avec un point de fusion de 158° C et un point d'ébullition de 360° C. C'est un composé hydrosoluble (300 mg/L) à une température ambiante (120-300 mg/L à 25° C), alors qu'il est bien soluble dans les solvants organiques tels que l'éther diéthylique, l'acétone, le benzène, l'éthanol, ainsi que dans

les bases fortes et l'acide acétique (Ohore et Zhang, 2019). La nature lipophile du BPA est également indiquée par un log P de 3,5. La demi-vie du BPA est d'environ 4-5 jours dans l'eau et le sol, alors qu'elle est inférieure à un jour dans l'air, en raison de sa faible volatilité (Cousins et al., 2002 ; Abraham et al., 2009).

Les propriétés physicochimiques peuvent aider les scientifiques à prédire le devenir environnemental des BP dans le milieu aquatique, les polluants dont le log $K_{ow} > 3$ ont tendance à s'adsorber dans les sédiments et à se bioaccumuler dans les tissus des organismes aquatiques (Howard et Muir, 2010).

Les caractéristiques physicochimiques sont résumées dans le **tableau 1** :

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du BPA (INERIS, 2010 -2022).

Paramètre	Valeur
Etat Physique	Solide blanc, cristallisé
Formule chimique	$C_{15}H_{16}O_2$
N° CAS	80-05-7
Masse molaire	228,28 g/mol
Nomenclature IUPAC	2,2-bis(4-hydroxyphényl) propane
Nom CAS	Nom CAS Phénol, 4,4'-(1-méthyléthylidène) bis
Synonymes	Synonymes Isopropylidène bis(4-hydroxybenzène)
Solubilité	Dans l'eau WS= 120- 300 mg/L à 25 °C à pH = 7 Soluble dans l'acide acétique Soluble dans une solution alcaline alcool, acétone
Point de fusion	150 -158 °C
Point d'ébullition	360 °C sous 101,3 kPa 250 - 252 °C sous 1,7 kPa
Pression de vapeur	$5,3 \cdot 10^{-9}$ kPa à 25 °C 0,009 kPa à 190 °C
Densité	1,1 à 25 °C
Température d'auto inflammation	510 à 570 °C
Coefficient de partage n-octanol / eau (log kow)	3,4
Constante d'acidité/basicité (pKa)	9,59, 10,2
Demi-vie dans l'air	4-5 h
Demi-vie dans l'eau	2,5 – 4 jours
Demi-vie dans les sédiments	300 jours

2.3 Mode d'action du BPA

Les modes d'action du bisphénol A (**Figure 5**) incluent à la fois des mécanismes génomiques et non génomiques, influençant divers récepteurs comme ceux des œstrogènes, des androgènes et des hormones thyroïdiennes (Lizcano, 2022). Le BPA peut se lier aux récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR), affectant plusieurs fonctions cellulaires essentielles (Ahmed *et al.*, 2020). Il a également été observé que le BPA induit des réponses non génomiques via des récepteurs nucléaires, modulant ainsi des voies de signalisation rapides qui affectent la fonction hormonale (Delfosse *et al.*, 2019). Ces interactions permettent au BPA de perturber divers processus physiologiques par l'intermédiaire de ces récepteurs hormonaux (Yang *et al.*, 2023).

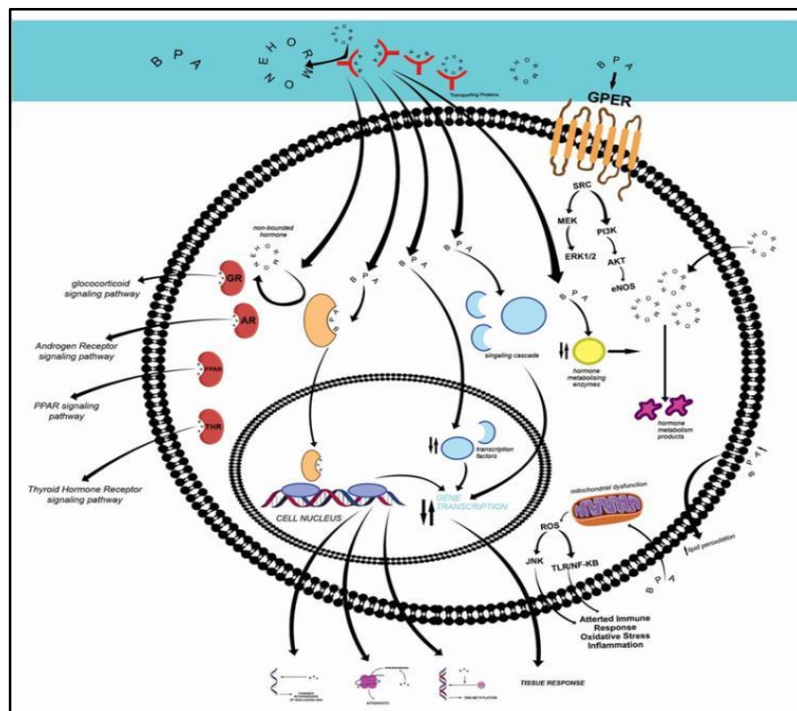


Figure 5. Divers modes d'action du BPA (Faheem et Bhandari, 2020).

Ceci est pertinent car l'exposition au BPA peut être chronique, ce qui lui rend l'équivalence fonctionnel d'un composé persistant. Les mécanismes qui sous-tendent la toxicité du BPA peuvent être liés à ses propriétés chimiques dans l'organisme, y compris les interactions avec les récepteurs hormonaux dans les cellules cibles (Santoro *et al.*, 2019).

2.4 Activité oestrogénique du BPA

Le bisphénol A est un perturbateur endocrinien avec une activité oestrogénique, cette activité découverte accidentellement par le groupe de Krishnan (Krishnan *et al.*, 1993). Il est prouvé qu'il provoque une réponse dans l'expression des gènes en se liant aux récepteurs nucléaires des œstrogènes ER α et ER β (Routledge *et al.*, 2000 ; Beronius *et al.*, 2010) avec une affinité plus faible que celle de l'œstradiol (Krishnan *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 2019). Le BPA agit comme un SERM (*Selective Estrogen-Receptor Modulator*), et interagit différemment avec les récepteurs des œstrogènes dans les domaines de liaison au ligand, affectant la régulation de ces récepteurs (Jiang *et al.*, 2020). La structure moléculaire du BPA, avec ses groupes aromatiques hydroxyles et son squelette hydrophobe, permet de se lier aux récepteurs œstrogéniques, agissant ainsi comme un substitut de l'œstradiol (Li *et al.*, 2017) par rapport à l'œstradiol il :

- Interagit différemment à l'intérieur du domaine de liaison au ligand des Ers.
- Présente une affinité de liaison différente et une régulation différente au ER α et ER β dans les cellules cible.

La structure moléculaire du BPA ressemble à celle de l'hormone naturelle 17 β -œstradiol avec la présence du groupement aromatique hydroxyle (cycle phénolique) et d'un squelette hydrophobe compatible avec la poche de liaison hydrophobe des Ers, pour pouvoir se fixer sur les récepteurs des œstrogènes (**Figure 6**). Outre les récepteurs nucléaires des œstrogènes, le BPA interagit également avec d'autres récepteurs, tels que le récepteur GPR30 (GPER) et le récepteur orphelin ERR γ , qui sont impliqués dans des voies de signalisation non génomiques. Ces interactions contribuent aux effets physiopathologiques observés chez les individus exposés au BPA (Liu *et al.*, 2021). Ces mécanismes d'action sont renforcés par l'affinité du BPA pour les récepteurs membranaires comme GPR30, qui joue un rôle crucial dans les effets non génomiques du BPA (Zhao *et al.*, 2019).

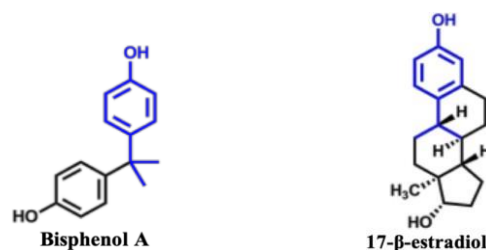


Figure 6. Structures du BPA comparée à celle du 17 β -œstradiol

La structure chimique du BPA similaire à celle des hormones œstrogéniques naturelles, lui permet de se lier au récepteur α des œstrogènes. Bien que son activité œstrogénique soit environ 1000 fois inférieure à celle de l'œstradiol, il reste largement répandu dans notre environnement, avec environ trois millions de tonnes produites chaque année à l'échelle mondiale. Cette vaste présence du BPA dans l'environnement et dans les corps humains soulève des préoccupations concernant son rôle potentiel en tant que perturbateur endocrinien, affectant les systèmes hormonaux (Wan *et al.*, 2022; Kulsange *et al.*, 2024). Le BPA possède une activité œstrogénique induisant la prolifération en se liant aux récepteurs nucléaires ER mais également aux récepteurs membranaires aux œstrogènes mER (membrane-bound ER) et GPR30 avec une affinité plus importante pour les récepteurs membranaires (**Figure 7**) (Vandenberg *et al.*, 2009; Rezg *et al.*, 2014). Le bisphénol A (BPA) présente une structure similaire à celle des hormones thyroïdiennes endogènes, notamment la T3 et la T4, ce qui lui permet de se lier aux récepteurs des hormones thyroïdiennes (THR). Par conséquent, le BPA peut interférer avec la signalisation hormonale thyroïdienne en agissant comme un agoniste ou un antagoniste, influençant ainsi les réponses physiologiques (Kwon *et al.*, 2016; Squires, 2024). Ce composé modifie l'activité des récepteurs de la parathormone (PTH), avec des effets antagonistes ou agonistes selon les conditions d'exposition (Morales-Grahl *et al.*, 2024).

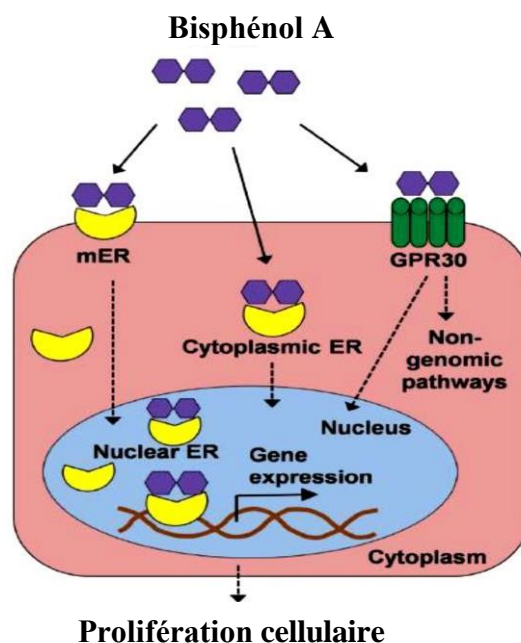


Figure 7. Activité œstrogénique du BPA via les différents récepteurs cellulaires (Wang *et al.*, 2017).

2.5 Source environnementale du Bisphénol A

Les sources du BPA dans l'environnement sont décrites à la **figure 8**. Les principales sources de contamination environnementale par le bisphénol A (BPA) résultent de son utilisation industrielle massive. La production et la transformation du BPA pour la fabrication de plastiques polycarbonates et de résines époxydes représentent les principales sources de rejet de cette substance. Ces rejets industriels pénètrent directement dans les sols, les cours d'eau et l'air, contribuant ainsi à une pollution généralisée et persistante (Qin *et al.*, 2024).

Par ailleurs, les déchets plastiques et les lixiviats des décharges jouent un rôle central dans la contamination environnementale par le BPA. La dégradation progressive des produits contenant du BPA, tels que les bouteilles en polycarbonate, les emballages alimentaires et les revêtements intérieurs des canettes, libère cette substance dans les eaux de surface et les nappes phréatiques. Ces micropolluants sont particulièrement préoccupants car ils persistent dans l'environnement et s'accumulent dans les écosystèmes aquatiques (Cesen *et al.*, 2018). Une autre source majeure de pollution au BPA provient des stations d'épuration des eaux usées (STEP). Bien que ces infrastructures réduisent partiellement la concentration en BPA dans les effluents, elles ne parviennent pas à l'éliminer complètement. Ainsi, le rejet des eaux traitées dans les milieux aquatiques reste une voie de contamination significative, exposant la faune et la flore à des concentrations de BPA pouvant perturber leurs systèmes endocriniens (Vasiljevic *et Harner*, 2021). En effet, les reçus thermiques, les jouets, les équipements médicaux et certains textiles traités avec du BPA libèrent progressivement ce composé dans l'air et l'eau, favorisant ainsi son accumulation dans l'environnement (Dueñas-Moreno *et al.*, 2022). Cette exposition chronique est particulièrement préoccupante, qui peut affecter à la fois les organismes aquatiques et terrestres.

Les émissions atmosphériques constituent une autre voie de dispersion du BPA. Cette contamination aérienne favorise le transport du BPA sur de longues distances et son dépôt dans divers milieux naturels (Harner, 2021).

À ce jour, la production mondiale de BPA connaît une croissance constante. En 2016, elle était estimée à environ 7,7 millions de tonnes, et les prévisions indiquent qu'elle pourrait atteindre plus de 22 millions de tonnes en 2025, avec un taux de croissance annuel de 4,8 %, porté par la demande croissante en plastiques techniques et en résines industrielles (Im *et Löffler*, 2016 ; Walker *et al.*, 2021).

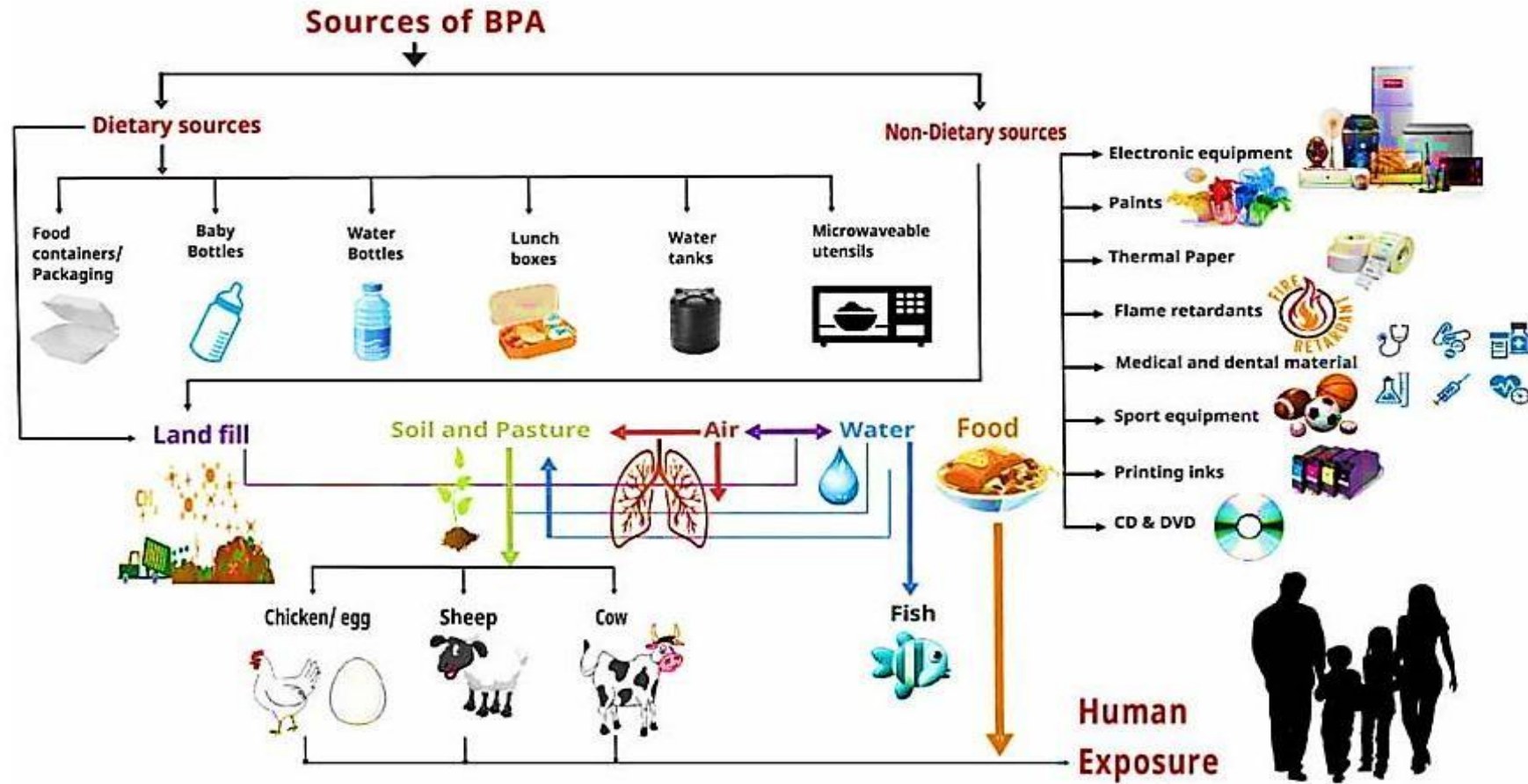


Figure 8. Les sources potentielles de contact des organismes vivants avec le bisphénol A, contaminant ainsi les différentes matrices environnementales (eau, air et sol) ; (Manzoor *et al.*, 2022).

2.6 Processus d'exposition au Bisphénol A

Le bisphénol A peut pénétrer dans l'organisme humain par différentes voies d'exposition, notamment par voie orale, cutanée ou par inhalation (Manzoor *et al.*, 2022). Ces différentes formes d'exposition sont préoccupantes en raison des effets perturbateurs endocriniens du BPA, affectant potentiellement la santé humaine à travers ces multiples routes d'absorption (Kannan *et al.*, 2016).

2.6.1 Voie orale

Une étude américaine de Wilson en 2007 a montré que la voie orale était responsable de 99% de l'absorption totale de bisphénol A (Wilson *et al.*, 2007). L'exposition majeure au BPA est par voie digestive, le passage du bisphénol A dans la chaîne alimentaire s'effectue par la libération de monomères suite à une polymérisation incomplète, ou par hydrolyse de la chaîne ester qui lie les monomères de BPA (Vandenberg *et al.*, 2007). La contamination par le biais de l'alimentation se fait par :

- **Migration du BPA depuis les emballages alimentaires :** la migration vers le contenu alimentaire s'effectue en particulier au moment du conditionnement ou après le chauffage (Cao *et al.*, 2012). La synthèse rapportée par Welshons et Nagel, portant sur la contamination des aliments par le BPA, a montré que les niveaux du bisphénol A les plus élevés étaient détectés dans les aliments conditionnés en boîte de conserve métallique (Welshons et Nagel, 2006). Les facteurs principaux influençant la migration de BPA monomère depuis les revêtements intérieurs des conserves sont :
 - Les environnements acides et basiques peuvent intensifier le taux de migration du BPA des emballages alimentaires vers les aliments, ce qui constitue une menace prononcée pour la santé publique (Geens *et al.*, 2011).
 - L'augmentation de la température conduit également à un taux de migration rapide des résidus. La pénétration du BPA dans les produits emballés est 55 fois plus élevée qu'à une température plus basse (Le Corre *et al.*, 2012).
 - Il existe une relation directe entre la racine carrée du temps de contact et la concentration de des molécules qui migrent. De même, l'utilisation prolongée des bouteilles en plastique renforcent l'hydrolyse du polymère et provoquent une migration plus importante du BPA dans l'eau (Flint *et al.*, 2012 ; Neufeld *et al.*, 2015).

- La présence de sel ou d'huile peut entraîner une dépolymérisation et libère le monomère de BPA. Les matières grasses présentes dans les aliments contribuent également à la migration des particules de BPA (Flint *et al.*, 2012 ; Neufeld *et al.*, 2015).

Une étude a montré que les niveaux de bisphénol A (BPA) dans 55 échantillons alimentaires variaient de 0,19 à 105,0 ng/g. Cette étude a également révélé que les aliments en conserve contiennent des concentrations de BPA significativement plus élevées que d'autres types d'échantillons alimentaires (Cao *et al.*, 2021). La législation de l'Union européenne fixe une limite de migration spécifique de 3 mg de BPA par kilogramme de nourriture (Règlement (CE) n° 10/2011 de l'UE). Ce règlement vise à limiter l'exposition alimentaire au BPA et à protéger la santé publique contre ses effets potentiellement nocifs (EFSA, 2023).

- **Ingestion de BPA :** La contamination alimentaire se produit également par l'ingestion des légumes, des boissons, des viandes, des poissons, des produits laitiers et des laits en poudre maternels en conserves ou contenus dans des emballages plastiques à base de BPA. Elle s'effectue aussi par la consommation de fruits de mer ou même de poissons d'eau douce pollués par le BPA, des produits alimentaires frais provenant des régions polluées, ainsi que la consommation d'eau polluée (Geens *et al.*, 2012). Notamment une autre source d'exposition identifiée orale est la résine d'obturation dentaire. Depuis quelques années, l'utilisation des résines à base de BPA a augmenté dans la pratique dentaire. Le BPA est retrouvé dans les composites dentaires, plus précisément dans la matrice organique mais également dans les scellements des sillons (ce sont des résines utilisées comme traitement prophylactique des caries), sous différentes formes : BPA diglycidylester methacrylate (Bis-GMA), BPA ethoxylate dimethacrylate (Bis-EMA), BPA dimethacrylate (Bis-DMA). Sur le long terme les variations de température, la mastication et le contact de la salive entraînent une dégradation des composites. Les estérases présentes dans la salive peuvent couper les bis-DMA et entraînent la libération directe de BPA. Les cholestérol-estérases sont aussi capable d'hydrolyser les molécules bis-GMA (Olea *et al.*, 1996, Pulgar *et al.*, 2000).

2.6.2 Voie cutanée

La deuxième voie d'absorption du bisphénol A (BPA) est l'exposition cutanée. Le contact direct avec des objets tels que le papier thermique, les jouets et les dispositifs médicaux augmente considérablement le potentiel d'absorption du BPA par la peau. Une étude menée en

2021 a examiné la diffusion de cette molécule à travers des modèles de peau viables, y compris des explants humains, et a montré que le BPA est absorbé et métabolisé en BPA mono-conjugué (Manzoor *et al.*, 2022). De récents travaux de recherche ont également mis en évidence une exposition cutanée au BPA mais qui reste faible comme source de contamination (Biedermann *et al.*, 2010 ; Zalko *et al.*, 2011). Cette voie d'exposition pourrait concerner des milieux professionnels, en particulier chez les ouvriers de l'industrie du plastique et aussi chez les caissières. La quantité moyenne du BPA présente dans les billets de caisse est estimée à environ 13.3 g/kg de papier (Liao *et Kannan*, 2011). Néanmoins, la possibilité d'une exposition par un transfert percutané ne dépasserait pas les 3 % de la DJA (Biedermann *et al.*, 2010), participant très minoritairement à l'exposition totale au BPA de la population générale (Marquet *et al.*, 2011; Kaddar *et al.*, 2008).

2.6.3 Voie inhalatrice

L'inhalation est la troisième voie d'exposition, dans l'étude de Wilson précédemment citée, l'inhalation est une voie d'exposition peu contributive à l'exposition totale, responsable de l'absorption de 0,24-0,41 ng/kg/jour de bisphénol A (Wilson *et al.*, 2007). Divers enquêtes de recherches ont indiqué qu'il pouvait y avoir un risque de contamination inhalatrice par exposition à des vapeurs, brouillards, poussières polluées en suspension dans l'air et gaz contenant du BPA (Geens *et al.*, 2012). L'usage du bisphénol A dans les processus de fabrications de certains revêtements de sol, certaines peintures, matériel électrique ou électronique conduit à la contamination de l'air ambiant par des particules de BPA. Bien que l'exposition par inhalation soit relativement faible par rapport à la dose journalière admissible (DJA), cette voie d'exposition demeure un facteur de risque, notamment pour les populations professionnelles exposées (Geens *et al.*, 2022).

2.7 Effets écologiques nocifs sur les milieux aquatiques

Les substances chimiques perturbatrices du système endocrinien telles que le bisphénol A, ont récemment attiré l'attention des chercheurs en raison de leur impact environnemental croissant. Ces composés interfèrent avec les systèmes hormonaux des organismes, entraînant des effets négatifs sur la santé des espèces aquatiques, notamment en perturbant leur croissance, leur développement et leur reproduction (Wee *et al.*, 2024; Saha *et al.*, 2022). Le BPA est l'un des perturbateur endocrinien les plus préoccupants dans les écosystèmes aquatiques, où il

représente une menace pour la santé de la vie aquatique (Guo *et al.*, 2023; Jankiewicz *et al.*, 2022). Il se déverse dans l'environnement aquatique non seulement à travers l'utilisation quotidienne de produits contenant du BPA, mais aussi par les décharges et les stations d'épuration des eaux usées, qui agissent comme des sources importantes de pollution (Roslan *et al.*, 2023; Xue *et al.*, 2024). Les puits agronomiques et industriels peuvent également entraîner le rejet de BPA dans les eaux souterraines. La **figure 9** représente les voies possibles de contamination au BPA des eaux souterraines et de surface. Les stations de traitement des eaux usées et les lixiviats des sites d'enfouissement représentent des sources importantes de pollution par le BPA dans l'environnement (Gong *et al.*, 2023; Ighalo *et al.*, 2024). Les stations d'épuration, en particulier, sont considérées comme des voies secondaires majeures de contamination par le BPA en raison de l'efficacité limitée des méthodes de traitement physiques et biologiques pour éliminer cette substance (Abu Hasan *et al.*, 2023; Kurniawan *et al.*, 2024).

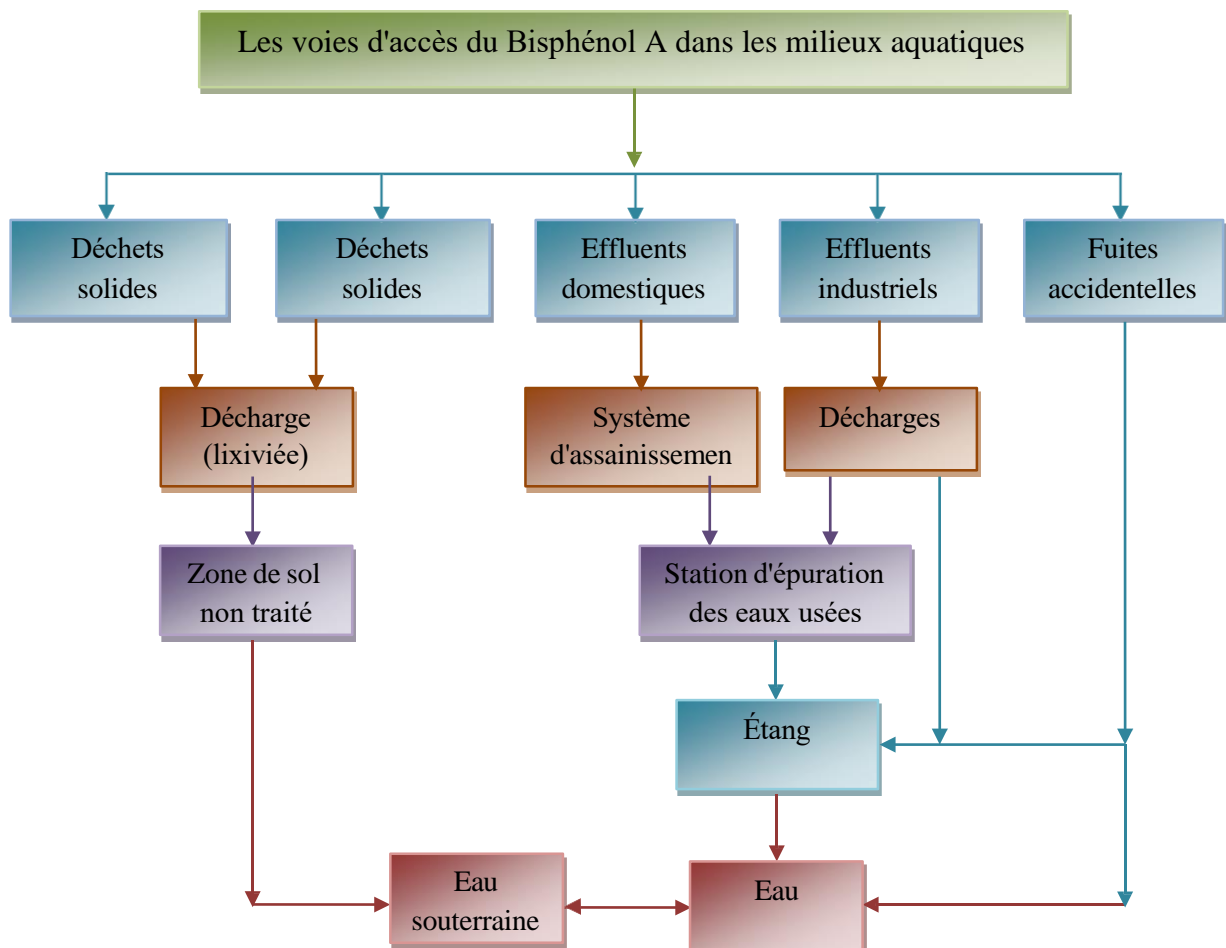


Figure 9. Représentation des différentes voies de contamination des milieux aquatiques par le bisphénol A (Bilal *et al.*, 2019).

2.8 Toxicité du Bisphénol A

La toxicité intrinsèque d'une substance définit son degré de dangerosité. Les études expérimentales à l'aide des organismes sentinelle de la chaîne trophique visant à définir les seuils suivants :

- **Le LOAEL** (lowest observed adverse effect level) dose minimale entraînant un effet nocif observé.
- **Le NOEL** (no observed effect level) dose reconnue comme la plus faible sans effet.

Il existe deux types de toxicité, qui diffèrent par la rapidité d'apparition, la sévérité et la durée des symptômes, ainsi que la vitesse d'absorption de la substance toxique. Des études in vivo et in vitro ont suggéré que le BPA induit divers effets indésirables sur la santé, notamment des perturbations hormonales, des effets neurotoxiques, et des troubles métaboliques (Soares et al., 2023), ce dernier entraîne :

2.8.1 Toxicité aiguë (court terme)

« La toxicité aiguë ou à court terme concerne l'ensemble des signes pathologiques qui suivent une exposition généralement unique et à forte dose. Les intoxications aiguës donnent généralement lieu à des effets brefs et réversibles, mais dans certains cas, elles peuvent conduire à la mort. Pour déterminer la toxicité d'une substance, on détermine dans un premier temps sa *DL50* » (Marques, 2014). La toxicité aiguë fait référence aux effets nocifs résultant d'une exposition à court terme. Les polluants, y compris le bisphénol A, peuvent devenir toxiques à des concentrations aussi faibles que de l'ordre du microgramme par litre. Une étude récente a démontré que ces substances peuvent provoquer des effets indésirables significatifs, même à des doses faibles, ce qui souligne leur potentiel de danger pour les organismes aquatiques et d'autres formes de vie (Hua et al., 2023). La toxicité aiguë du BPA dans les milieux aquatiques est généralement observée à des concentrations comprises entre 1000 et 10 000 µg/L. Le BPA a des effets œstrogéniques même à des concentrations bien plus faibles, inférieures à 1 µg/m³ (Gomes et al., 2023; Vaksmaa et al., 2023). Selon les normes des Nations Unies, la durée des tests de toxicité aiguë dans l'eau varie entre 48 et 96 heures en fonction de l'espèce aquatique testée (Nations Unies, 2023).

2.8.2 Toxicités chroniques (long terme)

Les effets de toxicité chronique du bisphénol A se manifestent après une exposition prolongée à de faibles concentrations, sans signes immédiats. Le BPA présente des effets toxiques cumulatifs, apparaissant après une période de latence. Ces effets peuvent causer un dysfonctionnement plus important de l'organisme à long terme (Yuan *et al.*, 2024). La toxicité chronique du BPA a été confirmée par plusieurs études récentes, et des effets ont été observés à des concentrations allant de 10 à 100 fois inférieures aux concentrations létales (CL50) pour diverses espèces aquatiques (Minaz *et al.*, 2024). En raison de sa persistance dans les écosystèmes aquatiques, le BPA provoque des altérations comportementales et biologiques chez la faune aquatique (Zhang *et al.*, 2023).

2.8.3 Neurotoxicité

La neurotoxicité du bisphénol A (BPA), notamment son impact sur le développement et le fonctionnement neuronal. Plusieurs études se sont intéressées au rôle du co-transporteur potassium-chlore KCC2 et des récepteurs glutamatergiques N-méthyl-D-aspartate (NMDA) dans ce processus. Ainsi, dans des cultures de neurones corticaux, il a été démontré que le BPA réduit l'expression du gène *Kcc2*, une étape clé pour la maturation neuronale et la formation des synapses. Ce transporteur étant plus exprimé chez les femelles, les effets du BPA semblent plus marqués chez elles, ce qui souligne une possible sensibilité neurotoxique différenciée selon le sexe (Naffaa, 2022).

Le BPA pourrait induire une toxicité dans le système nerveux et altère notamment le comportement des animaux. Dans des expériences apparentées, les effets de l'exposition embryonnaire à de faibles concentrations de BPS se sont avérés persistaient à l'âge adulte, affectant la fonctionnalité neuronale, telle qu'évaluée par l'habituation aux stimuli mécano-sensoriels chez *C. elegans* (Mersha *et al.*, 2015). Chez le poisson zèbre, le BPS pourrait induire une neurogenèse hypothalamique précoce (augmentation de 240 %) (Kinch *et al.*, 2015). Récemment, nous avons montré que l'exposition à de faibles niveaux de BPS (100 µg/L) pendant le stade précoce du développement (25 hpf dans les embryons de poisson zèbre) pouvait augmenter la quantité de neurones à hormone de libération de la gonadotrophine-3 dans l'hypothalamus et augmenter l'expression des gènes liés à la neuroendocrine tels que *kiss1*, *gnrh3* et le récepteur alpha des œstrogènes (*er-α*) (Qiu *et al.*, 2016).

Par ailleurs, des recherches récentes ont révélé des perturbations des niveaux de neurotransmetteurs, notamment une modification de la dopamine (DA) et de la sérotonine (5-HT) dans le cortex préfrontal de jeunes rates exposées au bisphénol S (BPS). Ces altérations influencent également l'activité de la 5 α -réductase (5 α -R), une enzyme clé de la neurostéroïdogénèse, suggérant un lien possible entre l'exposition aux bisphénols et l'émergence de troubles neuropsychiatriques (Naffaa, 2022).

2.8.4 Reprotoxicité

Chez les vertébrés aquatiques, le système endocrinien comprend plusieurs axes fonctionnels, dont les plus importants sont l'axe gonadotrope et l'axe thyroïdienne. L'axe gonadotrope, également connu sous le nom d'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG), joue un rôle central dans la régulation de la reproduction et de la différenciation sexuelle. Ce processus débute dans l'hypothalamus, où est sécrétée la gonadolibérine (GnRH). Cette hormone stimule la libération, au niveau de l'hypophyse, de deux gonadotropines : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), qui contrôlent la production des hormones stéroïdiennes gonadiques. Celles-ci comprennent les androgènes, tels que la testostérone et la dihydrotestostérone, ainsi que les œstrogènes, dont le 17 β -œstradiol (E2), et la progestérone. Chez les femelles, l'œstradiol (E2) favorise la maturation des ovocytes et stimule la production de vitellogénine par le foie, tandis que chez les mâles, la testostérone est essentielle à la spermatogénèse et à la spermiation. La régulation de cet axe repose sur un mécanisme de rétrocontrôle des hormones stéroïdiennes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, permettant d'ajuster la production hormonale en fonction des besoins physiologiques et des phases du cycle reproductif. La température de l'eau, mais également par l'exposition à des perturbateurs endocriniens. Ces substances peuvent altérer l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des gonadotropines et des récepteurs hormonaux, perturbant ainsi la régulation de la reproduction chez les poissons (Nihoul, 2019).

Des études récentes ont mis en évidence les effets néfastes du BPA sur la reproduction. Chez les mâles, il altère la spermatogénèse, réduit la qualité des spermatozoïdes et impacte leur motilité, ce qui entraîne une diminution de la fertilité. Ces effets ont été observés dans plusieurs études, suggérant que l'exposition au BPA peut provoquer des anomalies héréditaires affectant la descendance (Tahri, 2022). Chez les femelles, le BPA perturbe la maturation folliculaire et la qualité des ovocytes, ce qui peut réduire les taux de fécondation et augmenter les risques de

complications embryonnaires. Il affecte également la réserve ovarienne, compromettant ainsi la capacité reproductive à long terme (Le Gac, 2022). Le bisphénol A interfère avec l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, entraînant une perturbation des signaux hormonaux nécessaires au bon fonctionnement du système reproducteur. Chez les mâles, cette perturbation se traduit par une diminution de la production de testostérone et une altération des cellules de Sertoli, essentielles au soutien de la spermatogenèse (Ghazi, 2023). Chez les femelles, les œstrogènes sont impactés, ce qui influence le développement des follicules ovariens et le cycle menstruel (Moreau et Gayraud, 2022).

En outre, le BPA altère la fonction reproductive de la progéniture en raison de sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique ayant un effet direct sur les organes reproducteurs (Morck *et al.*, 2010). En particulier, le stress oxydatif induit par plusieurs EDC, dont le BPA, produisent l'infertilité masculine, l'ampleur de cet effet toxique du BPA dépendait du temps d'exposition, atteignant un effet maximal pendant l'exposition périnatale (Bisht *et al.*, 2017 ; El Henafy *et al.*, 2020). Dans le testicule, l'altération persistante de l'équilibre redox conduit à une surproduction de ROS et à l'affaiblissement de la défense antioxydante, ce qui entraîne un stress oxydatif accru qui est la principale cause de dysfonctionnement des spermatozoïdes et de l'infertilité masculine (Bisht *et al.*, 2017) . Il est important de préciser que les études cliniques ont clairement défini la toxicité du BPA sur la reproduction et le stress oxydatif. Toutefois, compte tenu de l'importance de l'équilibre oxydatif dans la physiologie des spermatozoïdes, le stress oxydatif pourrait être le principal mécanisme néfaste qui sous-tend la toxicité du BPA sur le système reproducteur masculin (Chang *et al.*, 2019). Le mécanisme d'action du BPA sur le système reproducteur s'entrevoyait sur plusieurs effets :

- **Effet œstrogénique in vitro** : Le bisphénol A (BPA) exerce un effet œstrogénique in vitro en modulant l'expression de gènes liés aux voies hormonales. Il interagit avec les récepteurs nucléaires des œstrogènes ER α et ER β , bien que son affinité pour ces récepteurs soit plus faible que celle de l'estradiol, le ligand physiologique naturel. Cette capacité du BPA à mimer l'action des œstrogènes a été largement étudiée, notamment en comparaison avec d'autres analogues structuraux, ce qui souligne son rôle potentiel en tant que perturbateur endocrinien (Delfosse *et al.*, 2013).
- **Effet anti-androgénique in vitro** : Le BPA a également une action anti-androgénique puissante, il affecte in vitro plusieurs étapes de l'activation et du fonctionnement du récepteur aux androgènes, dont l'inhibition de la liaison androgène-récepteur et

l'inhibition de l'activation de la transcription par ce récepteur. Ceci qui porte à croire qu'*in vivo* le BPA peut altérer l'expression des gènes, le développement et la fonction des tissus cibles (Lee *et al.*, 2003). Cet effet anti-androgénique du BPA semble être pertinent, mais à des doses plus élevées que les mécanismes œstrogéniques de réponse (vom Saal *et al.*, 2007).

- **Effets néfastes *in vivo*** : Les effets du BPA sur la fonction de reproduction ont largement été démontrés dans plus de 100 études, qui ont montré que l'exposition au BPA à de petites doses (de l'ordre du μg et du ng/kg) causait des anomalies permanentes des organes reproducteurs et autres désordres biologiques de leur progéniture, mâle et femelle (vom Saal et Hughes, 2005) :
 - Anomalies des organes génitaux et anomalies de production des spermatozoïdes chez les mâles et des ovocytes chez les femelles, avec des altérations de la lignée germinale
 - Perturbations de la production d'hormones (altération de la stéroïdo-génèse)
 - Modifications d'expression génétique.

2.8.5 Effet cocktail

Certains perturbateurs endocriniens ayant les mêmes mécanismes d'action ou agissant au niveau des mêmes récepteurs du système endocrinien, il est difficile de prédire les effets de l'exposition au cocktail de ces substances. En plus des effets liés à l'interaction entre les substances en mélange, une substance peut avoir plusieurs effets (Dewalque, 2015 ; Marques, 2014). Selon Sumpter et Johnson (2005), la perturbation du système endocrinien est généralement liée à une exposition à différentes substances à faibles concentrations. Un mélange de perturbateurs endocriniens peut entraîner une réponse œstrogénique, même à des concentrations inférieures aux niveaux qui entraînent des effets observés (Brian *et al.*, 2005 ; Rajapakse *et al.*, 2002).

En plus des effets individuels de chaque substance, des interactions complexes peuvent avoir lieu, notamment des effets synergiques ou additifs qui amplifient l'impact global sur l'organisme. Certaines études ont montré que l'exposition combinée à de faibles doses de perturbateurs endocriniens pouvait induire une réponse œstrogénique plus marquée que celle observée avec chaque composé pris isolément. Ces effets sont particulièrement préoccupants, car les concentrations impliquées peuvent être inférieures aux seuils généralement considérés comme ayant des effets biologiques significatifs (Delfosse *et al.*, 2016). Plusieurs études *in vitro*

et in vivo ont permis de constater des effets additifs et des synergies lors de l'exposition à des mélanges de perturbateurs endocriniens, même à des doses sans effets lorsqu'ils sont administrés séparément (Dewalque, 2015).

Il convient de souligner que la réalité des expositions aux mélanges de divers perturbateurs endocriniens est généralement extrêmement complexe (Darbre et Harvey, 2014). Dans une étude de 2012, Kim et ses collègues ont examiné l'impact combiné du bisphénol A (BPA) et de l'i-BuP sur les cellules cancéreuses de la glande pituitaire chez le rat. Ils ont trouvé que ces deux perturbateurs endocriniens, lorsqu'ils sont présents ensemble, renforcent le potentiel œstrogénique, ce qui perturbe les fonctions hormonales. Bien que les recherches sur les effets des mélanges de perturbateurs endocriniens soient encore limitées, elles progressent pour mieux comprendre les effets d'expositions plus complexes, proches des réalités environnementales (Dewalque, 2015 ; Trabelsi, 2016).

2.9 Dégradation du BPA dans les milieux aquatiques

La biodégradation du bisphénol A (BPA) est essentielle pour son élimination ou sa détoxification dans l'environnement aquatique, et elle est principalement réalisée par des bactéries présentes dans ces milieux. Des études récentes ont montré que la demi-vie de biodégradation du BPA est inférieure à 5 jours, avec un taux de dégradation variable selon les espèces bactériennes présentes. Certaines souches de *Pseudomonas* et *Streptomyces* ont démontré des capacités exceptionnelles à dégrader le BPA, atteignant des taux de dégradation supérieurs à 90% en seulement 10 jours (Kang et Kondo, 2020). La température et la taille des populations bactériennes sont des facteurs influençant la vitesse de dégradation du BPA. En particulier, un plus grand nombre de bactéries favorise une dégradation rapide et complète du BPA dans les milieux aqueux (Mouna et Roumissa, 2023). En outre, la dégradation du BPA varie considérablement selon les conditions aérobies et anaérobies, le BPA étant plus rapidement dégradé dans des milieux anaérobies (Kang et Kondo, 2022). Les planctons ont également le potentiel d'éliminer divers polluants, tels que les métaux lourds et les polluants organiques (Nagase et al., 1997; Muñoz et al., 2006). Ils existent également des levures permettant de dégrader le BPA tels que *Lactococcus Lactis*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis* et *Saccharomyces cerevisiae*, cette dégradation variant de 39.1 à 51.9% (Xing et al., 2022).

Une autre manière de dégradation du bisphénol A est effectués par les plantes, qui sont capables d'absorber rapidement le BPA à partir de l'eau et de le métaboliser en plusieurs composés glycosidiques. La glycosylation du BPA est considérée comme la voie principale de sa métabolisation par les plantes. Des enzymes telles que la peroxydase et le polyphénol oxydase sont impliquées dans cette transformation (Delfosse, 2023). De plus, la biodégradation du BPA est plus lente dans les milieux marins, ce qui entraîne une accumulation dans les organismes marins comparativement à ceux des eaux douces (Chausse, 2022). Grâce à leurs racines, ils jouent un rôle clé dans l'épuration de l'environnement en absorbant les polluants comme le BPA. Elles peuvent métaboliser ces composés par des mécanismes enzymatiques complexes, permettant ainsi une dégradation partielle de ce contaminant (Fedeila, 2019).

Les champignons lignivores sont efficaces dans les milieux aérobies pour transformer le bisphénol A (BPA) en composés moins toxiques. Ce processus est utilisé dans la bioremédiation, où les champignons purifient les environnements contaminés par des polluants organiques. Certaines souches de champignons sont même capables de minéraliser le BPA, le convertissant en formes non organiques, comme le dioxyde de carbone et l'eau, ce qui facilite son élimination complète de l'environnement (Liu et al., 2021).

Chapitre II

Toxicologie et Stress Oxydatif

CHAPITRE II : TOXICOLOGIE ET STRESS OXYDATIF

1. Notion toxicocinétique

1.1 Généralité en toxicologie

Ces dernières années, les études en écotoxicologie se sont développées afin de mettre en place le concept appelé « *biomonitoring* » ou *monitoring* de l'environnement ou encore biosurveillance destiné principalement à évaluer la nature et l'importance des effets écotoxicologiques des polluants dans l'environnement. Cet outil constitue l'autre facette incontournable de la surveillance de la pollution environnementale, tout aussi essentielle que le *monitoring* chimique (Ramade, 2007; Al Kaddissi, 2012; Zaidi et al., 2022). C'est à la fin de l'Antiquité et au début de la Renaissance (au début du xvi^e siècle) que Paracelse (1493-1541), un médecin suisse, reprend et synthétise des concepts formulés par des penseurs comme Hippocrate et écrit : « *Toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison ; seule la dose détermine ce qui n'est pas un poison* » (Borzelleca et Paracelsus, 2000). Aujourd'hui, cette phrase se formule plus simplement sous la forme « *La dose fait le poison* », indiquant que toute molécule peut être considérée comme toxique, dès lors qu'un certain seuil de concentration dans l'organisme exposé, est dépassé. La notion de toxicologie doit toutefois être relativisée par le type d'organisme considéré. Cette différence de sensibilité s'explique par plusieurs paramètres : les composés toxiques sont en effet détectés puis éventuellement éliminés de l'organisme après métabolisation par le biais de systèmes impliquant des récepteurs, enzymes et transporteurs. Certains organismes sont moins sensibles que d'autres car ils possèdent des systèmes de détoxification plus sophistiqués ou adaptés à leur environnement (Coumoul, 2015).

1.2 Modulation des effets toxiques

La toxicité d'une substance peut varier en fonction de facteurs :

- ✓ Concernant la nature de la substance : voie d'introduction, rapidité d'administration,
- ✓ Concentration, solubilité et ionisation, volatilité (qui conditionne la pénétration par voie respiratoire), les biotransformations subies par la substance à l'intérieur de l'organisme
- ✓ Concernant l'organisme dans lequel la substance est introduite : espèce, ethnies, variations individuelles, âge, sexe, gestation, facteurs physiologiques,
- ✓ Environnementaux : milieu aquatique ou terrestre, température, altitude, ensoleillement.

La toxicité varie également en fonction :

- Des interactions entre plusieurs substances : synergie additive, synergie renforçatrice ou potentialisation, antagonisme, induction ou inhibition enzymatique.
- D'une accumulation dans l'organisme : toxiques cumulatifs de facteurs chimiques et biologiques (Viala et Botta, 2005).

1.3 Évaluation de la toxicité

L'évaluation de la toxicité vise à analyser scientifiquement les effets d'une substance sur la santé humaine ou sur une population après une exposition à un toxique. Cette démarche permet de déterminer la nature de la toxicité, d'identifier les effets nocifs potentiels et d'établir une dose journalière admissible ou un seuil de risque acceptable afin de limiter les impacts sur la santé publique (Cartier *et al.*, 2012).

1.3.1 Relation dose-effet

L'évaluation de la relation dose-effet consiste à déterminer la corrélation linéaire entre la quantité d'une substance ingérée ou exposée et l'apparition de ses effets négatifs sur la santé des individus. Ce processus permet d'établir un lien entre la dose spécifique d'un toxique et l'intensité de la réponse biologique (Cui, 2017). La **figure 10** présente une courbe dose-effet :

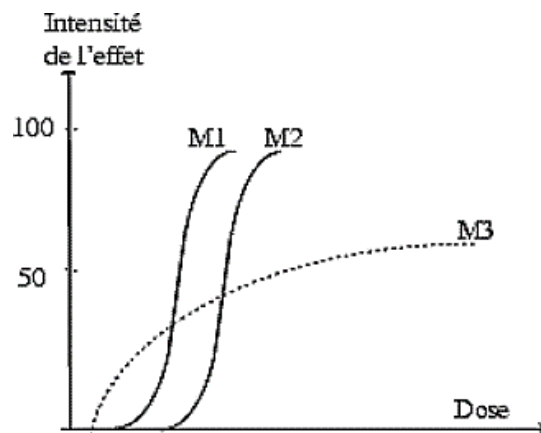


Figure 10. Exemple de courbes dose-effet

L'évaluation des effets toxiques repose sur l'identification du seuil au-dessus duquel un effet métabolique clairement défini apparaît. Dans une population homogène, l'impact sur la santé dépend de la quantité de substance ingérée ou exposée, et la réponse métabolique augmente

avec la dose administrée. En dessous de ce seuil, aucun effet n'est observé, mais une fois ce seuil atteint, un effet métabolique devient apparu (Grison, 2018).

1.3.2 Relation dose-réponse

La relation dose-réponse établit le lien entre la quantité d'une substance toxique à laquelle un organisme est exposé et la manifestation de ses effets biologiques. Cette relation est essentielle pour comprendre les impacts des substances chimiques sur la santé et permet d'identifier un seuil critique au-delà duquel la réponse devient significative. Dans une population hétérogène, la probabilité d'apparition d'un effet spécifique dépend de la dose administrée et de la sensibilité individuelle des organismes exposés. Ainsi, en dessous d'un certain seuil, aucun effet notable n'est observé, mais au-delà de cette dose critique, la réponse suit une progression approximativement linéaire (Gilbin *et al.*, 2009). Le **figure 11** représente des exemples de relations dose-réponse, monotones et non monotones.

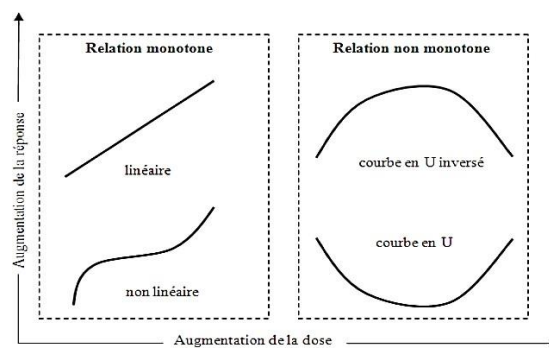


Figure 11. Exemple de courbes dose-réponse

L'étude de la relation dose-réponse permet d'identifier les groupes les plus vulnérables au sein d'une population exposée à une substance toxique. Des recherches récentes sur les bisphénols suggèrent un schéma en forme de U inversé, indiquant des effets significatifs même à faibles doses, remettant en question le paradigme classique selon lequel les faibles doses sont inoffensives (Boudalia *et al.*, 2012).

1.3.3 Relation dose-dépendant

Pour les substances toxiques à effets déterministes, la manifestation ainsi que la gravité des effets dépendent directement de la dose administrée. Ces composés présentent une relation dose-dépendant bien définie entre la dose et l'effet, ainsi qu'entre la dose et la réponse biologique observée. Dans la majorité des cas, il est possible d'identifier un seuil d'exposition en dessous duquel aucun effet significatif n'est détecté. L'intensité des manifestations toxiques s'accroît proportionnellement avec la dose absorbée (Saghir *et al.*, 2019).

2. Le stress oxydant

2.1 Définitions

Le stress oxydatif est un état dans lequel la production des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) dépasse la capacité du système de défense antioxydant à les neutraliser (Gur *et al.*, 2023). Le trouble de l'équilibre entre la production et le piégeage des radicaux libres, entraîne une augmentation des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote réactif (Lu *et al.*, 2019 ; Chiarello *et al.*, 2020 ; Hameister *et al.*, 2020), ce qui entraîne un processus pathologique de dommages cellulaires et tissulaires (Yu *et al.*, 2022), ces dommages sont impliqués dans le développement de nombreuses pathologies chroniques telles que le diabète, le cancer, les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Matschke *et al.*, 2019). Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité des radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydantes (enzymes, oligoéléments, vitamines) suffisantes pour les éliminer (Tu *et al.*, 2019). En outre, le stress oxydatif ainsi induit des lésions neuronales après accumulation de formes neurotoxiques de peptides A β (Devi *et Syad*, 2014) (Figure 12).

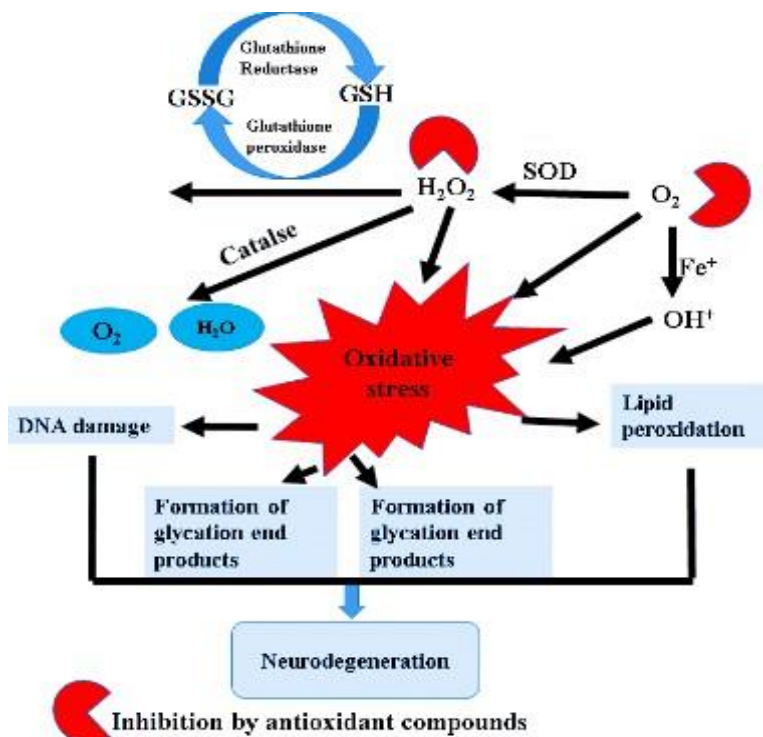


Figure 12. Rôle du stress oxydatif dans la neurodégénérescence (Alanazi *et al.*, 2022).

2.2 Espèces réactives de l'oxygène et radicaux libres

Les radicaux libres sont définis comme étant des molécules ou des espèces chimiques qui portent un électron non apparié (célibataire) sur leur orbite externe. Du fait de la présence d'un électron célibataire, les radicaux libres présentent une grande instabilité et très réactifs, ont une durée de vie courte et sont capables de réagir avec de nombreux composés (Peña-Bautista et al., 2019). Ils incluent des radicaux libres comme le radical hydroxyl (OH \cdot), le radical superoxyde (O $_2^{\cdot-}$) et sa forme protonnée (HO $_2^{\cdot}$), le radical peroxy (ROO \cdot) et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H $_2$ O $_2$) et l'oxygène singulet (1 O $_2$) sont des molécules hautement réactives produites dans les organismes vivant sous des conditions physiologiques et pathologiques (Patterson et al., 2019).

Plus de 90%, de l'oxygène consommé par les cellules est catalytiquement réduit par quatre électrons pour produire deux molécules d'eau. Cependant, l'O $_2$ peut être réduit par moins de quatre électrons, par certaines oxydases, donnant ainsi naissance à des espèces oxygénées partiellement réduites et hautement réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO sont des molécules réactives indispensables au métabolisme des êtres vivants. Elles sont produites à de faibles concentrations durant un métabolisme cellulaire normal, et jouent un rôle important dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires tels que l'autophagie et l'apoptose (Milkovic et al., 2019).

L'ensemble des radicaux libres et leur sous forme radicalaire et non radicalaire sont présentées dans le **tableau 2** :

Tableau 2. Principales ERO radicalaires et non-radicalaires (Dwassy, 2014).

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Radicalaire	Non-radicalaire
Radical superoxyde: O $_2^{\cdot-}$	Peroxyde d'hydrogène: H $_2$ O $_2$
Radical hydroxyle: OH \cdot	Ion hypochlorite: ClO $^-$
Peroxyde: RO $_2^{\cdot}$	Ozone: O $_3$
Hydropéroxyde: HO $_2^{\cdot}$	Péroxinitrite: ONOO $^-$
Alkoxyde: RO \cdot	Oxygène singulet : 1 O $_2$

2.3 Systèmes antioxydants

Les systèmes antioxydants jouent un rôle important dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène (Sanjay et Shukla, 2021). En effet, tous les organismes vivants sont dotés d'un système de défense efficace pour équilibrer la production excessive des ERO (Kotha et al., 2022). La détermination de l'état oxydatif de l'organisme nécessite le dosage de plusieurs biomarqueurs (Marrocco et al., 2017).

En outre, pour évaluer le statut antioxydant, il est essentiel de prendre en compte les activités antioxydantes enzymatiques et les niveaux d'antioxydants non enzymatiques. La synergie ou la concurrence entre les substances, ainsi que la contribution de chaque antioxydant à la capacité antioxydante globale, peuvent ne pas être correctement prises en compte en mesurant ces biomarqueurs séparément. En évaluant simultanément les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, nous pouvons obtenir une compréhension plus complète de l'état des antioxydants (Gaggini et al., 2020 ; Babiuch et al., 2019).

2.3.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Il existe un réseau complexe hautement régulé d'enzymes antioxydantes. Ces enzymes sont présentes dans plusieurs compartiments cellulaires, permettant ainsi de maintenir un niveau des EOR optimal pour la survie des cellules. Des niveaux élevés d'activités enzymatiques antioxydantes peuvent contribuer à l'installation de mécanismes de protection contre les dommages oxydatifs causés par la sécheresse et la salinité (Sharma et al., 2005).

2.3.1.1 Acétylcholinestérase

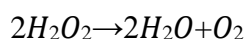
L'acétylcholinestérase (AChE), est l'enzyme responsable sur l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh). Cette minuscule protéine joue un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre délicat des signaux qui contrôlent le système nerveux (Richardson et al., 2019). L'AChE catalyse un processus très efficace en tant qu'enzyme, comme la conversion de l'acétylcholine en acétate et en choline, ce qui pourrait être attribué à sa structure tridimensionnelle. L'enzyme fonctionne la plupart du temps en harmonie avec la Choline oxidase (ChOx) qui réagit avec la choline issue de la réaction précédente pour produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) utilisé pour la détection électrochimique du signal de réponse qui indiquant la concentration du substrat (acétylcholine) (Ouiram et al., 2021).

2.3.1.2 Glutathion-S transférase

Les glutathion S-transférases (GST) sont des isoenzymes aux multiples fonctions physiologiques (Blanchette *et al.*, 2007). Les GST sont non seulement des enzymes de détoxification de phase II importantes, mais elles suppriment également les dommages oxydatifs. Les GST catalysent la liaison du glutathion nucléophile (GSH) aux produits chimiques exogènes électrophiles pour les détoxifier (Hayes *et al.*, 2005). Ils peuvent détoxifier aussi les composés endogènes et les polluants, tels que les pesticides et les herbicides (Nebert *et Vasiliou*, 2004). Le centre actif de la réaction catalysée par la GST se compose de deux sites spécifiques : le site G et le site H (David *et al.*, 2001). La GST catalyse la liaison du GSH (glutathion) aux substances toxiques, ce qui réduit la toxicité des substances toxiques et augmente leur solubilité ce qui facilite leur élimination (Josephy, 2010). Les GST sont divisées en trois catégories selon leur localisation : les GST cytosoliques, les GST mitochondriales et les GST microsomaux (Liu *et al.*, 2023).

2.3.1.3 La Catalase

La catalase (EC 1.11.1.6) est une enzyme d'oxydoréduction contenant de l'hème, joue un rôle important dans la protection de l'organisme contre les dommages toxiques causés par le peroxyde d'hydrogène afin de maintenir la santé et de réguler la physiopathologie des organismes (Cui *et al.*, 2023 ; Shahraki *et al.*, 2020). C'est une tétramère en forme d'haltère avec quatre chaînes polypeptidiques, chacune d'entre elles contenant un groupe hème porphyrine dans le site actif pour réagir avec le peroxyde d'hydrogène (Kaur *et Singh*, 2022). Les catalases sont une classe d'oxydoréductases extrêmement répandues dans les micro-organismes, les animaux et les plantes dont le poids moléculaire varie de 60 à 75 kDa poids moléculaire (Goyal *et Basak*, 2012). En raison de leur stabilité et de leur rigidité, les structures stables de la catalase résistent à la protéolyse, à la dénaturation induite par le pH et la température pour détoxifier le stress oxydatif dans le mécanisme antioxydant cellulaire (Shen *et al.*, 2011). Ces enzymes présentent l'un des taux de rotation les plus élevés, catalysant la conversion de 2,8 millions de molécules de H₂O₂ en H₂O et O₂ (Smejkal *et Kakumanu*, 2019) :



2.3.2 Systèmes non antioxydants enzymatiques

Les systèmes antioxydants non enzymatiques jouent un rôle clé dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif. Leur accumulation permet de neutraliser les radicaux hydroxyles, réduisant ainsi les dommages oxydatifs et préservant l'intégrité des enzymes antioxydantes. Ces systèmes agissent en complément des enzymes pour assurer un équilibre optimal dans la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (Hamma *et al.*, 2015).

2.3.2.1 Glutathion réduit

Le GSH est un tripeptide composé de glutamate, de cystéine et de glycine, qui joue un rôle primordial dans la protection des mitochondries contre les radicaux libres et les peroxydes (Wark *et al.*, 2004 ; Wahab *et al.*, 2001), il régule la prolifération cellulaire, le métabolisme et l'apoptose (Lu, 2013 ; Marí *et al.*, 2013). Les multiples facteurs qui contrôlent la synthèse du GSH comprennent la teneur en substrat et l'activité de l'enzyme limitant la vitesse de synthèse et l'homéostasie du GSH (Franklin *et al.*, 2009). Il est important de noter que la teneur en GSH est un facteur déterminant la progression de la mort cellulaire (Franco *et Cidlowski*, 2012). La présence de ROS (espèces réactives de l'oxygène) favorise l'oxydation de la cystéine en sa forme disulfure, la cystine, ce qui entraîne une diminution supplémentaire du pool de cystéine disponible (Stephenson *et al.*, 2015). La réduction des niveaux de GSH (glutathion) augmente la vulnérabilité cellulaire au stress oxydatif et contribue à la libération de cytokines pro-inflammatoires, à la formation de radicaux libres, à l'inhibition des fonctions des macrophages et des cellules NK (Natural Killer), ainsi qu'à la susceptibilité et à la progression de diverses pathologies (Teskey *et al.*, 2018). Plusieurs études ont rapporté que le déficit en GSH et les modifications post-traductionnelles des protéines par glu-tathionylation sont des régulateurs clés de l'apoptose (Franco *et al.*, 2007; Troyano *et al.*, 2003). Le stress oxydatif (SO) induit par la production massive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et par l'épuisement du glutathion intracellulaire (GSH) peut être considéré comme l'un des principaux mécanismes de la toxicité après une exposition à long terme. La surproduction de ROS et les dommages moléculaires affectant les antioxydants liés au GSH, contribuent à la libération des glutathion-péroxydases (GPXs), la glutathion-réductase (GSR), la glutathion synthase (GSS) et les glutathion-S-transférases (GSTs) (Tahmasbpour *et al.*, 2016) . Ces enzymes, notamment les GPXs et les GSTs, utilisent le GSH pour protéger les cellules contre les radicaux libres (**Figure 13**).

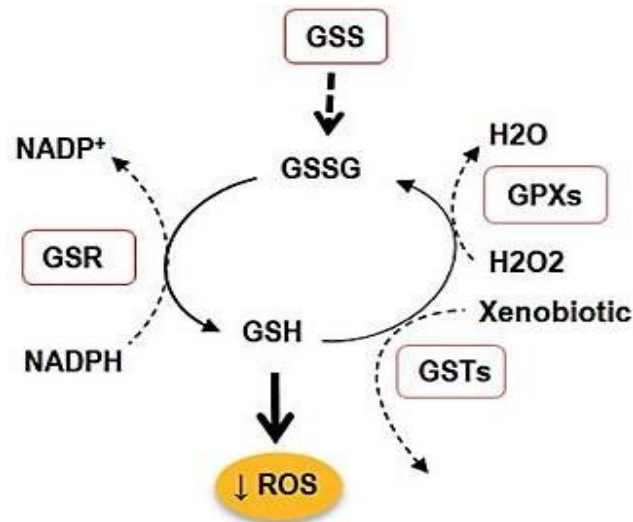


Figure 13. La production de GSH et les enzymes dépendantes (Layali *et al.*, 2018)

2.3.2.2 Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne induite par les radicaux libres (Hassannia *et al.*, 2019; Farmer *et al.*, 2022). Dans l'étape d'initiation, les premiers radicaux sont générés par du fer labile réagissant avec du peroxyde (H₂O₂), et dans l'étape de propagation, ces radicaux réagissent avec de nouveaux substrats créant de nouveaux radicaux, ce qui se répète jusqu'à la terminaison lorsque des antioxydants ou un autre radical "neutralise" les radicaux. (Gaschler *et Stockwell*, 2017). Cependant, l'efficacité de la production de radicaux pendant le processus d'initiation dans les cellules est faible en raison de la faible concentration d'ions fer libres. De même, le taux de propagation est également faible par rapport à d'autres réactions dans la chaîne en raison de niveaux d'activité plus bas des radicaux peroxydes (ROO) (Yin *et al.*, 2011, Wu *et al.*, 2022). De plus, de nombreuses substances réductrices présentes dans les cellules réagissent avec les radicaux actifs, réduisant ainsi l'efficacité de la peroxydation des lipides (Gaschler *et Stockwell*, 2017). Le malondialdéhyde (MDA) est le principal aldéhyde actif résultant de la peroxydation des acides gras polyinsaturés des membranes et, par conséquent, utilisé pour prédire les dommages cellulaires causés par les ERO, ce mécanisme le rend l'un des plus importants biomarqueurs du stress oxydatif dans les tissus (Vlahogianni *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015). Dans un contexte de déséquilibre redox, des produits d'oxydation des cibles biologiques

s'accumulent. Les lipides présents dans les membranes biologiques et dans les lipoprotéines représentent des cibles majeures d'oxydation et les produits formés peuvent alors constituer des marqueurs utilisés pour l'évaluation du « stress oxydant ». Les marqueurs de l'oxydation des lipides sont essentiellement des marqueurs de peroxydation lipidique, processus qui se produit en présence d'oxygène et concerne des structures contenant des acides gras polyinsaturés (AGPI). Ce processus est initié par des espèces radicalaires telles que le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$, très réactif (constante de vitesse de l'ordre de $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ou le radical peroxyde $\text{RO}_2\bullet$, R désignant une chaîne d'acide gras (**figure 14**). Les AGPI, tels que l'acide arachidonique (C20:4) et l'acide docosahexaénoïque (C22:6) sont en effet hautement peroxydables. Ainsi, l'acide arachidonique, qui possède vingt atomes de carbone et quatre doubles liaisons en C5, C8, C11 et C14, peut facilement conduire, par arrachement d'un atome d'hydrogène à partir d'un groupement méthylène en alpha d'une double liaison (en C7, C10, C13), et après réarrangement moléculaire et addition d'oxygène, à des radicaux peroxydes propagateurs de la peroxydation lipidique. Ces radicaux peuvent générer des hydroperoxydes mais aussi des endoperoxydes ([Bonnefont-Rousselto, 2020](#)).

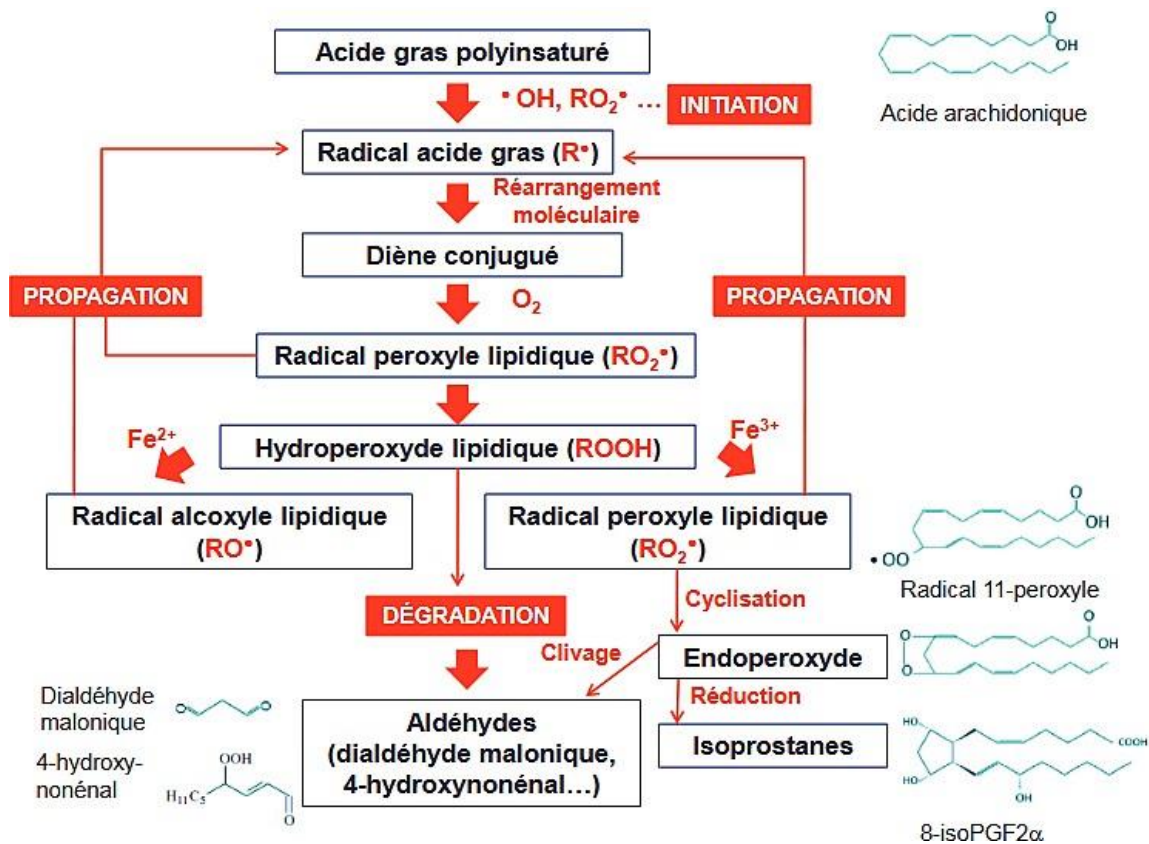


Figure 14. Schéma de la peroxydation lipidique ([Bonnefont-Rousselto, 2020](#))

Chapitre III

Gambusia affinis (Baird et Girard., 1853)

CHAPITRE III : *Gambusia affinis*

1. Intérêt de l'espèce

Gambusia affinis (Baird et Girard., 1853) est un petit poisson ovovivipare invasif d'eau douce originaire du sud-est des États-Unis d'Amérique, ainsi que le Mexique et Cuba. Très adaptable et vit dans les rivières, les étangs, les marécages et les rizières (Ali et al., 2012 ; Zhou et al., 2022). *G. affinis* est considérée comme une efficace prédatrice indigène des larves de moustiques (Global Invasive Species Database GISD, 2015). Elle est utilisée comme outil de lutte biologique pour la prévention et le contrôle du paludisme par sa capacité d'éradiquer les moustiques (Carlson et al., 2015). Elle présente une large gamme d'habitudes alimentaires, une bonne tolérance physiologique, une croissance rapide de la population et sa forte tolérance aux changements environnementaux (Evelin Rautenberg et al., 2015; Cabrera et al., 2017; Touaylia et Labiadh, 2019). C'est une excellente espèce bio-indicatrice de pollution des milieux aquatiques, implémenter dans les expériences en laboratoire afin d'évaluer la toxicité chez les poissons a l'égard de différents polluants (Huang et al., 2016). Les Gambusies sont largement utilisées dans des études menées sur les perturbations endocriniens en raison de leurs caractéristiques sexuelles secondaires dépendantes des hormones (Hou et al., 2019; Huang et al., 2019b).

2. Historique de l'espèce

En tant que contrôleurs naturels de moustiques, les espèces *G. holbrooki* et *G. affinis* ont été introduites régulièrement et sans discrimination dans les zones tempérées et tropicales à travers le monde. Aux États-Unis, les premiers cas connus d'introduction de Gambusies remontent au début des années 1900 (Krumholz, 1948). En 1905, environ 150 *G. affinis* ont été transférés du Texas à Hawaï pour évaluer leur capacité à consommer les larves de moustiques (Seale, 1905), et dès 1910, leurs descendants avaient été relâchés sur les îles d'Oahu, Hawaï, Maui, Kauai, et Molokai (Van Dine, 1907; Stearns, 1983). De surcroît, en 1905, des Gambusies, probablement en provenance de Caroline du Nord, ont été introduites dans les eaux du New Jersey pour le contrôle des moustiques (Seal, 1910; Krumholz, 1948). En 1922, des Gambusies du Texas (900 d'Austin et 300 de Hearne) ont été introduites dans un bassin de nénuphars à Sutter's Fort. Ce bassin a ensuite servi de pépinière pour diffuser *G. affinis* en Californie et au Nevada durant les années 1920 et 1930 (Stockwell et al., 1996).

En Algérie, la période de l'introduction de la gambusie fait l'objet de débats parmi les chercheurs. Draredja-Beldi (1993) ainsi que Samraoui et De Belair (1997) affirment que l'espèce a été introduite aux alentours de 1928. En revanche, Leberre (1989) et Kara (2012) citent les années 1926 et 1931 respectivement. Selon Seurat (1930) et Gerberich et Laird (1968), l'introduction aurait eu lieu en 1924 (Gerberich et Laird, 1968). Cette espèce a été introduite à Khemissa (province de Souk Ahras) vers 1928 pour la lutte biologique contre les moustiques Anophèles qui transmettent les parasites du Plasmodium responsables du paludisme. La dernière introduction de lutte biologique à ce jour a été réalisée par la Direction de la Pêche et des Ressources Halieutiques (DPRH) d'Alger en juillet 2021 par l'introduction de 200 adultes de *Gambusia* dans le parc Dounia, province d'Alger (CNRDPA, 2021).

3. Position systématique

Gambusia affinis a été décrites pour la première fois dans les années 1850 sous différents noms par plusieurs ichtyologistes renommés. En 1853, les gambusies de l'Ouest provenant de la mission frontalière États-Unis-Mexique de 1851 ont été décrites sous le nom de "*Heterandria affinis*" par Spencer Baird et Charles Girard (Baird et Girard, 1853). En 1858, Baird et Girard ont changé le nom du genre en *Gambusia* en raison de sa relation physique étroite avec les spécimens cubains de *Gambusia* décrits par Poey en 1854 (Girard, 1858). Cette espèce âgé plus de 68 millions d'années s'est diversifié en Amérique centrale et en Amérique du Nord après une dispersion à partir de l'Amérique du Sud, il y a 5 millions d'années (Hrbek et al., 2007 ; Reznick et al., 2017). Le genre le plus spéculaire des vivipares est *Gambusia*, avec environ 45 espèces existantes, toutes originaires de la région des Caraïbes et des régions voisines des Amériques (Langerhans et al., 2007 ; Lydeard et al., 1995).

Les espèces *Gambusia affinis* et *Gambusia holbrooki* ont longtemps été considérées comme des sous-espèces d'une même entité taxonomique, *Gambusia affinis*. Cependant, des analyses morphologiques et moléculaires récentes ont confirmé leur statut d'espèces distinctes (Quvatov et Atamuratova, 2014 ; Gao et al., 2017). L'identification de ces espèces demeure complexe, car de nombreuses introductions ont eu lieu avant cette révision taxonomique, souvent sans documentation sur l'origine des populations concernées. De plus, leur ressemblance morphologique rend leur distinction difficile (Vecchioni et al., 2025). L'expansion de *G. affinis* et *G. holbrooki* hors de leur aire de répartition naturelle a été largement facilitée par l'homme, en raison de leur utilisation dans le contrôle des populations de moustiques et d'autres interventions anthropiques (Walton et al., 2016).

La classification taxonomique des espèces *Gambusia affinis* et *Gambusia holbrooki* a connu de nombreuses révisions au fil des années. Les complexités des relations phylogénétiques entre ces espèces, combinées à leurs multiples introductions à travers le monde, rendent parfois difficile leur distinction dans les études scientifiques (Vecchioni et al., 2025 ; Rehage et al., 2020). Bien que ces espèces soient aujourd’hui généralement reconnues comme distinctes, certaines recherches continuent de débattre de leur statut taxonomique et considèrent encore *G. holbrooki* comme une sous-espèce de *G. affinis* (Esposito, 2024).

L’Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN) propose une hiérarchie taxonomique la plus exhaustive, mise à jour en Janvier 2024, se présente dans le **tableau 3** :

Tableau 3 : Position systématique de *G. affinis* :

Domaine : Biota Endl.(D.Don)
Règne : Animalia (Linnaeus, 1758)
Sous-Règne : Eumetazoa (Bütschli, 1910)
Clade : Bilateria (Haeckel, 1874)
Infra-Règne : Deuterostomia (Karl Grobben, 1908)
Phylum : Chordata (Haeckel, 1874)
Sous-Phylum : Craniata (Janvier, 1981)
Infra-Phylum : Vertebrata (Linnaeus, 1758)
Super-Classe : Gnathostomata (von Zittel, 1879)
Clade : Euteleostomi
Classe : Actinopterygii (Klein, 1885)
Sous-Classe : Neopterygii (Regan, 1923)
Infra-Classe : Teleostei
Ordre : Cyprinodontiformes
Famille : Poeciliidae (Bonaparte, 1831)
Sous-Famille : Poeciliinae (Bonaparte, 1831)
Genre : <i>Gambusia</i> (Poey, 1854)
Espèce : <i>affinis</i> (Baird & Girard, 1853)

4. Morphologie de l'espèce

Gambusia affinis (Baird & Girard, 1853) est un poisson ovovivipare de petite taille, au corps trapu et fusiforme, présentant une pigmentation mélanistique et recouvert de grandes écailles cycloïdes. La région thoracique est arrondie et caractérisée par une grande tête à surface dorsale aplatie, avec des yeux relativement larges. Ce poisson possède une bouche dirigée vers le haut, dite « bouche super », adaptée à la capture des larves et des insectes dérivant à la surface de l'eau, avec une rangée de petites dents coniques sur les deux lèvres (Snelson et Krabbenhoft, 2021). Les Gambusies ont la capacité d'ajuster leur coloration en modifiant l'agrégation des pigments de mélanine dans leurs chromatophores (Kumar et al., 2019). Les caractéristiques méristiques varient légèrement : la nageoire caudale présente plusieurs lignes transversales sombres peu marquées, la nageoire dorsale est ornée de petites taches noires et compte entre 6 et 7 rayons, tandis que la nageoire anale en possède entre 9 et 10, et la nageoire pectorale entre 11 et 12 (Figure 14) (Ribeiro et al., 2018). À l'âge adulte, les femelles peuvent atteindre une longueur maximale d'environ 6,4 cm, tandis que les mâles ne dépassent pas 3,8 cm (Piazzon et al., 2020). Les femelles présentent un corps relativement trapu et translucide sur la partie dorsale, avec une nageoire ventrale arrondie. Lors de la gestation, une « tache gravidé » correspondant à 'l'ovaire' (Figure 15(a)) visible à travers la transparence des téguments (Teimori et al., 2017). Tandis que, les mâles sont plus fins et légèrement comprimés, arborent de petites taches sur la nageoire caudale, la nageoire dorsale et parfois sur le corps, ayant un caractère distinctif majeur est la présence du 'gonopode' un organe copulateur modifié issu de la nageoire anale, utilisé pour la fécondation interne (Figure 15 (b)) (Reznick et Bryant, 2021).

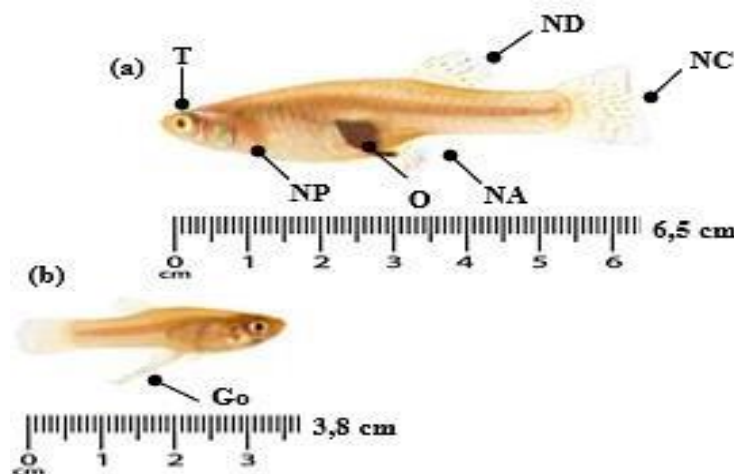


Figure 15. Anatomie externe de *Gambusia affinis*

- (a) Femelle. ND : Nageoire Dorsale, NC : Nageoire Caudale
 (b) Mâle NA : Nageoire Anale, NP : Nageoire Pectorale
 T : Tête, O : Ovaire, Go : Gonopode

5. Dimorphisme sexuel

A l'état de maturité sexuelle cette espèce exhibe un dimorphisme sexuel prononcé distinct par une différence de taille très nette (Huang *et al.*, 2024). La femelle est deux à trois fois plus grande que le mâle (Chouahda, 2011). Le dimorphisme se reflétant aussi dans la morphologie de la nageoire anale et du squelette, en particulier au niveau des troisième, quatrième et sixième rayons (Zhong *et al.*, 2021). Les femelles possèdent une nageoire anale arrondie en forme normale (Figure. 16(a)) qui peut se transformer en gonopode (Figure. 16(b)), accompagnée de côtes fines s'étendant vers l'arrière en direction du bouclier caudal. En particulier, les quatorzième, quinzième et seizième épines hémales sont sensibles aux substances androgéniques (Rosa-Molinar *et al.*, 1998 ; Hou *et al.*, 2011 ; Turner, 1942 ; Wen *et al.*, 2013 ; Xie *et al.*, 2010). En raison des différences du troisième rayon entre les mâles et les femelles, la longueur des quatrième et sixième rayons de la nageoire anale est similaire chez les femelles, tandis que chez les mâles, elle varie considérablement (Hou *et al.*, 2019 ; Huang *et al.*, 2019a ; Wen *et al.*, 2013), elle est transformée en gonopode au cours de la maturité, c'est l'allongement quatorzième, quinzième et seizième épines hémales de la colonne vertébrale (Figure. 16 (c),(d)) (Zhong *et al.*, 2021) avec une disposition spécifique des crochets à l'extrémité, les rayons formant une languette rigide en forme de gouttière et musclées associés permettant une grande mobilité; cet organe copulateur utilisé lors du transfert du sperme dans l'organe génitale femelle lors de la fécondation (Liang *et al.*, 2020).

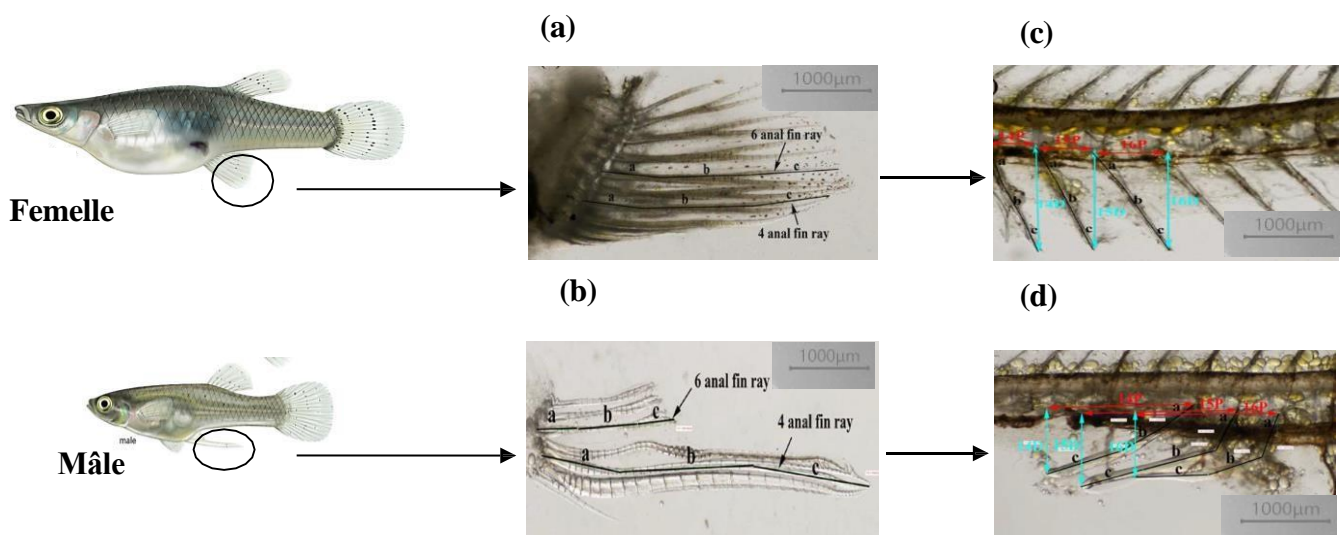


Figure 16. Morphologie de la nageoire anale chez *Gambusia affinis*, (a) Nageoire anale chez la femelle, (b) Nageoire anale chez le mâle, (c) Epines hémales de la nageoire anale chez la femelle, (d) Epines hémales de la nageoire anale chez le mâle. Echelle = 1000 µm (Huang *et al.*, 2024)

6. Répartition dans le monde

Le poisson Poeciliidé *Gambusia affinis* est l'un des exemples les plus emblématiques d'invasion à l'échelle mondiale. Il est aujourd'hui considéré comme l'une des espèces de poissons d'eau douce les plus répandues à l'échelle mondiale (Bernery *et al.*, 2022). Des études récentes confirment que *G. affinis* est particulièrement répandu en Asie du Sud-Est, notamment en Chine continentale, à Taïwan, en Malaisie et au Myanmar (Han *et al.*, 2024 ; Wang *et al.*, 2023 ; Reynolds *et al.*, 2022).

La Répartition mondiale signalée de *Gambusia affinis* selon la carte de l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (Figure 17) ont rapporté une abondance aux États-Unis, ainsi que dans certaines régions d'Amérique centrale et du Sud, en Afrique à travers l'Europe, en Asie et en Océanie. Cette expansion continue de soulever des préoccupations écologiques en raison de son impact négatif sur les écosystèmes locaux et les espèces endémiques (Hashimoto *et al.*, 2024).

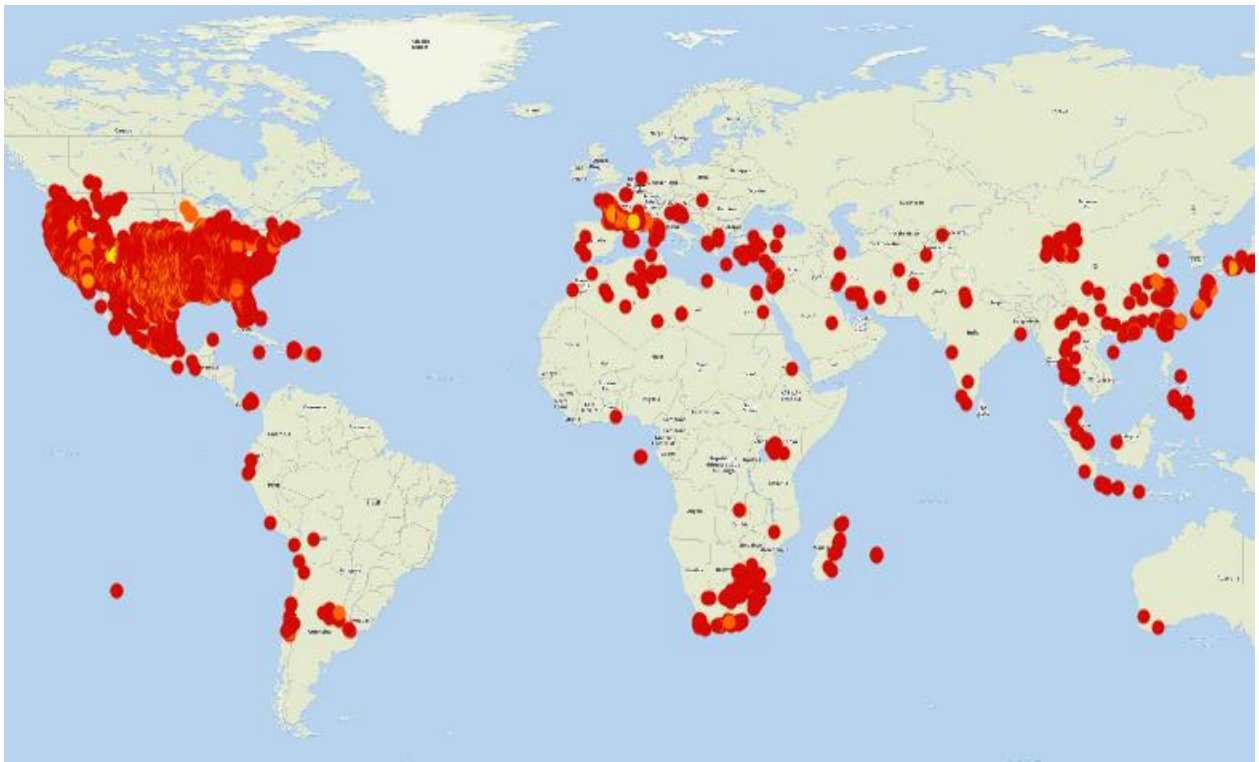


Figure 17. Répartition mondiale signalée de *Gambusia affinis*. Carte provenant du L'Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN, 2024) (https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/68825/tab/carte)

7. Habitat et écologie

Les habitats privilégiés de *Gambusia affinis* incluent les étangs, les lacs et les cours d'eau de plaine, où sa grande tolérance aux variations de salinité, de température et d'oxygène dissous lui permet de survivre dans des conditions extrêmes. Cette espèce peut ainsi prospérer dans des mares stagnantes, des grandes flaques d'eau et des marécages, même lorsque le taux d'oxygène dissous est inférieur à 0,2 mg/L (Kurtul et al., 2024). Elle peut coloniser de nouveaux bassins versants en utilisant les lagunes et les zones humides côtières comme corridors de dispersion (Hashimoto et al., 2024). Cette espèce est souvent retrouvée dans des cours d'eau lents, riches en macrophytes et à température élevée, conditions qui favorisent sa reproduction et offrent une protection contre les prédateurs et les courants forts (Lee et al., 2018 ; Vidal et al., 2010).

Les études récentes indiquent que *Gambusia affinis* préfère des habitats où la température de l'eau est comprise entre 31 et 35 °C et où le pH varie entre 6,0 et 8,0, ce qui maximise son taux de survie et de reproduction (Walton et al., 2007). De plus, cette espèce est connue pour effectuer des migrations diurnes entre des eaux plus profondes et des zones peu profondes (Wood et al., 2020). Les populations introduites montrent également une nette préférence pour les eaux stagnantes, les canaux et les ruisseaux à faible courant (Swenton et Kodric-Brown, 2012). En revanche, *Gambusia affinis* tolère mal le froid, dans la plupart des cas, sa survie hivernale dans les régions froides nécessite la présence de sources d'eau souterraines, elle subit une mortalité hivernale importante, pouvant atteindre jusqu'au 99 % de la population (Nico et al., 2024).

8. Cycle biologique

Ces poissons ovovivipares possèdent un cycle de vie court et une reproduction rapide qui leur permettent de coloniser efficacement divers milieux aquatiques (Liang et al., 2023). Comme chez d'autres Poeciliidae à ovaire de type cystovarien, l'épithélium germinal de *G. affinis* subit une invagination formant une structure sacculaire dans l'ovaire embryonnaire, facilitant ainsi une ovulation interne où les ovules sont libérés dans la lumière ovarienne (Bhat et Ganesh, 2019). La fécondation et la gestation se produisent de manière intrafolliculaire, ce qui signifie que le développement embryonnaire se déroule dans le follicule ovarien jusqu'à la naissance des juvéniles (Guzman et al., 2023).

Gambusia affinis est classée comme une espèce lécithotrophe, ce qui signifie que le développement embryonnaire repose exclusivement sur les réserves de vitellus présentes dans l'ovocyte avant la fécondation, contrairement aux espèces matrotrophes, où un apport nutritionnel supplémentaire est fourni via des structures placentaires, les embryons de *G. affinis* ne reçoivent aucun transfert nutritif actif de la mère après la fertilisation (Barough et al., 2024). La température joue un rôle déterminant dans la croissance et la reproduction de l'espèce, une corrélation positive est observée entre la température de l'eau et la vitesse de croissance des juvéniles jusqu'à 30°C, bien qu'une température dépassant 35°C inhibe le développement et augmente la mortalité (Kalogianni et al., 2024).

De plus, une densité de population élevée ralentit la croissance individuelle et modifie les comportements reproductifs en réduisant la fréquence des interactions entre individus (Barough et al., 2024). À la naissance, une relation inverse est observée entre la taille des alevins et le nombre de juvéniles portés par la femelle, illustrant une relation entre le nombre et la taille des descendants, plus la femelle engendre une grande portée, plus la taille individuelle des alevins tend à être réduite, illustrant ainsi un compromis énergétique entre le nombre et la qualité des descendants (Zúñiga-Vega et al., 2024). La gestation dure approximativement un mois, avec une portée moyenne de 40 à 60 alevins, bien que certaines observations aient rapporté des portées dépassant 300 individus (Uribe et al., 2019 ; Furness et al., 2021).

9. Reproduction et comportement

Le cycle reproductif annuel de *Gambusia affinis* est caractérisé par une saison de reproduction distincte qui s'étend du printemps à l'automne, atteignant un pic estival (Renner et Duggan, 2024). La fécondation est interne et la gestation se déroule au sein des ovaires, caractérisée par un stockage des spermatozoïdes permettant plusieurs gestations successives sans nouvelle insémination (Barough et al., 2024). Grâce à leur capacité de conservation des spermatozoïdes, les femelles peuvent réaliser jusqu'à cinq gestations successives sans accouplement supplémentaire, la durée de gestation varie entre 25 et 35 jours, avec un allongement du premier cycle gestationnel, souvent attribué aux ajustements hormonaux et métaboliques initiaux (Aspbury et al., 2024). Pendant cette période, les ovaires des femelles contiennent des embryons de taille homogène, qui sont expulsés séquentiellement, tandis que de nouveaux ovocytes déjà fécondés amorcent le développement de la génération suivante (Kalogianni et al., 2024).

La fécondité des femelles est en corrélation avec leur taille, elle diminue légèrement avec l'âge en raison de la baisse de la fréquence des portées (Gould et al., 2024). Le nombre d'alevins par portée varie généralement entre 16 et 52 individus, cette variation étant influencée par des facteurs tels que la température, la qualité de l'eau et la disponibilité des ressources alimentaires (Inman et al., 2025).

Les mâles atteignent leur maturité sexuelle environ quatre semaines après la naissance, alors que les femelles nécessitent environ six semaines avant de pouvoir se reproduire (Suárez-Rodríguez et al., 2024). La superfétation, phénomène où plusieurs cohortes d'embryons coexistent dans le même ovaire, constitue une stratégie reproductive clé chez *G. affinis*, ce mécanisme permet d'assurer un renouvellement rapide des générations, optimisant ainsi la survie des jeunes dans des environnements variables (Aspbury et al., 2024). Des recherches récentes soulignent que les stratégies reproductives des Poeciliidae, y compris la viviparité et la superfétation sont influencées par des facteurs environnementaux et évolutifs, ces adaptations permettent aux espèces de maximiser leur succès reproductif en fonction des conditions écologiques locales (Ramírez-García et al., 2021; Campuzano-Caballero, 2022).

10. Régime alimentaire

Gambusia affinis se nourrit principalement de larves de moustiques, ce qui lui a valu son nom commun de poisson-moustique (Chabet Dis et al., 2022). Toutefois, son régime alimentaire est varié et comprend également des détritiques, des invertébrés aquatiques, des insectes, des algues, des poissons ainsi que des œufs et larves d'amphibiens (Ember, 2023 ; Cheng et al., 2018). Ce poisson est un omnivore opportuniste et un prédateur généraliste capable d'adapter son alimentation en fonction de la disponibilité des ressources dans son habitat (Wood et al., 2019). *Gambusia affinis* ajuste son comportement alimentaire selon les saisons et les conditions écologiques locales. En période d'abondance de moustiques, il privilégie la consommation de leurs larves, jouant ainsi un rôle potentiel dans la régulation des populations de moustiques (Lee et al., 2018).

Cependant, cette espèce est connue pour ses impacts écologiques négatifs, car elle consomme un large éventail d'organismes aquatiques, ce qui peut affecter l'équilibre des écosystèmes locaux (Hashimoto et al., 2024). Sa flexibilité alimentaire peut entraîner une réduction significative de certaines populations de proies, notamment durant la saison de reproduction, période où ses besoins nutritionnels augmentent. Cette augmentation de la

pression alimentaire intensifie la compétition interspécifique et peut avoir des conséquences négatives sur la biodiversité aquatique, en réduisant les populations de certaines espèces indigènes par la prédation et la compétition (Harmon et Smith, 2021).

11. Ennemis et prédation

La mortalité due à la prédation chez le genre *Gambusia* est un facteur clé influençant la dynamique de ses populations. Parmi ses principaux prédateurs figurent les serpents aquatiques et les oiseaux piscivores, qui ciblent particulièrement les individus les plus vulnérables (Riesch et al., 2022). Les mâles présentent une mortalité plus élevée, notamment en raison de leur sensibilité accrue aux stress environnementaux et de comportements augmentant leur exposition aux prédateurs (Strasburg et Boone, 2022).

De plus, des recherches ont montré que le cannibalisme est une réponse adaptative aux conditions environnementales, influencée par la densité de population et la disponibilité en ressources alimentaires (Bunke, 2018). Le cannibalisme sexuel chez *Gambusia* est un phénomène moins fréquent que la prédation des juvéniles. Dans certaines conditions de stress, de compétition alimentaire ou de forte densité de population, les femelles peuvent attaquer et consommer les mâles petits ou affaiblis, et d'acquérir des nutriments essentiels pour la reproduction ou à une stratégie adaptative pour réduire la compétition (Iglesias-Carrasco et al., 2020)

Matériel et Méthodes

Partie Expérimentale

II. MATERIEL ET METHODES

1. Présentation du site d'échantillonnage

Dans l'optique d'étudier l'effet du bisphénol A sur *Gambusia affinis*, une sélection de site d'échantillonnage a été effectuée en amont de ce travail. Les échantillons ont été collectés au mois d'avril au niveau d'une retenue d'eau douce alimentée exclusivement par les eaux pluviales. Ce type d'habitat présente l'avantage de limiter les influences extérieures dues aux cours d'eau permanents qui pourraient être soumis à des rejets agricoles ou urbains. Le site est situé à Ain El Berda ($36^{\circ}44'50''$ N, $7^{\circ}40'14''$ E), à environ 38 km au sud-ouest d'Annaba, en Algérie (**Figure 18**). Le site d'échantillonnage, situé à l'écart de toutes activités anthropiques, ce qui réduit les interférences avec d'autres contaminants susceptibles de biaiser la fiabilité de l'étude. L'étang possède un fond tapissé de végétation aquatique, créant un micro-habitat stable pour les poissons et favorisant la régulation naturelle des paramètres physico-chimiques. L'analyse des paramètres physico-chimiques de l'eau révèle une température de $21,0 \pm 0,3$ C°, une salinité de $318,4 \pm 43,4$ mg/L, un pH : $7,4 \pm 0,1$ et un taux d'oxygène dissous de $3,5 \pm 0,4$ mg/L.

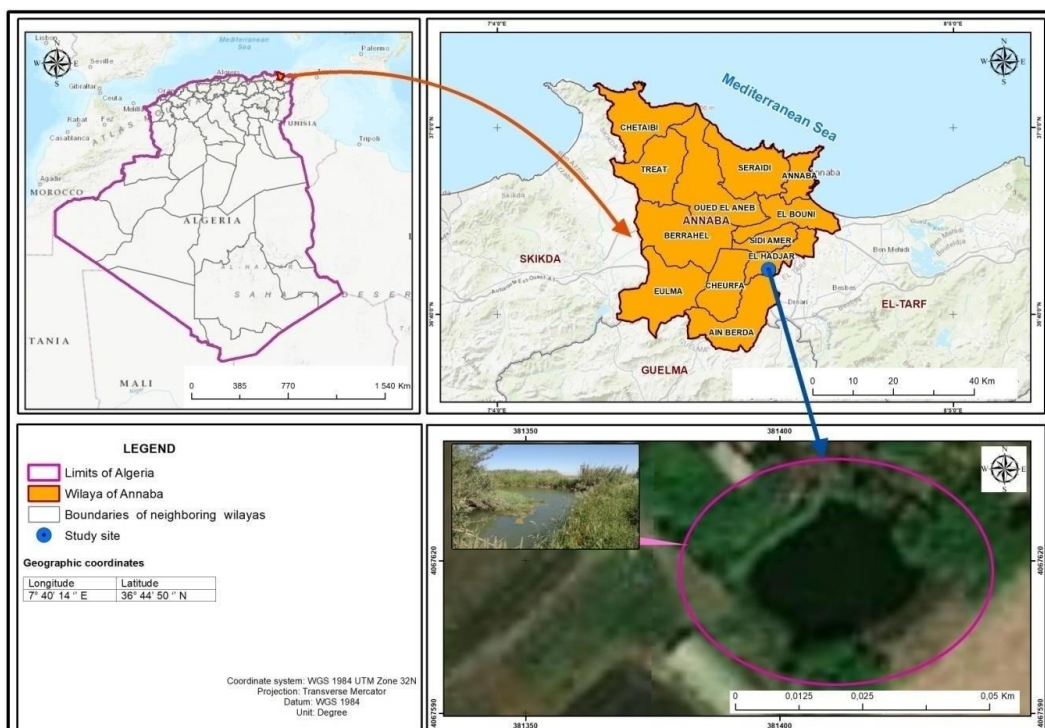


Figure 18. Localisation géographique du site d'échantillonnage (Ain El Berda, Annaba, Algérie) (SIG, 2021).

2. Stratégie d'échantillonnage

Les spécimens de *Gambusia affinis* ont été capturés à l'aide d'une épuisette à filet avec des mailles fines de 0,40 mm (**Figure 19**). Cette technique est largement utilisée en raison de son efficacité et de son faible impact sur le bien-être des individus capturés (Martínez *et al.*, 2018). La pêche est plus efficace en matinée, période où l'activité de nombreuses espèces de poissons de surface est maximale aux premières heures du jour en raison de la disponibilité accrue de la nourriture et de conditions thermiques favorables (Lee *et al.*, 2020). Les spécimens ont ensuite été transportés au laboratoire dans des bacs en plastique remplis d'eau prélevée directement du site, afin de préserver leurs conditions naturelles et minimiser le stress lié au transport.



Figure 19. Technique d'échantillonnage de *G. affinis* (photos personnelles).

3. Acclimatation en laboratoire

À leur arrivée au laboratoire, les poissons sont introduits dans des aquariums contenant de 50 à 70 litres d'eau de robinet prétraitée (**Figure 20**). L'eau du robinet est souvent utilisée, mais elle doit être préalablement exposée à l'air libre pendant 48 heures pour éliminer le chlore et autres substances chimiques résiduelles, conformément aux recommandations de Smith *et al.* (2019). L'acclimatation des poissons doit être progressive pour éviter un choc physiologique. L'installation est équipée de pompes à air (Nirox), de filtres et de diffuseurs, garantissant une qualité d'eau optimale. Pour assurer l'adaptation de *Gambusia affinis*, les conditions de maintenance doivent respecter les normes suivantes : Température : 16 - 28 °C (idéalement 24 ± 2 °C) ; pH : 7,0 - 8,5 ; Oxygène dissous : 5 - 8 mg/L ; Salinité : Tolérance jusqu'à 5 ppt

(parties par mille) ; Photopériode ; 14 heures de lumière / 10 heures d'obscurité. Un contrôle régulier de ces paramètres est essentiel pour prévenir le stress et assurer un bon taux de survie des poissons. L'alimentation des poissons a été assurée quotidiennement avec Tetramin® (Tetrawerk, Allemagne), un aliment composé de crevettes et de poissons déshydratés, assurant un apport nutritionnel adapté aux besoins des Gambusies. Les poissons sont nourris deux fois par jour, en adaptant la quantité d'aliment pour éviter les surplus qui altère la qualité de l'eau.

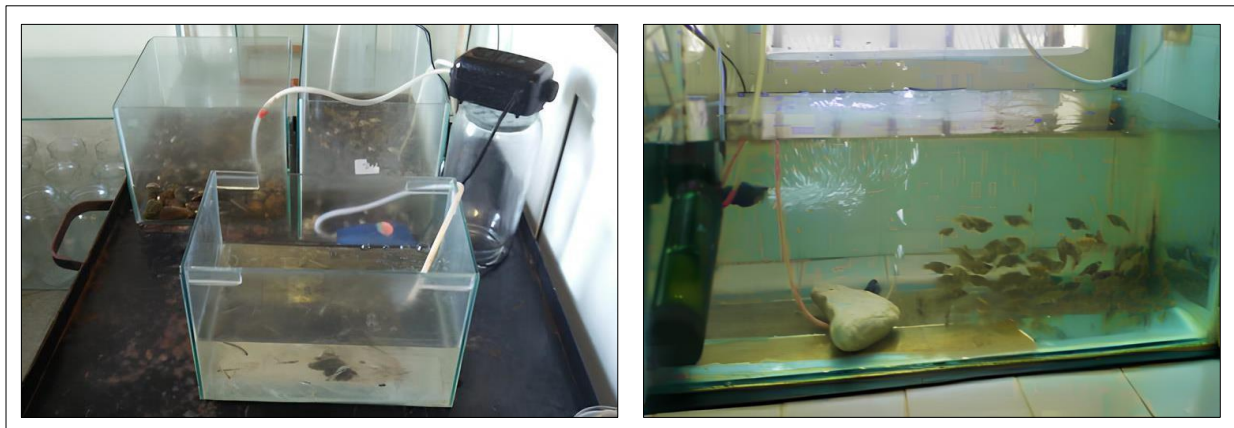


Figure 20. Acclimatation de *G. affinis* au laboratoire (Photo personnelle)

4. Protocole expérimental

4.1 Application du xénobiotique

Le bisphénol A est un composé organique incolore, inodore et solide, faiblement soluble dans l'eau, mais complètement soluble dans les solvants organiques (Cheng *et al.*, 2022), il possède une stabilité thermique et une résistance aux huiles et aux acides (Besaratinia, 2023). Le bisphénol A utilisé dans cette expérimentation est fourni sous forme de poudre blanche (Figure 21) par Sigma Chemical Co (St. Louis, France), avec une pureté supérieure à 99 %. La poudre de BPA est dissoute dans DMSO (Diméthylsulfoxyde) pour chaque concentration létale spécifique (CL₂₅, CL₅₀). La solution de BPA dissous dans DMSO est ensuite incorporée dans l'eau d'élevage des poissons. Les concentrations varient en fonction des objectifs de l'étude.



Figure 21. Texture en poudre du Bisphénol A

4.2 Test de toxicité

Les essais de mortalité des adultes mâles et femelles à différentes concentrations de bisphénol A ont été déterminés après 96 h d'exposition. Les poissons expérimentaux ont été soumis à des concentrations bien définies allant de 5 mg/L jusqu'à 30 mg/L, répartis en trois lots pour chaque concentration (Triplicata), comportant 10 spécimens dans un volume de 1 litre d'eau (**Figure 22**). Les taux de mortalité ont été enregistrés à 24, 48, 72 et 96 heures d'exposition au BPA. Un suivi quotidien a été effectué à la même heure tout au long de l'expérience, et les poissons morts ont été immédiatement retirés des bacs de traitement. Le pourcentage de mortalité de *G.affinis* a été noté de 0% au 100% dont les valeurs CL₂₅ et CL₅₀ ont été calculées.

Les données de mortalité observée durant les 96 heures sont corrigées pour éliminer l'effet de la mortalité naturelle en utilisant la formule d'Abbott (1925). Cette correction est cruciale pour obtenir des résultats fiables (Widmayer et al., 2022). Une transformation angulaire des données peut ensuite être appliquée pour ajuster les données de mortalité aux exigences statistiques de l'analyse (Dutta et al., 2023). Ensuite, une régression logistique dose-réponse est réalisée pour ajuster une courbe reliant la concentration du xénobiotique à la mortalité corrigée. Cette courbe sigmoïde permet de déterminer la concentration à laquelle 50 % et 25 % de mortalité sont atteints, correspondant ainsi respectivement à la CL₅₀ et à la CL₂₅ (Liess et al., 2013). Pour évaluer la précision des résultats, des intervalles de confiance sont calculés pour la CL₅₀ et la CL₂₅.

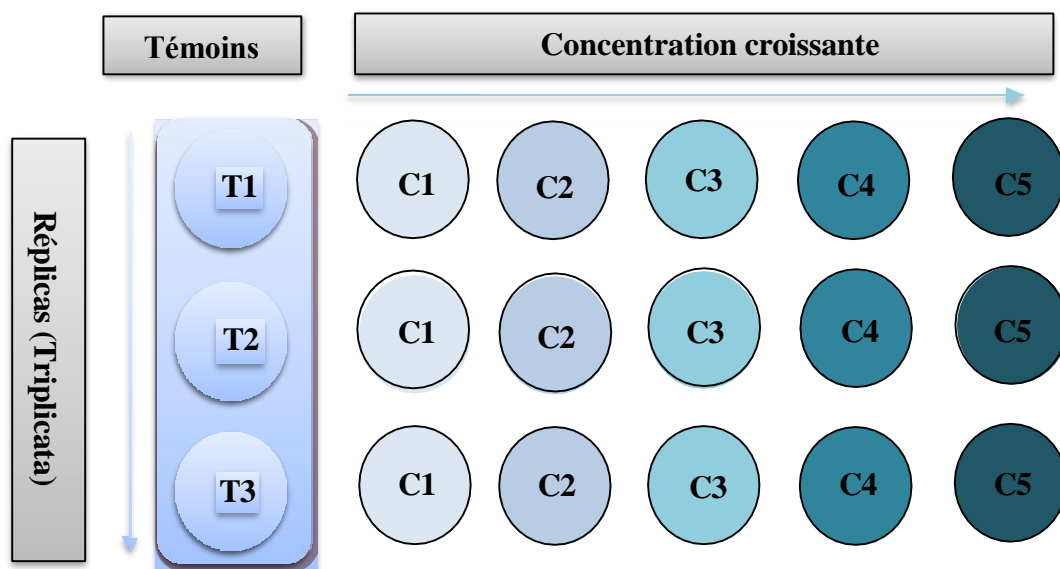


Figure 22. Plan expérimental des tests de toxicité aiguë du bisphénol A.

4.3 Traitement chronique au BPA

L'expérimentation s'est étalée sur 60 jours, les échantillons ont été placés dans des bocaux en verre munis de pompe à air et de filtres, contenant chacun 10 spécimens appartenant à la même classe de taille dans 1 L d'eau, préalablement acclimaté avant la contamination et répartis en trois groupes expérimentales comme suit :

Groupe I : lot témoins non traité

Groupe II : lot traité par la concentration **CL₂₅**

Groupe III : lot traité par la concentration **CL₅₀**

Les prélèvements ont été effectués chaque 15 jour à partir du temps initial 0 jusqu'au 60^{ème} jour, pour chaque groupe expérimentale. À la fin de l'expérience, les spécimens sont placés dans la glace pour s'assurer de l'arrêt de leurs fonctions vitales. Les poissons ont été ensuite disséqués sous conditions glaciales à 4°C pour éviter le risque de dénaturation des protéines. Les organes extraits : l'hépatopancréas et la tête, ainsi que les testicules chez les mâles et les ovaires chez les femelles, ont été pesés puis placés séparément dans des mortiers pour le broyage. Les testicules ont été fixés immédiatement dans une solution de formaldéhyde à 10 % pour effectuer des coupes histologiques.

5. Prélèvement des organes

Les poissons provenant des lots appropriés sont d'abord anesthésiés au chloroforme pendant 3 à 5 minutes, jusqu'à l'immobilisation des opercules. Une fois les poissons paralysés, ils sont fixés latéralement sur une plaque de paraffine à l'aide d'épingles insérées par la bouche et la nageoire anale. La dissection, effectuée sous une loupe binoculaire, débute par une incision partant de l'orifice génital jusqu'aux opercules (**Figure 23**).

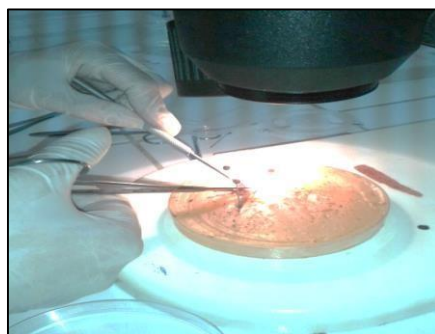


Figure 23. Dissection des adultes *G. affinis* (Photo personnelle)

6. Indices biométriques

Les indices gonado-somatique (IGS) et hépato-somatique (IHS) sont largement reconnus comme des indicateurs clés pour évaluer la période de reproduction chez les poissons téléostéens. Leur variation reflète respectivement le développement des gonades et l'état énergétique de l'individu, notamment à travers les réserves hépatiques mobilisées lors de la maturation sexuelle (Bouhali *et al.*, 2015 ; Mauffret *et al.*, 2021).

6.1 Indice Gonado-Somatique

L'indice gonado-somatique (IGS) permet de déterminer l'importance relative des gonades en fonction de la masse totale de l'organisme. Ce rapport est considéré comme un véritable coefficient de maturité sexuelle. Selon Bougis (1952), il est exprimé à l'aide de la formule suivante :

$$\mathbf{IGS} = \frac{\text{masse des gonades}}{\text{masse totale de l'individu}} \times \mathbf{100}$$

6.2 Indice Hépato-Somatique

L'indice hépato-somatique (IHS) permet d'analyser les variations de la masse hépatique par rapport à la masse corporelle totale au cours du cycle de reproduction, indiquant ainsi son rôle dans le transfert des réserves lipidiques nécessaires au développement des gonades, notamment lors de la vitellogenèse. Il s'exprime, selon Bougis (1952), par la formule suivante :

$$\mathbf{IHS} = \frac{\text{masse de l'hépatopancréas}}{\text{masse totale de l'individu}} \times \mathbf{100}$$

6.3 Indice de condition

L'indice de condition, utilisé pour évaluer l'état corporel d'un organisme, se calcule selon la formule de Le Cren (1951) suivante :

$$\mathbf{K} = \frac{\text{masse totale de l'individu}}{(\text{longueur totale de l'individu})^3} \times \mathbf{100}$$

7. Dosage des biomarqueurs

7.1 Préparation de L'homogénat

Les organes provenant d'adultes mâles et femelles, témoins et traités, de *Gambusia affinis* issus des lots étudiés ont été homogénéisés dans la fraction S9. Les tissus ont été broyés dans 1 mL de tampon phosphate (TBS : Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) selon un rapport poids/volume de 1:2. La suspension ainsi obtenue a été soumise à une centrifugation à 9000 g pendant 15 minutes à une température de 4 °C. Les surnageant obtenues ont été aliquotés dans des tubes Eppendorf et conservés à - 25 °C jusqu'au moment de l'analyse (Bainy *et al.*, 1996).

En vue du dosage des biomarqueurs du stress oxydant, quatre tampons distincts ont été préparés : le tampon Tris à 20 mM pour le dosage des protéines, GSH, GST et la CAT (Bainy *et al.*, 1996) ; le tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton pour le dosage de l'AChE (Ellman *et al.*, 1961) ; le tampon chlorure de potassium à 1,15 % pour le dosage de l'MDA (Uchiyama *et Mihara*, 1978). La composition détaillée et la préparation de chaque tampon sont présentées dans l'Annexe 1.

7.2 Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE)

La méthode de dosage de l'acétylcholinestérase (AChE) la plus courante est celle d'Ellman *et al.*, (1961), elle consiste à fournir à l'enzyme un substrat l'acétylthiocholine (ASCh) dont l'hydrolyse catalysée libère de la thiocholine (SCh), la révélation de l'activité faisant intervenir de l'acide 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque qui se lie avec la thiocholine pour former un complexe de couleur jaune que l'on dose à 412 nm. Le dosage de l'acétylcholinestérase a été réalisé selon la méthode décrite par Ellman *et al.*, (1961), au niveau de la tête. Le dosage de l'activité AChE a été réalisé conformément à ce protocole, et les détails relatifs à la préparation des réactifs et à leur composition sont présentés dans l'Annexe 2.

Le mode opératoire a été réalisé comme suit :

Réactifs	Essai (µl)	Blanc (µl)
Tampon phosphate	1000µl	1050 µl
DTNB	50 µl	50 µl
Asch	50 µl	50 µl
Echantillon	50 µl	-----

- Les tubes sont bouchés puis agités.
- Incubation pendant 2.5 mn à 25°C dans un bain marie.
- Lecture de la densité optique à un intervalle de temps de 25 min (lecture de la densité optique chaque 3 minutes) à 412 nm contre une solution blanche.

L'activité spécifique de l'acétylcholine est exprimée en nmol/min/mg de protéine d'après la formule suivante d'Ellman *et al.* (1961) :

$$x = \frac{\frac{\Delta DO/mn}{\epsilon} \times \frac{Vt}{Vs}}{mg \text{ de protéines}}$$

X : Micromole de substrat hydrolysé par **minute** et par mg de protéines ($\mu M/mn/mg$ de protéines).

ΔDo : Pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

ϵ : $1,36 \times 10^4$: Coefficient d'extinction molaire du DTNB ($M^{-1} cm^{-1}$).

Vt : Volume total dans la cuve : 1,3 ml [0,1 ml surnageant + 0,1 ml DTNB + 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 ml acétylthiocholine].

Vs : Volume du surnageant dans la cuve : 0,1 ml.

mg de protéines : Quantité de protéines exprimée en mg.

7.3 Dosage du Glutathione-S Transferase (GST)

Le Glutathione-S-transferase (GST) est une enzyme clé de désintoxication de phase II qui contribue activement aux défenses antioxydantes en catalysant la conjugaison du glutathion avec divers substrats électrophiles, facilitant ainsi leur excrétion. Des études récentes soulignent son rôle essentiel dans les processus de détoxification et de protection contre le stress oxydatif (Brassea-Pérez *et al.*, 2025). L'évaluation de l'activité de la GST repose sur l'utilisation d'un substrat spécifique : le chlorodinitrobenzène (CDNB), qui interagit efficacement avec l'enzyme Glutathione S-transferase (GST), ce qui produit une molécule qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm. Le protocole de dosage de la GST a été effectué selon la méthode décrite par Habig *et al.*, 1974, au niveau de l'hépatopancréas. Les détails relatifs à la composition et à la préparation des réactifs nécessaires sont présentés dans l'**Annexe 3**.

Les étapes du dosage de l'activité spécifique du Glutathione - S transferase :

- Incuber dans un bain marie le tampon phosphate et les 2 solutions CDNB et GSH à une température de 37 °C.
- Introduire dans une cuve en quartz, 840 µl du tampon phosphate, 50 µl de la solution CDNB et 10 µl du surnageant.
- Mélanger puis ajouter 100 µl de la solution GSH.
- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée remplaçant le surnageant, la densité optique est mesurée toutes les minutes durant 5 minutes à une longueur d'onde $\lambda = 340$ nm.
- La quantité en GST est exprimée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon et ainsi exprimée en $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ de protéines.

L'activité spécifique de l'enzyme est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$AS = \frac{(\Delta DO/\text{min}) \times Vt \times F}{\epsilon \times L \times Vs \times Cp}$$

AS : Activité spécifique (nmol formé/minute/mg de protéines.
 $\Delta DO/\text{min}$: Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.
Vt : Volume total où est réalisée la mesure (Vt = 1000 µl).
Vs : Volume du surnageant.
F : Facteur de dilution.
 ϵ : Coefficient d'extinction molaire du CDNB ($\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
L : Longueur de la cuve utilisé (L = 1 cm).
 $C_{\text{protéines}}$: Concentration des protéines (mg/L).

7.4 Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

La catalase est une enzyme peroxysomale essentielle qui joue un rôle clé dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs en convertissant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène moléculaire (O_2) (Piacentini et al., 2024). Le dosage de l'activité spécifique de la catalase a été réalisé selon la méthode décrite par Saint-Denis et al., 1998, cette enzyme permet la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire, l'activité de la CAT est mesurée par le suivi de la variation de la densité optique consécutive à la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Baumard et al., 1999). La composition et la préparation des produits nécessaires au dosage sont représentées dans l'Annexe 4.

Les étapes du dosage de l'activité spécifique de la CAT sont comme suit :

- Remplir la cuve en quartz avec 990 μl du tampon phosphate ;
- Ajouter 500 μl d' H_2O_2 à 5 % ;
- Ajouter 10 μl du surnageant ;
- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate remplaçant le surnageant, la densité optique est mesurée toutes les 15 secondes durant 1 min à une longueur d'onde $\lambda = 240$ nm ;
- L'activité spécifique de la CAT est exprimée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines).

Elle est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$AS = \frac{\Delta DO/\text{min} \times Vt \times F}{\epsilon \times L \times Vs \times Cp}$	<p>AS : Activité spécifique (μmol formé/minute/mg de protéines).</p> <p>$\Delta DO/\text{min}$: Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.</p> <p>Vt : Volume total où est réalisée la mesure ($Vt = 1500 \mu\text{l}$).</p> <p>Vs : Volume du surnageant.</p> <p>F : Facteur de dilution.</p> <p>ϵ : Coefficient d'extinction molaire de l'H_2O_2 ($\epsilon = -0,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).</p> <p>L : Longueur de la cuve utilisé ($L = 1 \text{ cm}$).</p> <p>$C_{\text{protéines}}$: Concentration des protéines (mg/L).</p>
--	---

7.5 Dosage du glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion réduit (GSH) a été réalisé selon une méthode spectrophotométrique décrite par [Weckbecker et Cory \(1988\)](#), au niveau de l'hépatopancréas. La réaction est fondée sur l'interaction entre le groupement thiol libre ($-\text{SH}$) du GSH avec l'acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque acid) (DTNB). Cette réaction redox conduit à la formation du 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), un composé chromogène de couleur jaune dont l'intensité d'absorbance, mesurée à 412 nm, est proportionnelle à la concentration initiale en GSH dans le milieu réactionnel. Cette technique a été récemment validée pour des applications cellulaires et tissulaires en bioanalyse, et reste une référence pour l'évaluation du stress oxydatif cellulaire ([Reginald-Opara et al., 2019](#)).

La composition des réactifs et les conditions expérimentales associées à cette méthode sont présentées dans l'**Annexe 5**. Le mode opératoire s'applique comme suit :

- Prélever 0,8 ml du surnageant et de la gamme étalon dans chacun dans un tube sec.
- Ajouter 0,2 ml de la solution d'acide sulfosalicylique à 4 %.
- Homogénéiser puis laisser reposer dans de la glace pendant 15 min.
- Centrifuger à 10000 tours /min pendant 5 min à 0 °C.
- Prélever 0,5 ml du surnageant.
- Ajouter 1 ml du tampon Tris-HCl à l'EDTA.
- Mélanger puis ajouter 25 µl du réactif d'Ellman à 10 mM.
- Laisser agir 5 min puis mesurer l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 412$ nm.
- Tracer le droit étalon : Absorbance = f (Concentration en GSH).
- A partir des résultats obtenus sur la gamme étalon du GSH chacun des échantillons est alors déduite en tenant compte du facteur de dilution initial.

La quantité en GSH est exprimée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon et ainsi exprimée en µmol /mg de protéines, elle est déterminée selon la formule suivante :

$$GSH = \frac{Do \times Vt \times D}{Vs \times \epsilon \times Prt}$$

GSH: Quantité de glutathion réduit (**µmol /g de protéine ou bien µmol/g de tissu**)

DO : Densité optique de l'échantillon

Vt : Volume total utilisé (**µl**)

D : Facture de dilution

Vs : Volume du surnageant (**µl**)

ε : Coefficient d'extinction molaire du glutathion (**L·mol⁻¹·cm⁻¹**)

Prt : Quantité en protéine contenu dans le surnageant (**g**)

7.6 Dosage de Malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est le major produit de la dégradation des lipides polyinsaturés et constitue un biomarqueur couramment utilisé pour évaluer la peroxydation lipidique. Lorsqu'il réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), un complexe de couleur rose se forme, dont l'intensité peut être quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 532 nm. Une augmentation de la production de MDA dans les tissus, résultant du stress oxydatif, se manifeste par une élévation de la formation de ce complexe coloré (Uzma *et al.*, 2014). Le niveau de la peroxydation lipidique a été évalué selon la méthode décrite par Uchiyama *et Mihara* (1978), au niveau de l'hépatopancréas. La composition détaillée et la préparation des réactifs nécessaires au dosage sont présentées dans l'**Annexe 6**.

Le dosage est réalisé sur les échantillons ainsi que sur la gamme étalon en suivant le mode opératoire suivant :

- Prélever 3 ml d'acide phosphorique à 1 % ;
- Ajouter 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,6 % ;
- Incorporer Ajouter 0,5 ml de l'échantillon à doser ;
- Mélanger puis porter à ébullition à 100°C dans un bain-marie pendant 45 min ;
- Laisser refroidir, puis ajouter 4 ml de butanol ;
- Mélanger la solution puis centrifuger à 1000 g pendant 10 minutes ;
- Mesurer l'absorbance a une longueur d'onde de $\lambda = 532$ nm ;
- Tracer le courbe étalon en établissant la relation entre l'absorbance et la concentration en MDA ;
- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant le surnageant par du tampon KCl à 1,15 %.

La quantité de MDA (nmol MDA / mg protéine) se calcule comme suite :

$$MDA = \frac{Do \times 10^6}{\epsilon \times L \times X \times Fd}$$

DO : Densité optique lue à 530 nm.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

L : Longueur du trajet optique = 0.779 cm.

X : Concentration de l'extrait en protéines (mg/ml).

Fd : Facteur de dilution, $Fd = 0.2083$.

7.7 Extraction et dosage des vitellines

La vitelline est considérée comme un biomarqueur sensible d'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE) (Tyler *et al.*, 2021; Kime *et al.*, 2020). L'extraction des vitellines est réalisée selon la méthode de Fabre *et al.* (1990) au niveau de l'ovaire des femelles adultes provenant des différents lots traités et témoins. Les échantillons biologiques, conservés dans 500µl de tampon d'extraction Tris-HCl-NaCl (pH 7,4), sont broyés aux ultrasons puis l'homogénat obtenu est ensuite centrifugé (5000 tours/min pendant 10 minutes). Après centrifugation, trois couches distinctes sont visibles et une seule couche intermédiaire contient les vitellogénines ou les vitelline est récupérée à l'aide d'une seringue (**Figure 24**), transférée dans un tube Eppendorf, puis tous les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'au dosage. La préparation des solutions et la gamme d'étalonnage sont représentées dans l'**Annexe 7**.

La quantification des vitellines chez *G. affinis* a été réalisée selon la méthode de Bradford (1976), qui repose sur la liaison des protéines au colorant Coomassie Brilliant Blue (CBB), entraînant une variation de l'absorbance mesurable par spectrophotométrie. Le dosage a été effectué sur une fraction aliquote de 100 µl de la couche intermédiaire, y additionner 4 ml de BBC, bien agiter puis passer à la lecture des densités optiques au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme (**Annexe 8**). Les résultats sont exprimés en µg/mg d'ovocytes

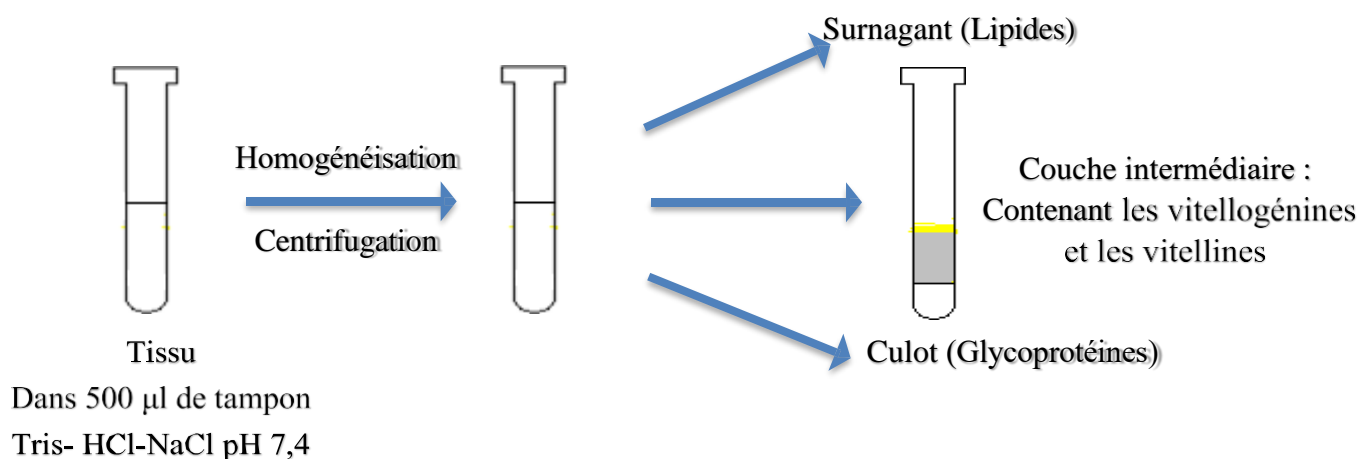


Figure 24. Extraction des vitellogénines et vitellines Fabre *et al.* (1990)

7.8 Dosage des protéines

La quantification des protéines a été faite selon [Bradford \(1976\)](#) sur une fraction aliquote de 0.1 ml de l'homogénat, avec le bleu brillant de coomassie (BBC) (G250, Merck), Ce réactif rouge/brun à l'état libre, prend une couleur bleue quand il est lié aux protéines. L'albumine de sérum de bœuf (Sigma, France) a été utilisée comme standard les absorbances ont été lues à une longueur d'onde de 595 nm, et la gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution d'albumine à 1 mg/ml. La composition et la préparation du réactif nécessaire au dosage des protéines sont représentées dans l'**Annexe 8**.

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de protéines standard sous forme d'albumine de sérum bovin (BSA). Des dilutions préalables peuvent être requises afin que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises dans l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme étalon. Le protocole s'applique aussi bien aux échantillons qu'à la gamme étalon, selon les étapes suivantes :

- Prélever 100 µl de l'échantillon à doser ;
- Ajouter 5 ml du réactif protéique ;
- Mélanger au vortex puis laisser reposer 5 min ;
- Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 595$ nm ;
- Tracer la droite étalon : Absorbance = f (concentration en protéines) ;
- A partir des résultats obtenus sur la gamme étalon de BSA, chacun des échantillons est alors déduit en tenant compte du facteur de dilution initial.
- La quantité en protéines obtenues est exprimée mg/ml. La représentation graphique de la courbe d'étalonnage est représentée dans l'**Annexe 8**.

8. Etude des réserves énergétique des gonades

L'extraction des métabolites des gonades a été réalisée selon le procédé de [Shibko et al., 1966](#). Les gonades ont été broyées dans 500 µl de TCA (20%) à l'aide d'un homogénéiseur à ultrasons et centrifugés (5000 trs/min pendant 10min). Le culot I additionné de 500 µl d'un mélange éther/ chloroforme (v/v, 1/1) a subi une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment afin de récupérer le surnageant II, qui sera utilisé pour l'analyse

quantitative des lipides, le culot II dissout dans 500 μ l de soude (0.1N), permettra la quantification des protéines totales (**Figure 25**).

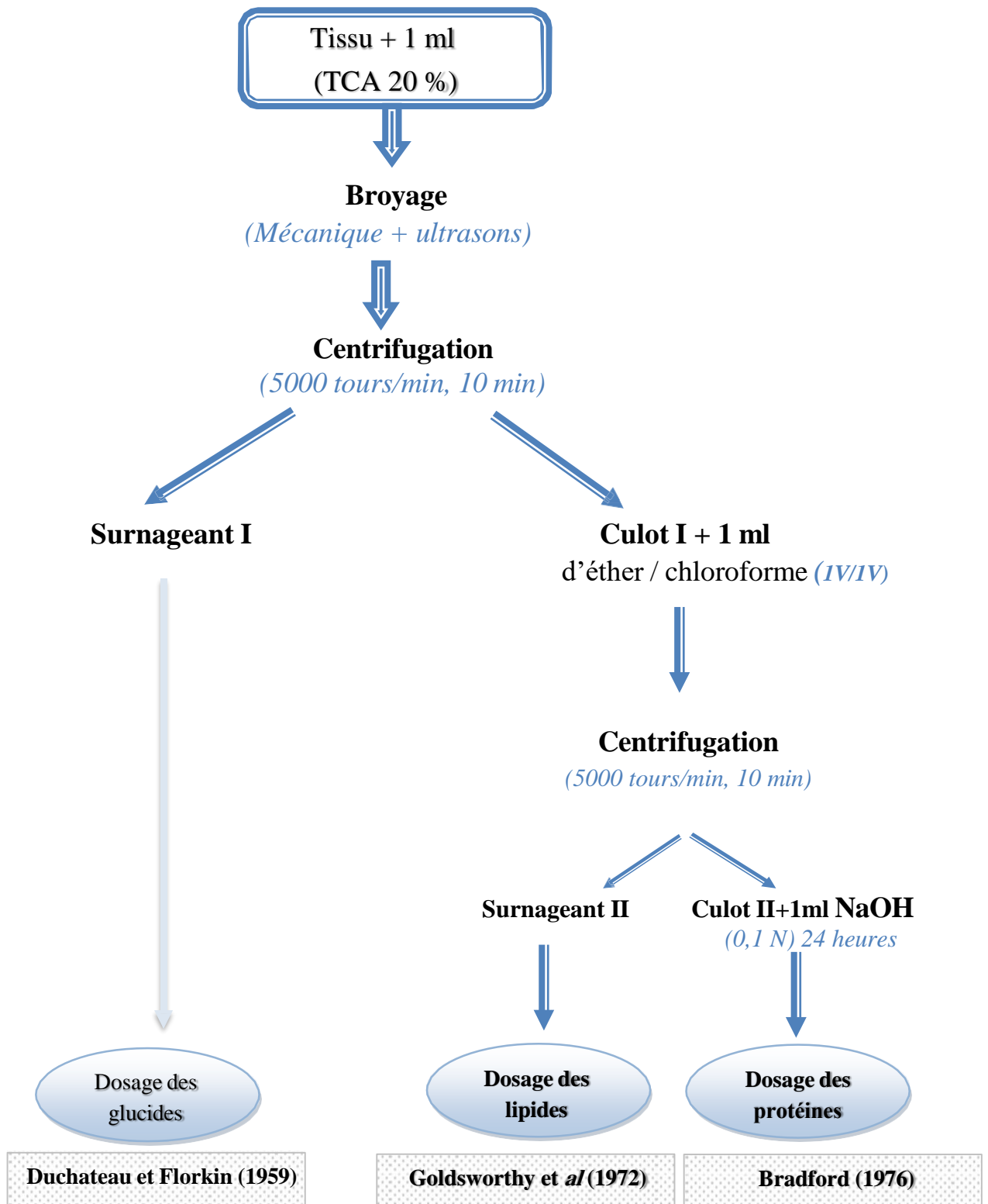


Figure 25. Principales étapes d'extraction des métabolites : protéines, glucides, lipides (Shibko *et al.*, 1966)

8.1 Dosage des lipides totaux

La concentration des lipides totaux a été estimée selon [Glodsworthy et al., 1972](#) utilisant la vanilline comme réactif (0,38 g de vanilline, 55 ml d'eau distillée et 195 ml d'acide orthophosphorique à 85 %). La solution mère des lipides est préparée en utilisant l'huile de tournesol qui contient plus de 99 % de triglycérides selon la procédure suivante : 25 mg d'huile de table pesés dans un tube eppendorf ; cette quantité est ensuite reprise dans 10 ml du mélange (éther / chloroforme) (V/V) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Dosage des lipides totaux : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de la solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant Ether/Chloroforme (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif de vanilline (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

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

8.2 Dosage des protéines totales

La quantification des protéines a été réalisée selon la méthode de [Bradford \(1976\)](#) utilisant le bleu brillant de coumassie (G250, Merck) comme réactif (100 mg BBC ,50 ml d'éthanol absolu 95°, 100 ml d'acide orthophosphorique à 85% complété à 1000 ml par de l'eau distillée) sa durée de conservation est de 2 à 3 semaines à 4°C, et l'albumine de sérum de bœuf (BSA, Sigma) comme protéine standard à 1mg/ml (**Tableau 5**).

Tableau 5: Réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des protéines.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution (BSA) d'albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Une fraction aliquote de 100µl de la gamme et de l'extrait protéique de chaque échantillon est additionnée de 4ml de réactif BBC. Après agitation, il se développe une coloration bleue dont les absorbances sont lues dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm contre un blanc de gamme.

9. Etude histologique

Les testicules prélevés sont immédiatement conservés dans une solution de formol à 10 %, un fixateur couramment utilisé en histologie pour préserver la structure tissulaire et prévenir la dégradation des échantillons biologiques. Cette fixation permet de maintenir la morphologie des tissus, garantissant ainsi leur intégrité pour une observation détaillée au microscope. Le formol agit en stabilisant les protéines et en rendant les tissus plus durables pour les étapes ultérieures de traitement. Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie pathologique (NIHA) Annaba.

La technique utilisée pour le traitement des échantillons est celle décrite par [Houlot \(1984\)](#). Cette méthode inclut plusieurs étapes précises, telles que l'inclusion des tissus dans de la paraffine fondue après fixation, leur découpe en sections très fines à l'aide d'un microtome, et leur montage sur des lames pour les préparer à l'observation au microscope. Les coupes ainsi obtenues sont ensuite colorées, généralement avec des colorants comme l'hématoxyline-éosine, pour permettre une différenciation claire des différentes structures tissulaires :

- Fixation : la fixation a pour but la conservation des structures. Elle s'effectue par immersion, en baignant les échantillons dans le formol (tranché en pièces) ;
- Déshydratation : la première étape de déshydratation consiste à remplacer l'eau présente dans les organes par de l'éthanol 100%, lequel sera ensuite substitué par du toluène qui lui-même sera remplacé par de la paraffine. Elle s'effectue par immersion dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (de 70°, 95°, jusqu'à l'éthanol absolu 100°) ;
- Inclusion en paraffine des tissus : Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. En effet les tissus sont inclus dans des blocs de paraffine. Des tranches de section de 2 à 5 µm d'épaisseur seront ensuite réalisées grâce à un microtome qui permet de trancher le bloc à l'épaisseur désirée ;
- Déparaffinage : il consiste à éliminer la paraffine, les lames sont placées sur une plaque chauffante (à 45-60°C) pendant 15 min, afin d'obtenir la liquéfaction et donc l'élimination de la paraffine ;
- Réhydratation : en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool 50°), puis dans l'eau distillée ;
- Coloration avec la combinaison entre deux colorants hématoxyline et éosine (HE) Pour la coloration, on a utilisé la technique à l'Hématoxyline-Eosine (ou Hématoéine - Eosine) qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 ml d'alcool éthylique à 70% + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 ml d'eau distillée + 2 ml d'ammoniaque) et solution d'Eosine ;
- La coloration suit les étapes ci-dessous : déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée. Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux) ;
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ;
- Déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope ;
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale ;
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme) ;
- Observation au microscope optique doté d'un appareil photographique.

10. Etude statistique

L'analyse statistique a été réalisée afin de comparer les données obtenues au cours de l'étude des approches expérimentales. Chaque donnée représente la moyenne de cinq répétitions indépendantes (quintuplicata), exprimée sous la forme de : Moyenne \pm Erreur type ($M \pm SEM$).

Moyenne (M) : Représente la valeur moyenne de l'ensemble des données collectées. Elle est calculée selon la formule suivante :
$$M = \sum x / n$$

x = valeur individuelle du paramètre étudié, n = nombre total de répétitions (ici $n = 5$).

Erreur type (SEM) : Mesure de la précision de l'estimation de la moyenne, calculée selon la formule :

$$SEM = \text{Ecart Type} / \sqrt{n}$$

n = nombre de répétitions (quintuplicata).

Les résultats sont traités en utilisant plusieurs tests statistiques, notamment la régression linéaire et l'analyse de la variance (ANOVA) pour évaluer les tests de la toxicité. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 9. Afin de comparer les différentes séries (témoins et traités) dans les études biométriques et enzymatiques, une ANOVA à deux facteurs (temps et traitement) avec leurs interactions a été effectuée, suivie d'un test post-hoc de Tukey pour effectuer des comparaisons multiples des valeurs moyennes et identifier les différences significatives. Par ailleurs, le test de Kruskal-Wallis, accompagné du test post-hoc de Dunn, a permis d'analyser les variations des paramètres étudiés entre les deux sexes (mâles et femelles) pour chaque paramètre spécifique. Une comparaison pairwise entre les deux séries traitées (CL₂₅ et CL₅₀) a été réalisée à l'aide du test de Mann-Whitney, afin de déterminer les différences significatives au sein de chaque paramètre étudié au cours des différentes périodes d'exposition.

La différence est considérée comme statistiquement significative lorsque $P < 0,05$ (*), hautement significative lorsque $P < 0,01$ (**), très hautement significative lorsque $P < 0,001$ (***), et extrêmement significative lorsque $P < 0,0001$ (****), conformément aux normes actuelles en analyse statistique (GraphPad Prism 9, version 9.00, GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

Résultats

II. RESULTATS

1. Toxicité aigüe du Bisphénol A

1.1 Toxicité a l'égard des adultes femelles

La toxicité aigüe du bisphénol A a été évaluée selon une série de concentrations croissantes (5, 10, 15, 20, 25 et 30 mg/L) qui ont été sélectionnées en se basant sur des tests préliminaires. Les observations effectuées réparties sur une période continue de 96 heures sur des intervalles de 24, 48, 72 et 96 heures. La mortalité observée correspond directement à la mortalité corrigée, étant donné que l'absence de mortalité naturelle constatée chez la série témoin permet d'exclure tout ajustement par rapport à un taux de mortalité de base.

Les taux de mortalités corrigées illustrent une réponse dose-dépendante au BPA en fonction de la concentration appliquée et de la durée de l'exposition. Le test HSD de Tukey, après transformation angulaire des données, a révélé cinq groupes significativement distincts. Aux expositions courtes de 15 heures, les concentrations faibles de 15 mg/L ($13,33 \pm 3,33$ %, groupe A) et 20 mg/L ($23,33 \pm 3,33$ %, groupe A) entraînent de faibles mortalités corrigées. En revanche, des concentrations plus élevées de 25 mg/L ($66,67 \pm 8,83$ %, groupe D) et 30 mg/L ($76,67 \pm 3,33$ %, groupe E) provoquent des mortalités significatives. Pour une exposition de 48 heures, la toxicité augmente progressivement avec la concentration : 15 mg/L ($36,67 \pm 8,83$ %, groupe B), 20 mg/L ($46,67 \pm 6,68$ %, groupe C) et 25 mg/L ($80,00 \pm 5,78$ %, groupe E). Lorsqu'on prolonge l'exposition à 72 heures, une concentration de 15 mg/L entraîne une mortalité corrigée de $60,00 \pm 5,78$ % (groupe D), tandis que des concentrations de 20 mg/L ($70,00 \pm 5,78$ %, groupe D) et 25 mg/L ($90,00 \pm 5,78$ %, groupe E) entraînent une toxicité sévère. Après 96 heures d'exposition, les concentrations de 10 mg/L, 15 mg/L et 20 mg/L provoquent des mortalités corrigées croissantes de $46,67 \pm 3,33$ % (groupe C), $73,33 \pm 8,83$ % (groupe E) et $83,33 \pm 3,33$ % (groupe E) respectivement, caractérisées par une toxicité extrêmement élevée (**Tableau 6**).

Ces résultats confirment que les concentrations élevées de BPA (≥ 20 mg/L) provoquent une mortalité sévère et rapide, notamment sur des périodes prolongées (≥ 72 heures). En revanche, les concentrations plus faibles (5 à 10 mg/L) n'induisent des effets toxiques notables qu'après une exposition prolongée, ce qui reflète un effet cumulatif (**Figure 26**).

Tableau 6: Toxicité du bisphénol A (mg/L) à l'égard des adultes femelles de *G. affinis* après une exposition de 96h : mortalité corrigées (%), mortalité Transformé (%), Probits et une analyse statistique (test de Tukey HSD) : (moyenne ± SEM ; trois répétitions pour chaque oncentration, comportant chacune 10 individus).

<i>Temps d'exposition (h)</i>	<i>Concentrations BPA (mg/L)</i>	<i>Mortalité corrigée (%)</i>	<i>Mortalité Transformé (%)</i>	<i>Probits</i>	<i>Groupes statistiques (Tukey HSD)</i>
24	15	13,33 ± 3,33	21,14 ± 2,72	3,8877	A
	20	23,33 ± 3,33	28,78 ± 2,21	4,271	A
	25	66,67 ± 8,83	55,07 ± 5,39	5,4289	D
	30	76,67 ± 3,33	61,22 ± 2,21	5,7257	E
48	10	13,33 ± 3,33	21,14 ± 2,71	3,8877	A
	15	36,67 ± 8,83	36,93 ± 5,45	4,6575	B
	20	46,67 ± 6,68	45,08 ± 5,86	4,9147	C
	25	80,00 ± 5,78	63,93 ± 4,28	5,8416	E
72	10	36,67 ± 3,33	37,22 ± 2,01	4,6575	B
	15	60,00 ± 5,78	50,85 ± 3,41	5,2533	D
	20	70,00 ± 5,78	56,70 ± 3,66	5,5244	D
	25	90,00 ± 5,78	73,09 ± 6,06	6,2816	E
96	5	13,33 ± 3,33	21,14 ± 2,72	3,8877	A
	10	46,67 ± 3,33	43,08 ± 1,92	4,9147	C
	15	73,33 ± 8,83	59,71 ± 6,18	5,6219	E
	20	83,33 ± 3,33	66,14 ± 2,72	6,9661	E

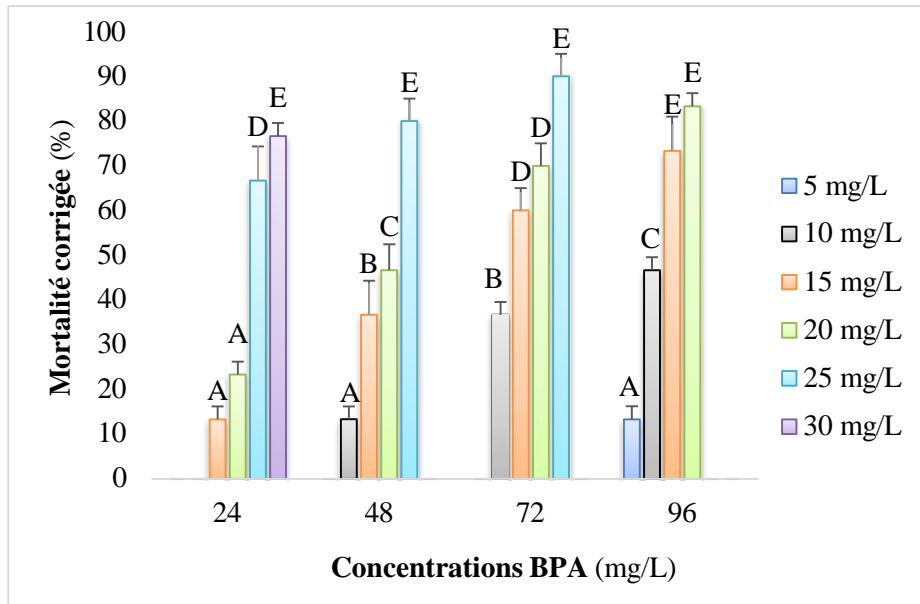


Figure 26. Toxicité du bisphénol A (mg/L), à l’égard des adultes femelles de *G. affinis* après une exposition de 96h : Mortalité corrigée et classification des concentrations selon le test HSD de Tukey.

La courbe dose-réponse (concentration-effet), exprimant les mortalités corrigées en fonction du logarithme des concentrations de BPA (**Figure 27**), a permis d'estimer les concentrations létales (CL_{25} , CL_{50} , CL_{90}) et leurs intervalles de confiance à 95 %, ainsi que la pente de Hill. Les régressions linéaires montrent une toxicité croissante du BPA avec l'augmentation du temps d'exposition, illustrée par la diminution progressive des valeurs de CL_{25} , CL_{50} et CL_{90} . Cela suggère que l'exposition prolongée augmente la toxicité du BPA, rendant les concentrations initialement tolérables létales. La pente de Hill indique une sensibilité accrue des femelles adultes de *G. affinis* au BPA en fonction du le temps.

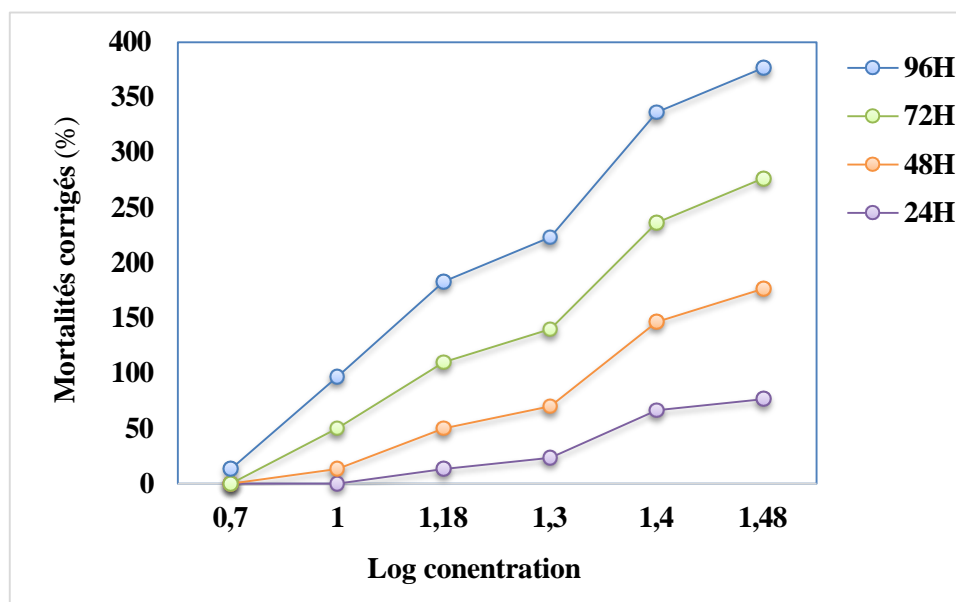


Figure 27. Courbe dose-réponse (concentration-effet), exprimant le pourcentage de mortalité corrigée chez les femelles adultes de *G. affinis* en fonction du logarithme de concentrations de BPA.

Les concentrations létales correspondant à 25 % et 50 % de mortalité après 96 heures ($CL_{25}/96h$ et $CL_{50}/96h$) ont été déterminées à 6,81 mg/L et 9,37 mg/L respectivement (**Tableau 7**). L'analyse statistique des données transformées montre un effet de concentration extrêmement significatif ($p < 0,001$).

Tableau 7: Toxicité du bisphénol A (mg/L) après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h à l'égard des adultes femelles de *G. affinis* : analyse des probits de la CL_{25} , CL_{50} et CL_{90} (IC : intervalle de confiance).

Temps (Heures)	Droite de régression	Slope	CL_{25} IC (95%)	CL_{50} IC (95%)	CL_{90} IC (95%)
24	$y = 6,6361x - 4,0641$	1,23	19,11 [11,49 – 23,59]	23,32 [19,17 – 28,99]	34,72 [24,94 – 40,93]
48	$y = 4,5391x - 0,7123$	1,65	13,33 [3,23 – 19,26]	18,59 [13,01 – 32,51]	36,17 [22,23 – 40,98]
72	$y = 3,8047x + 0,7875$	1,82	8,18 [2,27 – 11,73]	12,76 [7,59 – 16,1]	31,01 [20 – 119,5]
96	$y = 4,7621x + 0,3712$	1,62	6,81 [6,24 – 11,05]	9,37 [7,94 – 11,05]	24,5 [22,13 – 27,47]

L'étude du taux de mortalité et de survie à l'égard des femelles adultes de *Gambusia affinis* montre une relation dose-dépendante et temps-dépendante. Les résultats révèlent que l'augmentation de la concentration de BPA et de la durée d'exposition (24h, 48h, 72h, 96h) entraîne un taux mortalité croissant (**Figure 28**), particulièrement marquée aux concentrations élevées (25 mg/L, 30 mg/L) où la mortalité atteint près de 100 % après 96 heures.

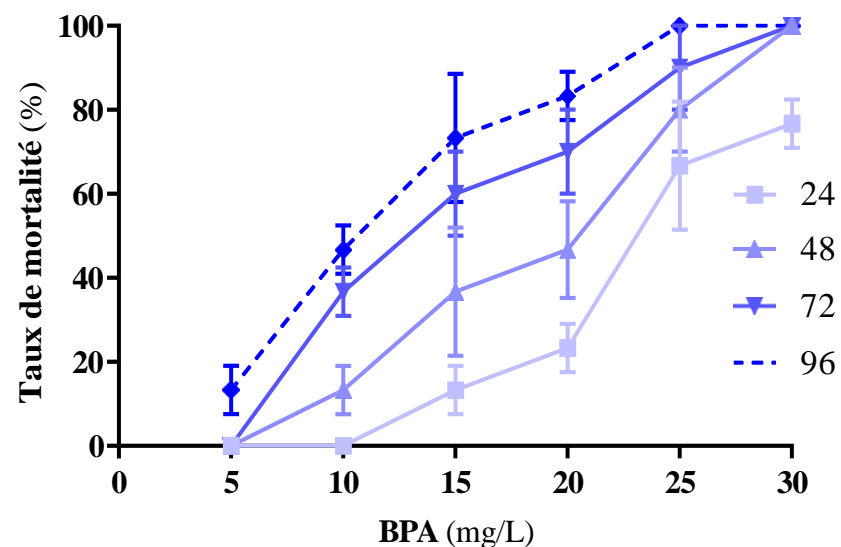


Figure 28. Taux de mortalité (%) des adultes femelles de *G. affinis* exposées au bisphénol A. Après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h
 *** Différence très hautement significative ($P < 0,001$)

En revanche, des concentrations faibles comme 5 mg/L montrent une mortalité minimale même après 96 heures d'exposition. Les courbes de survie (**Figure 29**) confirment que l'exposition prolongée au BPA amplifie ses effets toxiques, réduisant significativement la survie à mesure que la concentration et la durée d'exposition augmentent.

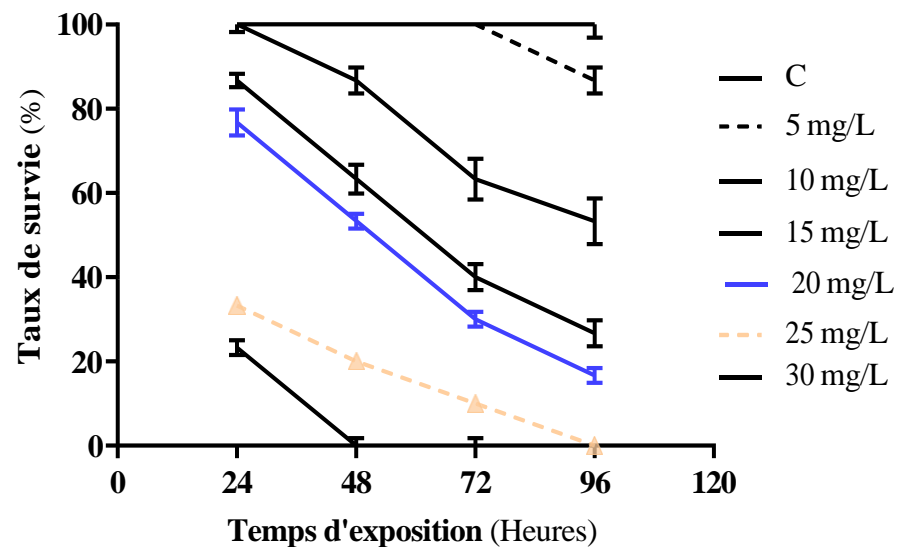


Figure 29. Taux de survie (%) des adultes femelles de *G. affinis* exposées au bisphénol A. Après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h
 *** Différence très hautement significative ($P < 0,001$)

1.2 Toxicité a l'égard des adultes mâles

L'exposition des adultes mâles au bisphénol A a été réalisée avec une gamme de concentrations croissantes (5, 10, 15, 20 et 25 mg/L), sélectionnées suite des tests préliminaires. La mortalité naturelle enregistrée à 24, 48, 72 et 96 heures a été directement ajustée pour la mortalité corrigée, car aucune mortalité naturelle n'a été observée chez la série témoin, permettant ainsi d'exclure tout ajustement lié à un taux de mortalité de référence.

Les données de mortalité corrigée et transformée montrent une réponse dose-dépendante et temporellement progressive au BPA (**Tableau 8**). À 24 heures d'exposition, les concentrations de 10 mg/L et 15 mg/L entraînent des mortalités faibles de ($33,33 \pm 3,33$ %, groupe A) et ($36,67 \pm 3,33$ %, groupe A) respectivement, tandis que les concentrations : 20 mg/L et 25 mg/L, provoquent des mortalités plus élevées : ($70,00 \pm 5,78$ %, groupe D) et ($83,33 \pm 3,33$ %, groupe E) respectivement. Après 48 heures d'exposition, la mortalité augmente avec la concentration de BPA : 15 mg/L ($43,33 \pm 6,68$ %, groupe B), 20 mg/L ($76,67 \pm 3,33$ %, groupe D), et 25 mg/L ($86,67 \pm 3,33$ %, groupe E), tandis que 5 mg/L ($30,00 \pm 5,78$ %, groupe B) provoque une mortalité modérée.

Au terme de 72 heures d'exposition, les concentrations de 20 mg/L et 25 mg/L génèrent des taux de mortalité plus élevés : ($93,33 \pm 3,33$ %, groupe E) et (100 %, groupe E) respectivement, tandis que 5 mg/L commence à enregistrer une mortalité modérée ($30,00 \pm 5,78$ %, groupe A). À 96 heures, la mortalité augmente davantage : 15 mg/L, 20 mg/L et 25 mg/L atteignant un seuil critique de mortalité : ($83,33 \pm 3,33$ %, groupe E), ($96,67 \pm 3,33$ %, groupe E) et (100 %, groupe E) respectivement. Les mortalités enregistrées pour les concentrations : 5 mg/L et 10 mg/L augmentent progressivement ($43,33 \pm 8,83$ %, groupe B) et ($83,33 \pm 3,33$ %, groupe D), cela reflète un effet cumulatif, suggérant qu'une faible dose peut devenir toxique au fil du temps. Ces résultats indiquent

Ces résultats montrent que les concentrations plus élevées de BPA entraînent une mortalité sévère à partir de 24 heures d'exposition, et que même des concentrations faibles de BPA peuvent entraîner une toxicité accrue si l'exposition se prolonge (**Figure 30**). En effet, à mesure que la concentration de BPA augmente, la mortalité corrigée augmente, les concentrations élevées (≥ 10 mg/L) entraînant des taux de mortalité plus importants dès 24 h d'exposition

Tableau 8 : Toxicité du bisphénol A (mg/L) à l'égard des adultes mâles de *G. affinis* après une exposition de 96h : mortalité corrigées (%), mortalité Transformé (%), Probits et une analyse statistique (test de Tukey HSD) : (moyenne ± SEM ; trois répétitions pour chaque concentration, comportant chacune 10 individus).

<i>Temps d'exposition (h)</i>	<i>Concentrations BPA (mg/L)</i>	<i>Mortalité corrigée (%)</i>	<i>Mortalité Transformé (%)</i>	<i>Probits</i>	<i>Groupes statistiques (Tukey HSD)</i>
24	10	33,33 ± 3,33	35,22 ± 1,64	4,5684	A
	15	36,67 ± 3,33	37,22 ± 1,64	4,6575	A
	20	70,00 ± 5,78	57,00 ± 2,99	5,5244	D
	25	83,33 ± 3,33	66,14 ± 2,26	5,9661	E
48	10	40,00 ± 5,78	39,15 ± 3,41	4,7467	B
	15	43,33 ± 6,68	41,07 ± 3,94	4,8313	B
	20	76,67 ± 3,33	61,21 ± 2,21	5,7257	D
	25	86,67 ± 3,33	68,86 ± 2,72	6,1077	E
72	5	30,00 ± 5,78	33,00 ± 3,66	4,8313	A
	10	50,00 ± 5,78	45,00 ± 3,33	5,000	C
	15	80,00 ± 5,78	63,93 ± 4,28	5,9661	E
	20	93,33 ± 3,33	75,8 ± 4,24	6,9661	E
96	5	43,33 ± 8,83	41,07 ± 5,16	4,4756	B
	10	60,00 ± 10,00	51,14 ± 6,15	5,2533	D
	15	83,33 ± 3,33	66,14 ± 2,72	5,8416	E
	20	96,67 ± 3,33	80,03 ± 4,24	6,8250	E

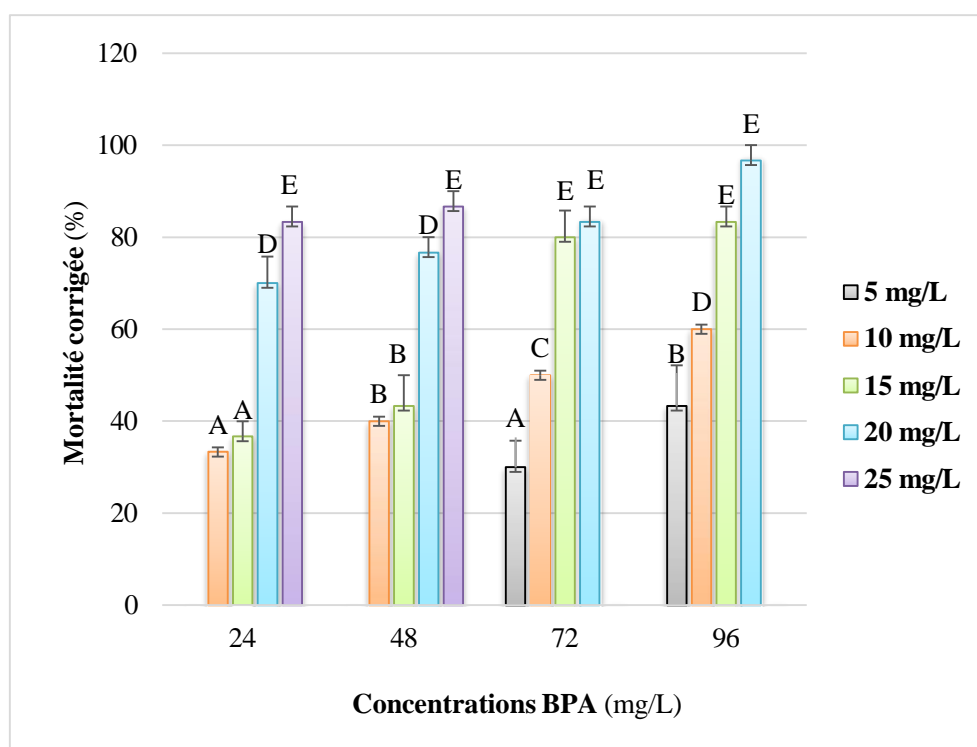


Figure 30. Toxicité du bisphénol A (mg/L), à l'égard des adultes mâles de *G. affinis* après une exposition de 96h : Mortalité corrigée et classification des concentrations selon le test HSD de Tukey.

La courbe dose-réponse (concentration-effet), représentant les mortalités corrigées chez les adultes mâles en fonction du logarithme des concentrations de BPA (**Figure 31**), a permis d'évaluer les concentrations létales (CL_{25} , CL_{50} et CL_{90}) ainsi que leurs intervalles de confiance à 95 %, et d'estimer la pente de Hill. Les régressions linéaires révèlent une augmentation progressive de la toxicité du BPA avec l'augmentation du temps d'exposition, comme le montre la réduction des valeurs de CL_{25} , CL_{50} et CL_{90} . Cela indique que l'effet toxique du BPA devient plus marqué à des concentrations plus faibles à mesure que la durée d'exposition augmente. La pente de Hill met en évidence une sensibilité accrue des mâles adultes de *G. affinis* au BPA, même à des concentrations relativement faibles, dès 24 heures d'exposition.

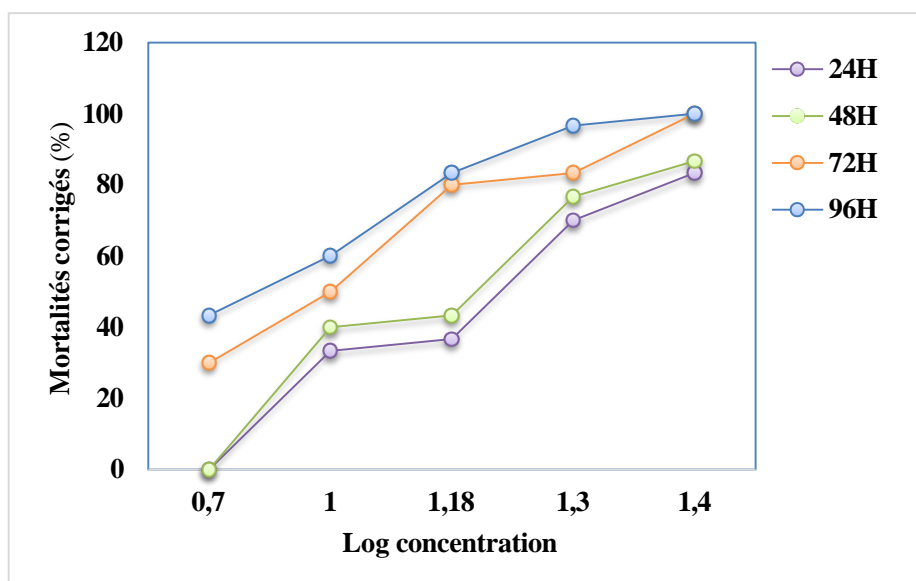


Figure 31. Courbe dose-réponse (concentration-effet), exprimant le pourcentage de mortalité corrigée chez les mâles adultes de *G. affinis* en fonction du logarithme de concentrations de BPA.

Les concentrations létales correspondant à 25 % et 50 % de mortalité après 96 heures ($CL_{25/96h}$ et $CL_{50/96h}$) ont été déterminées à 6,81 mg/L et 9,37 mg/L respectivement (**Tableau 9**). L'analyse statistique des données transformées montre un effet de concentration extrêmement significatif ($p < 0,001$).

Tableau 9: Toxicité du bisphénol A (mg/L) après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h à l'égard des adultes mâles de *G. affinis* : analyse des probits de la CL_{25} , CL_{50} et CL_{90} (IC : intervalle de confiance).

Temps (Heures)	Droite de régression	Slope	CL_{25} IC (95%)	CL_{50} IC (95%)	CL_{90} IC (95%)
24	$y = 3,6543x + 0,7209$	1,87	9,99 [7,57 – 12,64]	14,82 [12,67 – 17,34]	35,78 [28,41 – 38,89]
48	$y = 4,5391x - 0,7123$	1,89	8,52 [6,44 – 11,87]	13,49 [10,52 - 16,71]	30,77 [23,87 – 37,90]
72	$y = 3,8047x + 0,7875$	1,70	8,07 [5,23 – 10,98]	12,27 [10,16 – 14,81]	28,31 [20,08 – 29,29]
96	$y = 3,663x + 1,770$	1,87	4,74 [2,74 – 7,89]	7,74 [4,46 – 10,8]	20,55 [13,64 – 21,31]

Le taux de mortalité et de survie chez les mâles adultes de *Gambusia affinis* met en évidence une relation dose-dépendante et temps-dépendante. Les résultats indiquent qu'une augmentation de la concentration en BPA ainsi que de la durée d'exposition (24h, 48h, 72h, 96h) entraîne un taux de mortalité croissant (Figure 32), à des concentrations modérées (≥ 10 mg/L), où la mortalité atteint presque 100 % après 72 heures d'exposition.

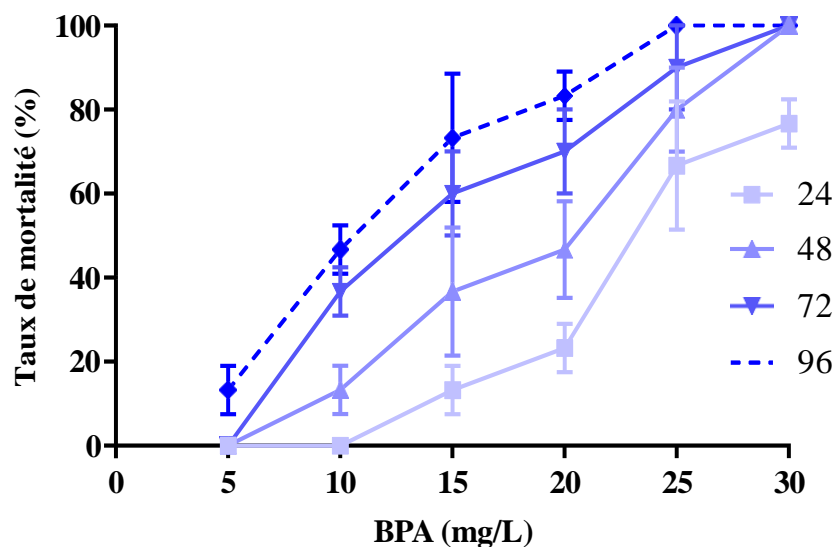


Figure 32. Taux de mortalité (%) des adultes mâles de *G. affinis* exposés au bisphénol A. Après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h
 *** Différence très hautement significative ($P < 0,001$)

En revanche, le taux de survie des mâles adultes de *Gambusia affinis* (Figure 33) diminue avec l'augmentation des concentrations de BPA. Les effets toxiques sont présents même à faible concentration et se manifestent de manière cumulative au fil du temps. Ainsi, même des concentrations modérées de BPA entraînent une réduction progressive du taux de survie, et la durée de l'exposition accentue ces effets, rendant des concentrations faibles potentiellement toxiques sur une période prolongée.

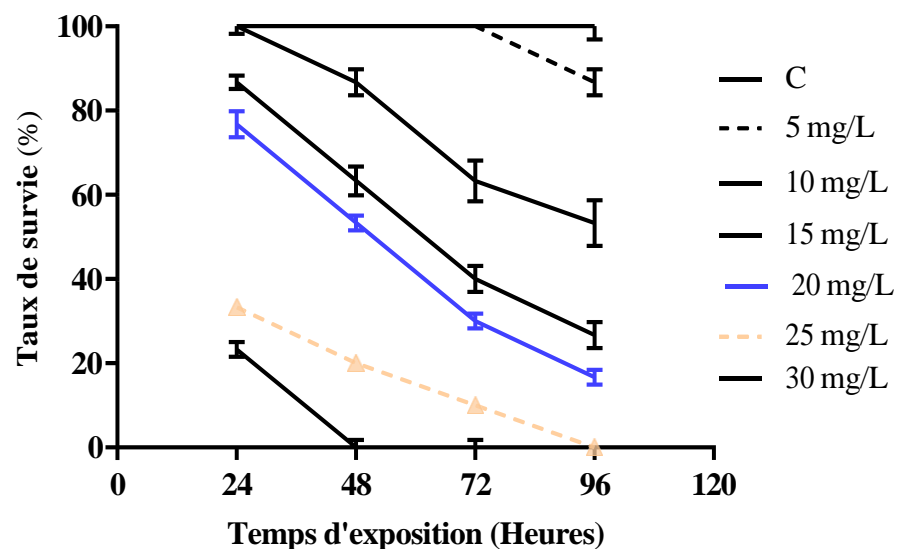


Figure 33. Taux de survie (%) des adultes mâles de *G. affinis* exposés au bisphénol A. Après une exposition de 24h, 48h, 72h et 96h
 *** Différence très hautement significative ($P < 0,001$)

2. Indices biométriques

2.1 Indice Gonado-Somatique IGS

2.1.1 Femelles de *Gambusia affinis*

La variation de l'indice Gonado-Somatique (IGS) (**Figure 34**) montre que l'exposition chronique au BPA affecte les femelles de *Gambusia affinis* traitées avec les concentrations CL₂₅ et CL₅₀. Durant la phase d'exposition, la série témoin suit une progression normale, commençant avec une valeur minimale de $21,48 \pm 1,38$ et atteignant une valeur maximale de $31,30 \pm 1,03$ au 60^e jour. En revanche, la comparaison des moyennes par le test de « tukey » indique une diminution très hautement significative de l'IGS chez les femelles exposées à CL₅₀ (9,37 mg/L) observée dès 72 heures d'exposition, avec une valeur de $15,19 \pm 1,71$. Pour celles traitées à CL₂₅ (6,81 mg/L), une diminution hautement significative de l'IGS est notée, atteignant $18,92 \pm 1,82$, et une diminution extrêmement significative est observée à la fin de l'exposition (60 jours), avec les valeurs de $12,42 \pm 1,72$ et $7,59 \pm 1,15$ pour les groupes CL₂₅ et CL₅₀ respectivement.

L'analyse de la variance (ANOVA) à deux critères de classification (Temps, Traitement) (**Tableau 10**) sur l'indice gonado-somatique (IGS) a montré des résultats significatifs pour les effets des deux facteurs temps et traitement et de leur interaction. L'effet du temps est très hautement significatif, avec un F observé de 9,0111 et une p-value de 0,0002 (P = 0,0002). L'effet du traitement est extrêmement significatif, avec un F observé de 99,428 et P < 0,0001. De plus, l'interaction entre le temps et le traitement est également extrêmement significative, avec un F observé de 10,505 et P < 0,0001.

Tableau 10: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice gonado-somatique (IGS) des femelles adultes de *G. affinis*.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
<i>Temps</i>	4	315,96	78,990	9,0111	0,0002 ***
<i>Traitement</i>	2	1708,8	854,42	99,428	0,0001****
<i>Interaction</i>	8	722,17	90,271	10,505	0,0001****
<i>Résiduelle</i>	40	343,73	8,5933		
Totale	54				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

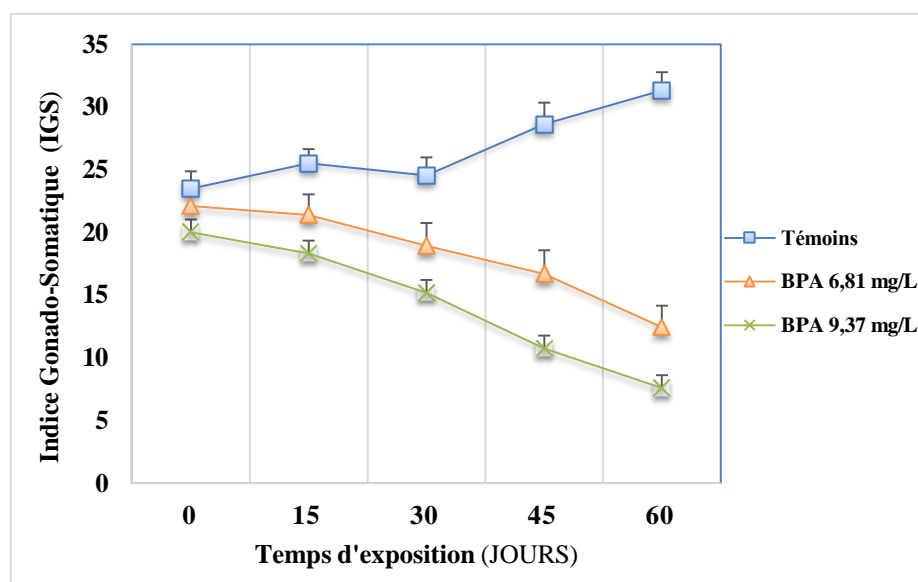


Figure 34. Variation de l'indice gonado-somatique (IGS) chez les femelles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ (6,81 mg/L) et CL₅₀ (9,37 mg/L) ; (Moyenne ± SEM ; n = 5).

2.1.2 Mâles de *Gambusia affinis*

L'indice gonado-somatique (IGS) des mâles de *Gambusia affinis* (**Figure 35**) présente une réduction extrêmement significative dès le 15^e jour d'exposition au bisphénol A (BPA). La comparaison des moyennes par le test de « tukey » révèle une valeur moyenne de $0,37 \pm 0,009$ est enregistrée chez les individus exposés à la concentration CL₅₀ (7,74 mg/L) avec une diminution hautement significative est également observée chez la série traitée à CL₂₅ (4,74 mg/L), dont la moyenne est $0,44 \pm 0,02$, contre $0,55 \pm 0,01$ chez les témoins. À la fin de la période expérimentale, soit au 60^e jour, l'IGS continue de réduire de manière extrêmement significative dans les deux groupes traités, atteignant $0,30 \pm 0,01$ pour la concentration CL₂₅ (4,74 mg/L) et $0,22 \pm 0,02$ pour la concentration CL₅₀ (7,74 mg/L).

L'analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs (Temps et Traitement) (**Tableau 11**) met en évidence des effets extrêmement significatifs sur l'indice gonado-somatique (IGS) des mâles de *Gambusia affinis*. L'effet du temps est particulièrement marqué, avec une valeur de $F = 39,772$ et $P < 0,0001$, indiquant une variation significative de l'IGS au fil de l'expérimentation. L'effet du traitement est également extrêmement significatif ($F = 129,05$; $P < 0,0001$). L'interaction entre le temps et le traitement présente elle aussi une significativité extrême ($F = 7,9725$; $P < 0,0001$), ce qui suggère que l'effet du BPA sur l'IGS dépend fortement de la durée d'exposition.

La comparaison des valeurs moyennes de l'indice gonado-somatique (IGS) entre les deux sexes (mâles et femelles) a été réalisée à l'aide du test de Kruskal-Wallis, suivi d'une analyse post-hoc de Dunn pour effectuer des comparaisons multiples. Les résultats montrent une différence hautement significative entre les deux sexes, avec une valeur de p inférieure à 0,0025, suggérant une différence notable dans l'indice gonado-somatique entre les mâles et les femelles.

Tableau 11: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice gonado-somatique (IGS) des mâles adultes de *G. affinis*.

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
<i>Temps</i>	4	0,25754	0,064385	39,772	0,0001****
<i>Traitement</i>	2	0,49706	0,24853	129,05	0,0001****
<i>Interaction</i>	8	0,025902	0,018716	7,9725	0,0001****
<i>Résiduelle</i>	32	0,075122	0,0023476		
<i>Totale</i>	44				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

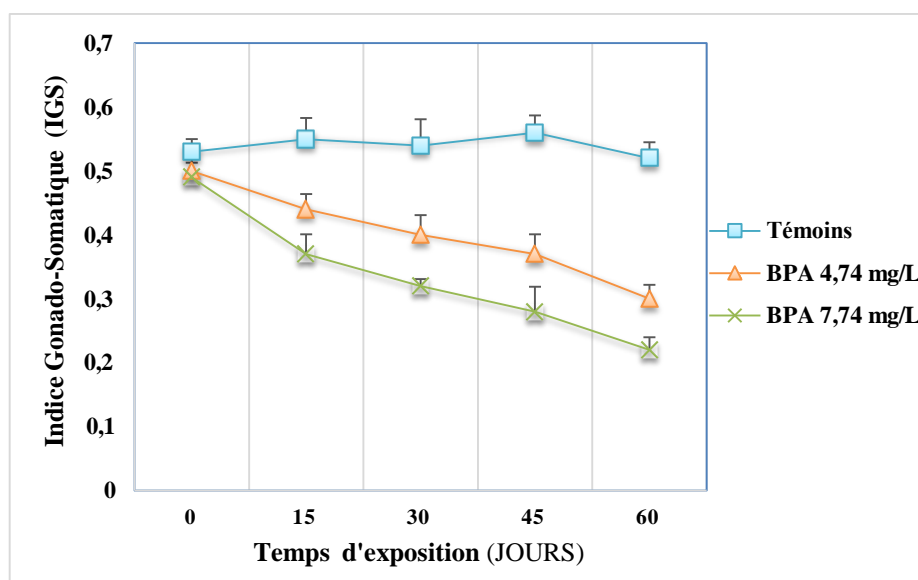


Figure 35. Variation de l'indice gonado-somatique (IGS) chez les mâles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ (4,74 mg/L) et CL₅₀ (7,74 mg/L) ; (Moyenne ± SEM ; n = 5)

2.2 Indice Hépat-Somatique (IHS)

2.2.1 Femelles de *Gambusia affinis*

La variation de l'indice hépat-somatique (IHS) chez les femelles de *Gambusia affinis* (**Figure 36**), après une exposition chronique au bisphénol A à deux concentrations (CL_{25} : 6,81 mg/L et CL_{50} : 9,37 mg/L), la comparaison des moyennes par le test de « tukey » n'indique aucune différence statistiquement significative entre les séries témoins et les séries traités durant les 30 premiers jours d'exposition.

Après 45 jours d'exposition, une augmentation significative de l'indice hépat-somatique (IHS) a été constatée chez les femelles exposées à la concentration CL_{50} (9,37 mg/L), passant d'une valeur de $0,24 \pm 0,02$ chez la série témoin à $0,37 \pm 0,01$ chez les individus traités ($p = 0,0215$). À 60 jours, l'IHS a poursuivi son élévation, avec une augmentation significative observée chez la série exposée à la CL_{25} (6,81 mg/L), avec une hausse extrêmement significative chez la série exposée à la CL_{50} ($p < 0,0001$).

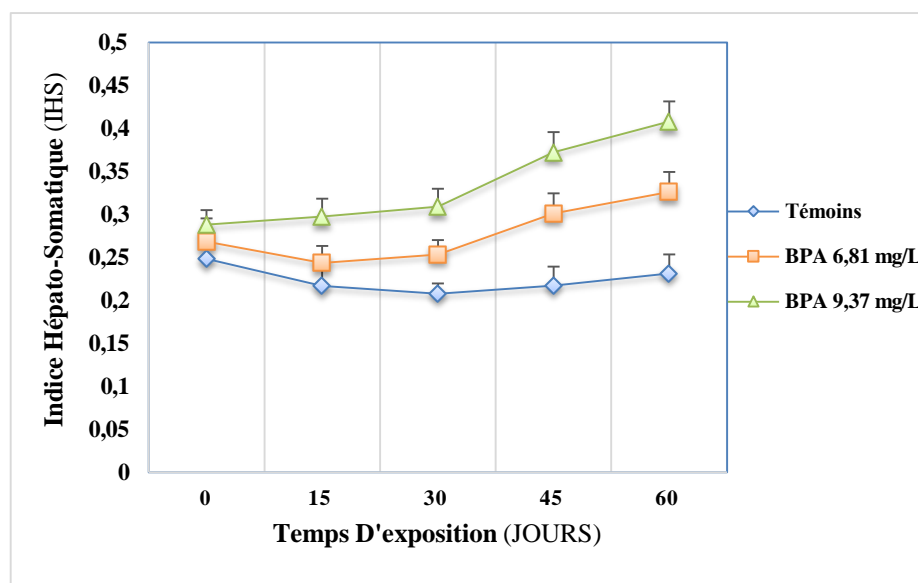


Figure 36. Variation de l'indice hépat-somatique (IHS) chez les femelles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL_{25} (6,81 mg/L) et CL_{50} (9,37 mg/L), (Moyenne \pm SEM ; $n = 5$).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (**Tableau 12**), appliquée sur l'indice hépato-somatique (IHS) chez les femelles adultes de *Gambusia affinis* suite à une exposition chronique de 60 jours au BPA, a révélé des effets significatifs des deux variables indépendantes (temps et traitement), ainsi que leur interaction. L'effet temps d'exposition est statistiquement significatif ($F = 7,3629$; $p = 0,0154$) sur la variation de l'IHS ($F = 7,3629$; $p = 0,0154$). Le traitement, correspondant aux différentes concentrations de BPA administrées, a également produit un effet hautement significatif ($F = 5,7229$; $p = 0,0047$), suggérant une réponse dose-dépendante. Par ailleurs, l'interaction entre le temps et le traitement s'est révélée statistiquement significative ($F = 2,2802$; $p = 0,0468$).

Tableau 12: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice hépato-somatique (IHS) des femelles adultes de *G. affinis*.

<i>Source de variation</i>	<i>DDL</i>	<i>SCE</i>	<i>CM</i>	<i>Fobs</i>	<i>P</i>
<i>Temps</i>	4	0,1492	0,0373	7,3629	0,0154*
<i>Traitement</i>	2	0,1216	0,0608	5,7229	0,0047**
<i>Interaction</i>	8	0,1239	0,0154	2,2802	0,0468*
<i>Résiduelle</i>	32	0,2173	0,0067		
<i>Totale</i>	46				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

2.2.2 Mâles de *Gambusia affinis*

Chez les mâles adultes de *Gambusia affinis*, l'indice hépato-somatique (IHS) (**Figure 37**) révèle une variation significative dès le 15^e jour d'exposition au bisphénol A. La comparaison des moyennes par le test de « tukey » révèle une augmentation de l'IHS enregistrée chez les individus exposés à la concentration CL₅₀ (9,37 mg/L) $0,15 \pm 0,01$, avec une différence statistiquement significative par rapport au témoin $0,11 \pm 0,002$. Cette progression s'intensifie au 30^e jour, où une augmentation hautement significative est observée dans la série exposée au CL₅₀, atteignant une valeur moyenne de $0,20 \pm 0,01$, par rapport $0,12 \pm 0,01$ chez la série témoin, tandis que la différence avec la CL₂₅ : 6,81 mg/L reste non significative.

À 45 jours d'exposition, l'IHS présente une augmentation significative chez les poissons exposés à la concentration CL₂₅ (6,81 mg/L), avec une valeur moyenne de $0,21 \pm 0,06$, tandis qu'une élévation extrêmement significative est notée chez la série traitée à CL₅₀, atteignant $0,25 \pm 0,05$. La progression se poursuit jusqu'au 60^e jour d'exposition, avec des valeurs très hautement significatives relevées chez les individus exposés à la concentration CL₂₅, atteignant $0,29 \pm 0,01$. Parallèlement, une augmentation marquée et constante de l'IHS est observée chez le groupe traité à la concentration CL₅₀, atteignant $0,36 \pm 0,009$, en comparaison avec la série témoin dont la valeur moyenne est de $0,11 \pm 0,006$.

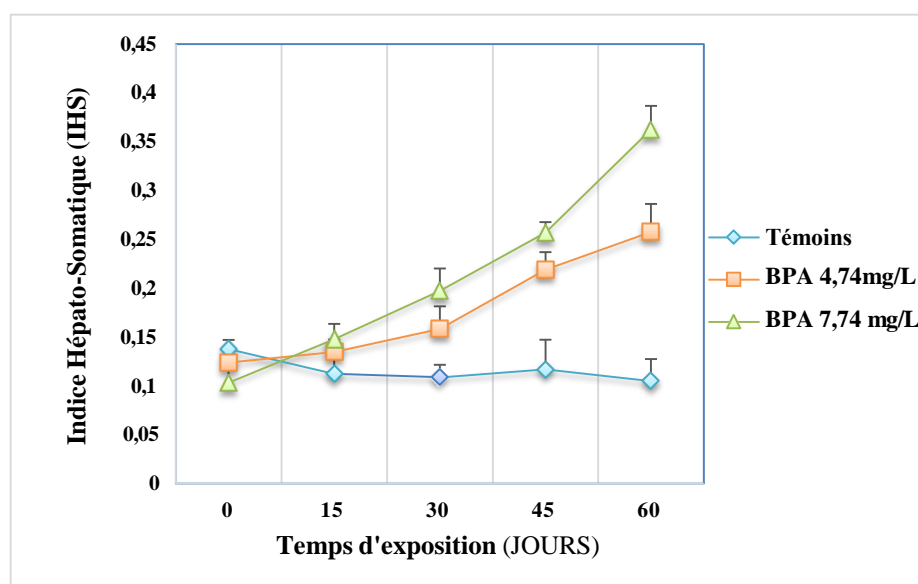


Figure 37. Variation de l'indice hépato-somatique (IHS) chez les mâles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ (4,74 mg/L) et CL₅₀ (7,74 mg/L), (Moyenne \pm SEM ; n = 5).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (temps et traitement) (**Tableau 13**), appliquée à l'indice hépato-somatique (IHS) chez les mâles adultes de *Gambusia affinis* après 60 jours d'exposition chronique au BPA, a révélé des effets statistiquement significatifs des deux facteurs étudiés, ainsi que de leur interaction. Le facteur temps a montré un effet significatif sur la variation de l'IHS, avec une valeur de $F = 7,3883$ et une p-value de 0,0014. Le traitement, correspondant aux différentes concentrations de BPA administrées, a exercé un effet extrêmement significatif ($F = 58,657$; $p = 0,0001$), traduisant une réponse fortement dose-dépendante. Par ailleurs, l'interaction temps/traitement a également été significative ($F = 3,0574$; $p = 0,0113$).

Tableau 13: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice hépato-somatique (IHS) des femelles adultes de *G. affinis*.

<i>Source de variation</i>	<i>DDL</i>	<i>SCE</i>	<i>CM</i>	<i>Fobs</i>	<i>P</i>
<i>Temps</i>	4	0,05194	0,01298	7,3883	0,0014**
<i>Traitement</i>	2	0,15245	0,07622	58,657	0,0001****
<i>Interaction</i>	8	0,03173	0,00396	3,0574	0,0113*
<i>Résiduelle</i>	32	0,04151	0,00129		
<i>Totale</i>	46				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

La comparaison des valeurs moyennes de l'indice hépato-somatique (IGS) entre les deux sexes (mâles et femelles) a été réalisée à l'aide du test de Kruskal-Wallis, suivi d'une analyse post-hoc avec le test de Dunn pour effectuer des comparaisons multiples. Les résultats indiquent une différence très hautement significative entre les deux sexes, avec une valeur de p inférieure à 0,0010.

2.3 Indice de condition (K)

2.3.1 Femelles de *Gambusia affinis*

La variation de l'indice de condition (K) chez les adultes femelles de *Gambusia affinis* (**Figure 38**), après une exposition chronique au bisphénol A à deux concentrations différentes (CL₂₅ : 6,81 mg/L et CL₅₀ : 9,37 mg/L) a été analysé. La comparaison des moyennes entre les séries témoins et les séries traitées, réalisée à l'aide du test de Tukey, n'a révélé aucune différence statistiquement significative au cours des 45 jours d'exposition.

À 45 jours d'exposition, l'indice de condition (K) présente une diminution hautement significative chez les poissons exposés à la concentration CL₅₀ (9,37 mg/L), avec une valeur moyenne de $0,18 \pm 0,02$ dans la série traitée comparativement à la valeur $0,24 \pm 0,01$ chez la série témoin. Cette diminution se poursuit jusqu'au 60^e jour d'exposition, où une différence très hautement significative a été enregistrée chez les individus exposés à la concentration CL₅₀, atteignant une valeur moyenne de $0,14 \pm 0,01$. En revanche, les séries traitées à CL₂₅ (6,81 mg/L) ne montrent aucune différence significative dans l'indice de condition (K) durant 60 jours d'exposition.

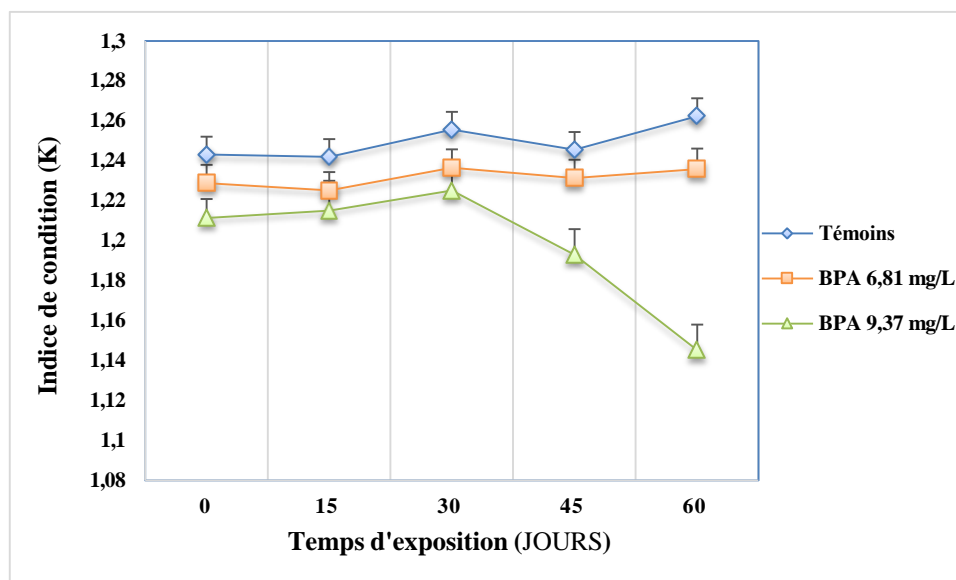


Figure 38. Variation de l'indice de condition (K) chez les femelles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ (6,81 mg/L) et CL₅₀ (9,37 mg/L), (Moyenne \pm SEM ; n = 5).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (Temps et Traitement) (**Tableau 14**) a révélé des résultats significatifs pour les deux facteurs. Le facteur Temps a montré un effet statistiquement significatif, avec un $F = 8,1345$ et une p-value de 0,0519, ce qui suggère

une différence significative au seuil de 0,05. Le facteur Traitement présente un effet hautement significatif, avec un $F = 6,1672$ et une p-value de 0,0039, indiquant que les différences entre les groupes traités sont marquées. En revanche, l'interaction entre le Temps et le Traitement n'a pas été significative, avec un $F = 1,0743$ et une p-value de 0,6575, ce qui suggère que l'impact du traitement n'est pas influencé par la durée de l'exposition.

Tableau 14: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice de condition (K) des femelles adultes de *G. affinis*.

<i>Source de variation</i>	<i>DDL</i>	<i>SCE</i>	<i>CM</i>	<i>Fobs</i>	<i>P</i>
<i>Temps</i>	4	0,02812	0,00129	8,1345	0,0519*
<i>Traitement</i>	2	0,010396	0,00553	6,1672	0,0039**
<i>Interaction</i>	8	0,022006	0,00431	1,0743	0,6575 NS
<i>Résiduelle</i>	32	0,07432	0,002973		
<i>Totale</i>	46				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

2.3.3 Mâles de *Gambusia affinis*

L'analyse de la variation de l'indice de condition (K) chez les mâles adultes de *Gambusia affinis* (**Figure 39**), après une exposition chronique au bisphénol A à deux concentrations différentes (CL₂₅ : 4,74 mg/L et CL₅₀ : 7,74 mg/L), n'a révélé aucune différence statistiquement significative entre les séries témoins et les séries traitées avant le 30^e jour d'exposition.

L'indice de condition (K) présente une diminution significative dès le 30^e jour d'exposition chez les poissons exposés à la concentration CL₂₅ (4,74 mg/L), avec une valeur moyenne de $0,75 \pm 0,02$, et une diminution hautement significative chez la série exposée à la concentration CL₅₀ (7,74 mg/L), avec une valeur moyenne de $0,70 \pm 0,01$, comparativement à la série témoin dont la valeur moyenne est de $0,80 \pm 0,03$. Cette Régression se prolonge jusqu'au 60^e jour d'exposition, où une différence hautement significative est observée chez les individus exposés à CL₂₅ passant à une valeur moyenne de $0,69 \pm 0,02$ et une diminution très hautement significative, est enregistrée chez les poissons exposés à CL₅₀, atteignant une valeur moyenne de $0,62 \pm 0,02$.

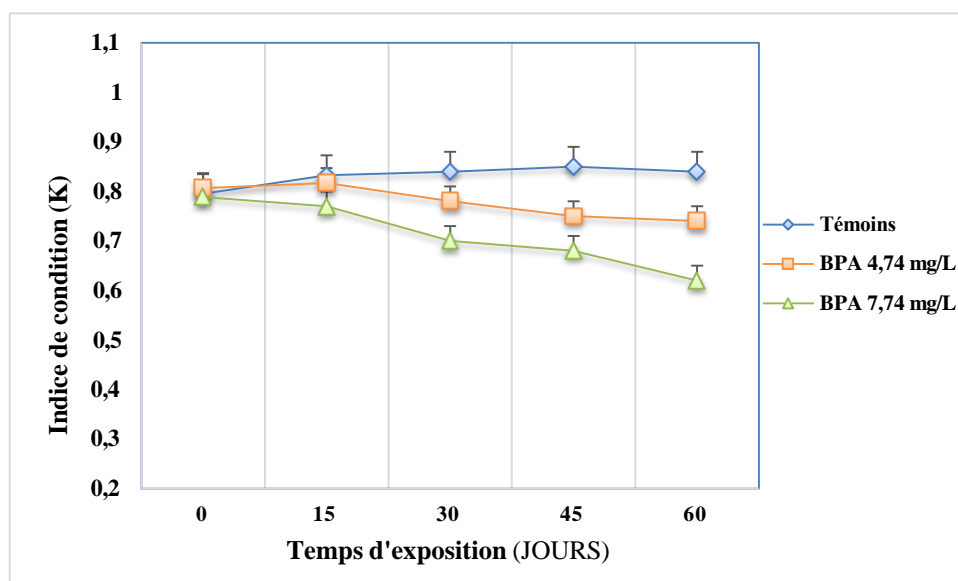


Figure 39. Variation de l'indice de condition (K) chez les mâles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ (4,74 mg/L) et CL₅₀ (7,74 mg/L), (Moyenne \pm SEM ; n = 5).

L'analyse de la variance à deux critères de classification (Temps et Traitement) (**Tableau 15**) a révélé des résultats significatifs pour les deux facteurs. Le facteur temps a montré un effet statistiquement significatif, avec une valeur de $F = 9,3624$ et une p-value de 0,0036, indiquant une différence marquée au seuil de 0,05. Le facteur traitement a également montré un effet significatif, avec une valeur de $F = 4,6466$ et une p-value de 0,0027, ce qui suggère que les différences entre les groupes traités sont importantes. En revanche, l'interaction entre le temps et le traitement n'a pas révélé de signification statistique, avec une valeur de $F = 0,31726$ et une p-value de 0,9536, ce qui indique que l'effet du traitement ne dépend pas de la durée d'exposition. L'analyse met en évidence l'importance du facteur Temps et du facteur Traitement de manière indépendante, mais indique qu'il n'y a pas d'interaction significative entre ces deux facteurs.

Tableau 15: Analyse de la variance à 2 critères de classification (Temps, Traitement) sur l'indice de condition (K) des mâles adultes de *G. affinis*.

<i>Source de variation</i>	<i>DDL</i>	<i>SCE</i>	<i>CM</i>	<i>Fobs</i>	<i>P</i>
<i>Temps</i>	4	0,008324	0,00208	9,3624	0,0036 **
<i>Traitement</i>	2	0,01224	0,00612	4,6466	0,0027 **
<i>Interaction</i>	8	0,01408	0,001761	0,31726	0,9536 ^{NS}
<i>Résiduelle</i>	32	0,17763	0,00555		
<i>Totale</i>	46				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

La comparaison des valeurs moyennes de l'indice de condition (K) entre les deux sexes, à savoir les mâles et les femelles, a été réalisée à l'aide du test de Kruskal-Wallis. Ce test non paramétrique est utilisé pour déterminer s'il existe une différence significative entre les groupes indépendants, dans ce cas entre les deux sexes, en se basant sur les rangs des valeurs de l'indice de condition. Après avoir obtenu une différence globale entre les groupes, une analyse post-hoc a été effectuée en utilisant le test de Dunn pour réaliser des comparaisons multiples, afin de préciser les différences spécifiques entre les sexes. Les résultats ont révélé une différence statistiquement significative entre les deux sexes, avec une p-value de 0,0116, indiquant que l'indice de condition (K) varie de manière significative entre les mâles et les femelles.

3. Effet du Bisphénol a sur les biomarqueurs de dommage

3.1 Effet sur l'acétylcholinestérase (AChE)

L'activité moyenne de l'acétylcholinestérase (AChE) chez les mâles adultes de *Gambusia affinis* a montré des variations significatives en fonction du temps et des concentrations de BPA. Dès le 15^e jour, une diminution très hautement significative de l'activité enzymatique est observée chez la série traitée à la CL₂₅ (4,74 mg/L), passant de $5,12 \pm 0,01$ nM/min/mg chez les témoins à $3,06 \pm 0,03$ nM/min/mg. Ainsi une inhibition extrêmement significative marquée chez les individus exposés à la CL₅₀ (7,74 mg/L), où l'activité enzymatique est de $2,16 \pm 0,09$ nM/min/mg.

Chez les femelles, l'inhibition de l'AChE débute également au 15^e jour, s'accroissant avec le temps et la concentration. À J45, les activités enzymatiques marquent une diminution très hautement significative de $5,31 \pm 0,02$ (CL₂₅ : 6,81 mg/L) et $4,21 \pm 0,01$ nM/min/mg (CL₅₀ : 9,37 mg/L), contre $7,60 \pm 0,01$ nM/min/mg chez les témoins. À J60, l'activité atteint une valeur minimale de $3,17 \pm 0,02$ nM/min/mg de protéines chez la série traitées à la CL₅₀.

L'analyse statistique par ANOVA à deux facteurs a démontré des effets très hautement significatifs du temps d'exposition, des concentrations de BPA, ainsi que de leur interaction, sur l'AChE chez *Gambusia affinis*. Chez les mâles, l'activité de l'AChE a été fortement influencée par le facteur temps ($F = 56,66$; $p < 0,0001$) et par le traitement au BPA ($F = 127,6$; $p < 0,0001$), tandis que l'interaction entre ces deux facteurs ($F = 10,58$; $p < 0,0001$) souligne une variation temporelle dépendante de la dose. Chez les femelles, des résultats similaires, voire plus marqués, ont été observés avec des effets significatifs du temps ($F = 38,67$), du traitement ($F = 103,2$) et de l'interaction ($F = 6,626$), tous à un seuil de signification élevé ($p < 0,0001$), confirmant la sensibilité élevée de l'enzyme à l'exposition chronique au BPA.

En complément, une analyse non paramétrique par le test de Kruskal-Wallis a été menée pour comparer les effets du BPA entre les sexes (mâles et femelles) à différents temps d'exposition (15, 30, 45 et 60 jours). Le test post-hoc de Dunn a révélé des différences significatives de sensibilité selon le sexe, notamment à partir du 15^e jour, avec des écarts de réponse enzymatique plus marqués aux jours 30 et 45, en particulier à la concentration CL₅₀. Par ailleurs, le test de Mann-Whitney a permis d'effectuer des comparaisons paires entre les séries exposées à CL₂₅ et à CL₅₀ pour chaque période.

Ces analyses indiquent des différences statistiquement significatives aux jours 15, 30 et 45, indiquant une inhibition de l'activité de l'AChE proportionnelle à la concentration de BPA. À 60 jours, bien que l'inhibition persiste, la différence entre les deux concentrations tend à se réduire, suggérant une restauration enzymatique (**Tableau 16; Figure 40**).

Tableau 16 : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur l'activité de l'Acétylcholinestérase (AChE), chez les mâles et les femelles adultes de *G. affinis* en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀.

Source de variation	Mâles					Femelles				
	DDL	SCE	CM	Fobs	P	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Temps	4	27,65	6,913	56,66	0,0001****	4	83,79	20,95	38,67	0,0001****
Traitement	2	31,14	15,57	127,6	0,0001****	2	111,8	55,88	103,2	0,0001****
Interaction	8	10,33	1,291	10,58	0,0001****	8	28,71	3,588	6,626	0,0001****
Résiduelle	60	7,320	0,1220			60	32,50	0,5416		
Totale	74					74				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

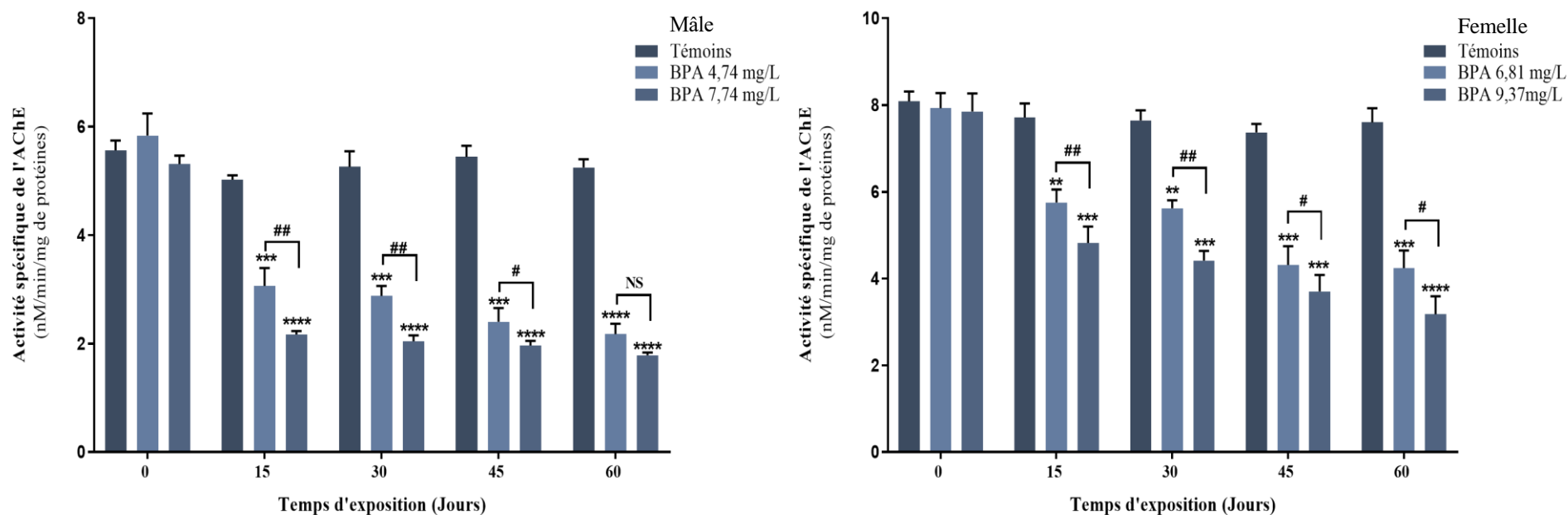


Figure 40. Variation de l'activité spécifique de l'Acétylcholinestérase (nM/min/mg protéines), chez les mâles et les femelles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀, (Moyenne ± SEM ; n = 5) ;

* p : Significativité statistique entre témoins et traités ;

#p : Significativité statistique entre traités CL₂₅ et traités CL₅₀ ;

* : Test de Tukey ; # : Test de Mann-Whitney

3.2 Effet sur le Glutathione-S Transferase (GST)

L'activité enzymatique de la Glutathion S-transférase (GST) Chez *Gambusia affinis*, suite à l'exposition chronique au BPA entraîne une induction progressive de l'activité de l'enzyme clé du système de détoxification cellulaire. Chez les mâles, l'activité enzymatique de la GST indique une augmentation significative de l'activité enzymatique dès le 15^e jour, atteignant $1,18 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ chez la série exposée à CL₂₅ (4,74 mg/L) et $1,43 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ chez la série CL₅₀ (7,74 mg/L), contre $0,93 \pm 0,01 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ chez les témoins. Cette élévation se poursuit jusqu'au 45^e jour, où les niveaux d'activité restent très significativement élevés, atteignant respectivement $1,35 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ (CL₂₅) et $1,53 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ (CL₅₀). Au 60^e jour, une légère diminution est enregistrée dans les deux séries traitées, avec des valeurs de $1,12 \pm 0,01 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₂₅ et $1,38 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₅₀, bien que l'activité enzymatique demeure supérieure à celle observée chez les témoins.

Chez les femelles, l'exposition chronique au BPA entraîne une induction marquée et progressive de l'activité de la GST. Le pic d'activité est atteint au 45^e jour, avec des niveaux s'élevant à $1,75 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₂₅ et $1,98 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₅₀, par rapport à la valeur moyenne des témoins $0,90 \pm 0,01 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$. À 60 jours, une légère baisse est notée dans les séries exposées ($1,49 \pm 0,03 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₂₅ et $1,78 \pm 0,01 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₅₀), mais les valeurs restent nettement supérieures à celle des témoins qui est de $0,93 \pm 0,01 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$.

L'analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA) révèle des effets très hautement significatifs du temps d'exposition, du traitement au BPA, ainsi que de leur interaction sur l'activité de la GST chez les mâles et femelles de *Gambusia affinis*. Chez les mâles, les effets du temps ($F = 87,666$; $p < 0,0001$), du traitement ($F = 41,905$; $p < 0,0001$) et de leur interaction ($F = 5,456$; $p = 0,0004$) indiquent une élévation progressive et dose-dépendante de l'activité enzymatique en réponse au BPA. Chez les femelles, des effets ont été observés, avec des valeurs de F très élevées pour le temps ($F = 965,82$; $p < 0,0001$), le traitement ($F = 162,1$; $p = 0,0005$) et l'interaction ($F = 44,44$; $p < 0,0001$). Indiquant une réactivité enzymatique accrue chez les mâles comparativement aux femelles.

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi du test post-hoc de Dunn, a révélé des différences significatives entre les deux sexes aux jours 30, 45 et 60, avec une activité GST plus élevée chez les mâles, en particulier dans la série CL₅₀. Par ailleurs, le test de Mann-Whitney a permis de comparer les deux séries traitées (CL₂₅ et CL₅₀) à chaque période. Des différences significatives ont été observées aux jours 15 ($p < 0,05$), 30 ($p < 0,01$) et 45 ($p < 0,01$), traduisant une réponse enzymatique clairement dose-dépendante (**Tableau 17 ; Figure 41**).

Tableau 17: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur l'activité enzymatique du Glutathione-S transferase (GST), chez les mâles et les femelles adultes de *G. affinis* en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀.

Source de variation	Mâles					Femelles				
	DDL	SCE	CM	Fobs	P	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Temps	4	2,1166	0,32507	87,666	0,0001****	4	22,342	5,5856	965,82	0,0001****
Traitement	2	1,9335	0,96674	41,905	0,0001****	2	36,296	18,148	162,1	0,0005***
Interaction	8	0,44341	0,055426	5,4563	0,0004***	8	10,149	1,2686	44,440	0,0001****
Résiduelle	60	0,32507	0,010158			60	0,91351	0,028547		
Totale	74					74				

DDL: degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

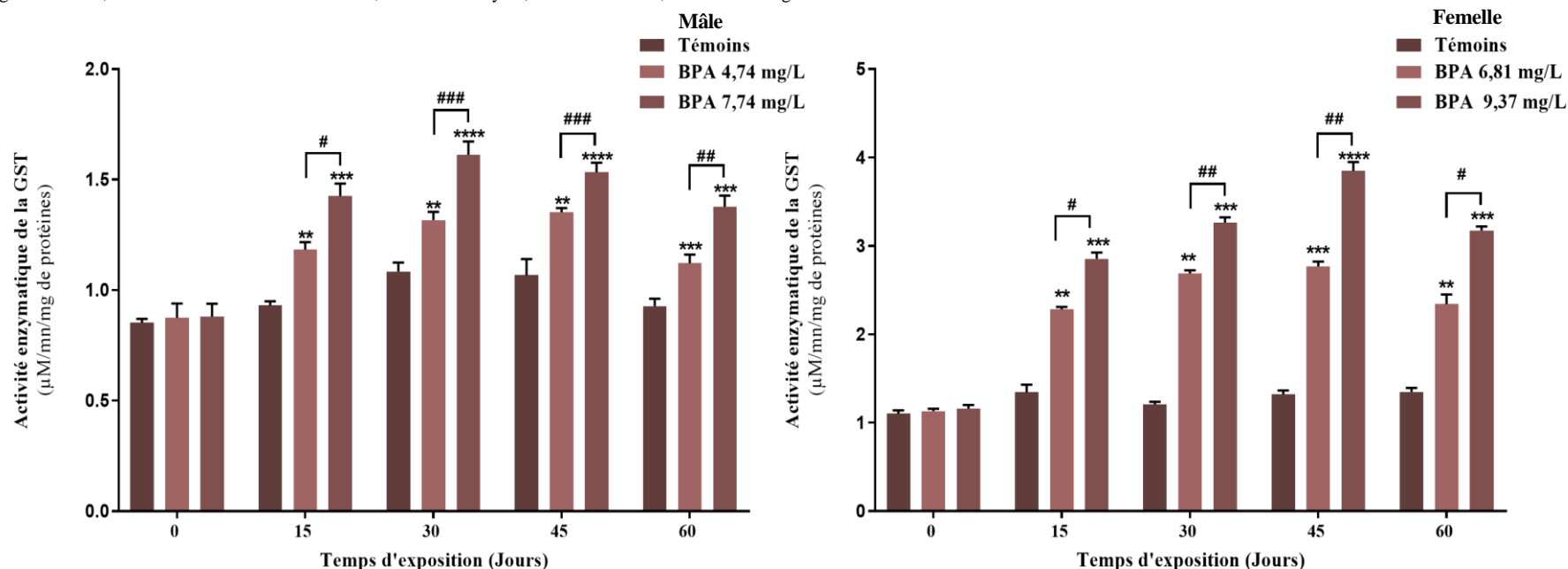


Figure 41. Variation de l'activité enzymatique de la Glutathion S-transférase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les mâles et les femelles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀, (Moyenne \pm SEM ; n = 5) ;

*p : Significativité statistique entre témoins et traités ;

#p : Significativité statistique entre traités CL₂₅ et traités CL₅₀ ;

* : Test de Tukey ; # : Test de Mann-Whitney.

3.3 Effet sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité enzymatique de la catalase (CAT) induit une activation significative et progressive en fonction de la concentration et du temps d'exposition. Chez les mâles, une augmentation significative de l'activité de la catalase est constatée dès le 15^e jour, avec une valeur moyenne de $1,08 \pm 0,02$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ pour la série exposée à CL₂₅ (4,74 mg/L) et $1,65 \pm 0,04$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₅₀ (7,74 mg/L), contre $0,56 \pm 0,02$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ observé chez les témoins. Cette augmentation se poursuit au 45^e jours, les activités atteignent respectivement le pic avec $1,82 \pm 0,03$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ (CL₂₅) et $2,32 \pm 0,04$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ (CL₅₀), contre $0,59 \pm 0,01$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ chez les témoins. Au 60^e jour, les valeurs maximales sont observées, avec $2,08 \pm 0,02$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₂₅ et $2,54 \pm 0,03$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₅₀. Une inversion de tendance à partir du 60^e jour, indiquant une diminution de l'activité catalasique dans les série exposés au BPA, contrairement à la progression observée jusqu'au 45^e jour.

Chez les femelles, l'activité enzymatique présente une induction marquée aux premières phases de l'exposition au BPA, suivie d'une diminution progressive au-delà du 30^e jour. Le pic d'activité est observé au 30^e jour, avec des valeurs maximales extrêmement significative de $1,52 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (CL₂₅) et $2,16 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (CL₅₀), tandis que les témoins montrent une valeur moyenne de $0,66 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. À partir du 45^e jour, une réduction significative de l'activité enzymatique est enregistrée à $1,18 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (CL₂₅) et $1,76 \pm 0,05$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (CL₅₀), contre $0,65 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ chez les témoins. Cette baisse se poursuit jusqu'au 60^e jour, où les taux atteignent respectivement $1,14 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (CL₂₅) et $1,44 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (CL₅₀).

La comparaison des valeurs de F entre les deux sexes indique que les mâles présentent une sensibilité enzymatique plus marquée face à l'exposition au BPA. L'analyse de la variance à deux facteurs montre des effets très significatifs du temps, du traitement au BPA et de leur interaction sur l'activité enzymatique chez *Gambusia affinis*. Chez les mâles, les valeurs de F sont particulièrement élevées pour le temps ($F = 48,08$; $p < 0,0001$), le traitement ($F = 153,99$; $p < 0,0001$) et l'interaction ($F = 20,23$; $p < 0,0001$), traduisant une forte sensibilité de la réponse enzymatique. Chez les femelles, des effets significatifs sont également observés pour le temps ($F = 37,80$; $p = 0,0002$), le traitement ($F = 46,78$; $p = 0,0009$) et l'interaction ($F = 5,09$; $p = 0,0012$).

En complément, le test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn, indique des différences statistiquement significatives ont été observées, notamment aux jours 45 et 60 ($p < 0,01$), avec des valeurs enzymatiques globalement plus élevées chez les mâles. Par ailleurs, le test de Mann-Whitney a mis en évidence des différences significatives aux jours 15, 30 et 45 ($p < 0,05$ à $p < 0,01$), confirmant une réponse dose-dépendante au BPA. (**Tableau 18 ; Figure 42**).

Tableau 18 : Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur l'activité enzymatique de la Catalase (CAT), chez les mâles et les femelles adultes de *G. affinis* en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀

Source de variation	Mâles					Femelles				
	DDL	SCE	CM	Fobs	P	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Temps	4	3,0782	0,76955	48,079	0,0001****	4	5,3301	1,3325	37,799	0,0002****
Traitement	2	5,7823	2,8911	153,99	0,0001****	2	10,746	5,3728	46,78	0,0009****
Interaction	8	1,9249	0,24062	20,225	0,0001****	8	3,0434	0,38043	5,088	0,0012**
Résiduelle	60	0,38070	0,011897			60	0,80685	0,025214		
Totale	74					74				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

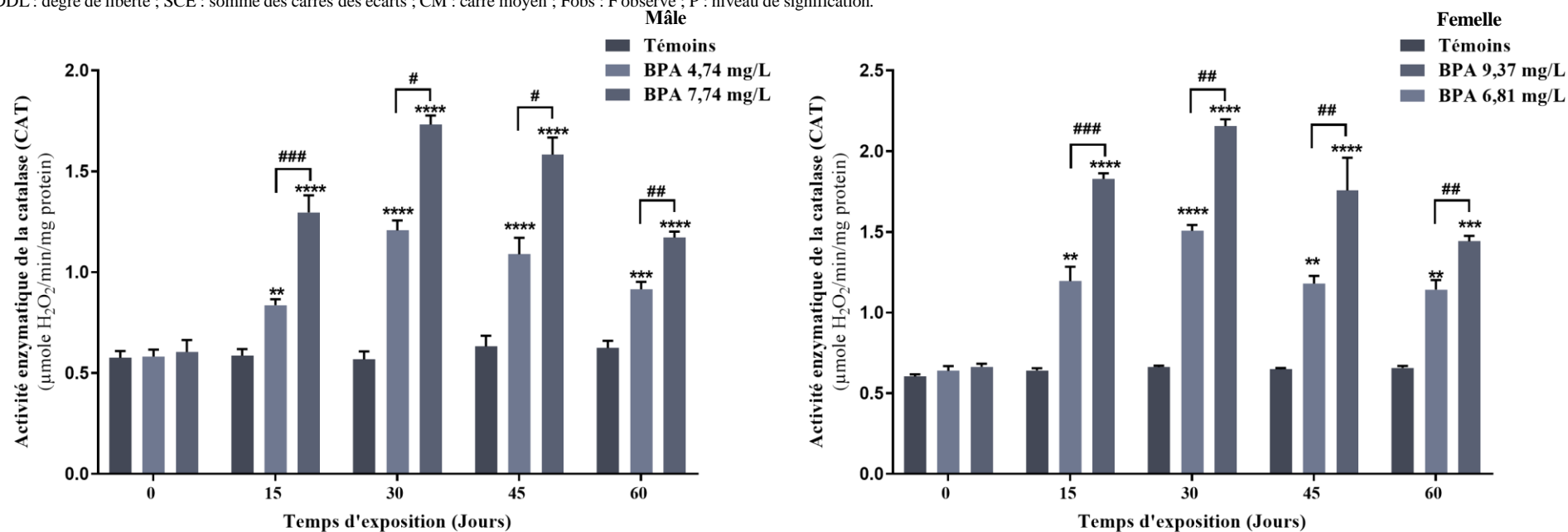


Figure 42. Variation de l'activité enzymatique de la Catalase ($\mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéines), chez les mâles et les femelles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀, (Moyenne \pm SEM ; n = 5) ;

*p : Significativité statistique entre témoins et traités ;

#p : Significativité statistique entre traités CL₂₅ et traités CL₅₀ ;

* : Test de Tukey ; # : Test de Mann-Whitney.

3.4 Effet sur le taux de glutathion réduit (GSH)

L'évolution du taux de glutathion réduit (GSH) chez *Gambusia affinis* a été significativement altérée suite à une exposition chronique de 60 jours au BPA. Les résultats montrent une diminution progressive du taux de GSH en fonction du temps et de la concentration, aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Dès le 15^e jour, une baisse très hautement significative est observée, notamment chez les individus exposés à la concentration CL₅₀ (7,74 mg/L) avec une valeur moyenne de $0,21 \pm 0,02$ µmol/mg de protéine dans la série traitée comparativement à la valeur $0,34 \pm 0,01$ µmol/mg chez la série témoin. Cette diminution se poursuit jusqu'au 60^e jour d'exposition, où une différence extrêmement significative a été enregistrée chez les individus exposés à la concentration CL₂₅ (4,74 mg/L), d'une valeur moyenne de $0,19 \pm 0,01$ µmol/mg, atteignant une valeur minimale de $0,19 \pm 0,01$ µmol/mg chez la série exposée à la CL₅₀.

Chez les femelles, le 45^e jour d'exposition, une inhibition très hautement significative de l'activité enzymatique a été observée dans les séries exposées aux concentrations CL₂₅ (6,81 mg/L) et CL₅₀ (9,37 mg/L) de BPA, l'activité moyenne passe de $0,49 \pm 0,01$ µmol/mg de protéines chez les témoins à $0,32 \pm 0,02$ µmol/mg et $0,29 \pm 0,01$ µmol/mg respectivement. Cette inhibition enzymatique s'intensifie au 60^e jour, atteignant des niveaux extrêmement significatifs de $0,24 \pm 0,03$ µmol/mg et $0,22 \pm 0,01$ µmol/mg pour les deux concentrations respectivement.

L'analyse de la variance à deux critères a démontré que le taux de GSH chez *Gambusia affinis* était significativement affecté par le traitement le temps d'exposition au BPA, ainsi que par leur l'interaction. Chez les mâles, des effets très hautement significatifs ont été observés pour le temps ($F = 81,669$; $p < 0,0001$), le traitement ($F = 239,71$; $p < 0,0001$) et leur interaction ($F = 5,5355$; $p = 0,0002$).

Chez les femelles, les valeurs étaient également significatives pour le temps ($F = 25,269$; $p < 0,0001$), le traitement ($F = 56,774$; $p = 0,0007$) et l'interaction ($F = 7,2338$; $p = 0,0087$).

Le test de Kruskal-Wallis a révélé des différences très significatives entre les deux sexes à différents temps d'exposition, notamment aux jours 30 et 60 ($p < 0,01$). Le test post-hoc de Dunn a précisé ces écarts, en montrant des différences statistiquement significatives entre les femelles exposés à CL₅₀ et les autres séries ($p < 0,05$ à $p < 0,01$).

De plus, le test de Mann-Whitney a mis en évidence des différences hautement significatives entre les groupes CL₂₅ et CL₅₀ aux jours 15, 30 et 45 ($p < 0,001$), traduisant une inhibition dose-dépendante du GSH. À 60 jours, bien que les différences persistent, elles deviennent non significatives ou marginalement significatives ($p > 0,05$), suggérant une possible stabilisation de la réponse biologique (Tableau 19 ; Figure 43).

Tableau 19: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur le taux de Glutathion réduit (GSH), chez les mâles et les femelles adultes de *G. affinis* en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀.

Source de variation	Mâles					Femelles				
	DDL	SCE	CM	Fobs	P	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Temps	4	0,22888	0,057220	81,669	0,0001****	4	0,20450	0,051125	25,269	0,0001****
Traitement	2	0,22789	0,11395	239,71	0,0001****	2	0,40005	0,20002	56,774	0,0007***
Interaction	8	0,045726	0,005716	5,5355	0,0002***	8	0,07553	0,009442	7,2338	0,0087**
Résiduelle	60	0,05020	0,0008366			60	0,04176	0,001305		
Totale	74					74				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification

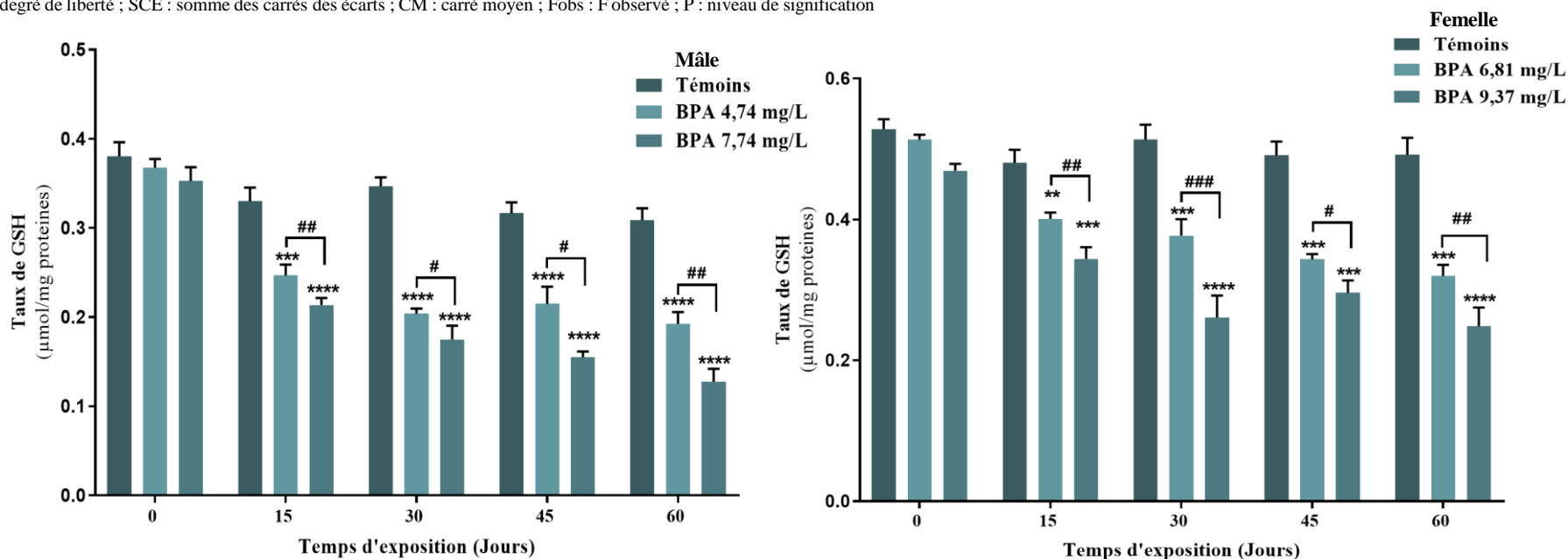


Figure 43. Variation de taux de Glutathion réduit ($\mu\text{mol/mg}$ protéines), chez les mâles et les femelles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀, (Moyenne \pm SEM ; n = 5) ;

***p** : Significativité statistique entre témoins et traités ;

#**p** : Significativité statistique entre traités CL₂₅ et traités CL₅₀ ;

* : Test de Tukey ; # : Test de Mann-Whitney.

3.5 Effet sur le taux de Malondialdéhyde (MDA)

L'évaluation du taux de malondialdéhyde (MDA), indicateur de la peroxydation lipidique, a révélé une augmentation significative du stress oxydatif chez les mâles et femelles adultes de *Gambusia affinis* exposés chroniquement au BPA.

Chez les mâles, l'exposition prolongée au BPA induit une augmentation très hautement significative dès le 15^e jour d'exposition, avec une valeur moyenne de $1,72 \pm 0,01$ nmol/mg chez la série exposée à la CL₂₅ (4,74 mg/L) et $1,95 \pm 0,03$ nmol/mg pour la série CL₅₀ (7,74 mg/L), comparativement à 0,72 nmol/mg chez les témoins. Cette tendance se poursuit au 45^e jour, avec des niveaux atteignant $1,98 \pm 0,02$ nmol/mg (CL₂₅) et $2,07 \pm 0,01$ nmol/mg (CL₅₀), reflétant une différence extrêmement significative vis-à-vis des témoins, dont le taux reste stable à 0,84 nmol/mg. L'effet maximal est enregistré au 60^e jour, avec des valeurs culminant à $1,86 \pm 0,01$ nmol/mg et $2,11 \pm 0,03$ nmol/mg pour les séries CL₂₅ et CL₅₀ respectivement.

Chez les femelles, le taux de MDA présente une augmentation très hautement significative à partir du 30^e jour d'exposition. Les concentrations atteignent alors $1,65 \pm 0,01$ nmol/mg dans la série exposée à la CL₂₅ (6,81 mg/L) et $1,82 \pm 0,03$ nmol/mg dans la série CL₅₀ (9,37 mg/L), contre $0,87 \pm 0,01$ nmol/mg chez les témoins. Cette élévation se poursuit au 45^e jour, avec des taux de $1,75 \pm 0,02$ nmol/mg (CL₂₅) et $1,98 \pm 0,01$ nmol/mg (CL₅₀). Au 60^e jour, une légère diminution est observée dans la série CL₂₅ d'une valeur moyenne de $1,49 \pm 0,02$ nmol/mg, tandis que le taux de MDA reste extrêmement élevé dans la série CL₅₀, atteignant $1,78 \pm 0,03$ nmol/mg, comparativement à $0,93 \pm 0,01$ nmol/mg chez les témoins.

L'analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA) a révélé des effets hautement significatifs du temps d'exposition, du traitement au BPA, ainsi que de leur interaction sur le taux MDA chez les mâles et femelles. Chez les mâles, les effets du temps ($F = 175,56$; $p < 0,0001$), du traitement ($F = 303,86$; $p < 0,0001$) et de l'interaction ($F = 29,71$; $p < 0,0001$) sont très hautement significatifs. Des résultats similaires, avec des valeurs encore plus marquées, ont été observés chez les femelles pour le traitement ($F = 621,00$; $p < 0,0001$) et l'interaction ($F = 48,22$; $p < 0,0001$).

Le test de Kruskal-Wallis, suivie du test post-hoc de Dunn, indique des différences statistiquement significatives ont été mises en évidence, notamment aux jours 30, 45 et 60, avec des valeurs de $p < 0,01$, indiquant que les mâles présentent des niveaux de MDA significativement plus élevés que les femelles à ces périodes. Par ailleurs, le test de Mann-Whitney entre les séries CL₂₅ et CL₅₀ révèle des différences hautement significatives aux jours 15 ($p < 0,01$), 30 ($p < 0,001$) et 45 ($p < 0,001$), traduisant une réponse oxydative clairement dose-dépendante. À 60 jours, les différences entre les deux concentrations tendent à s'atténuer ($p > 0,05$) (Tableau 20 ; Figure 44).

Tableau 20: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur le taux de Malondialdéhyde (MDA), chez les mâles et les femelles adultes de *G. affinis* en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀.

Source de variation	Mâles					Femelles				
	DDL	SCE	CM	Fobs	P	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Temps	4	6,7509	1,6877	175,56	0,0001****	4	4,7789	1,1947	183,84	0,0001****
Traitement	2	9,0929	4,5464	303,86	0,0001****	2	7,8738	3,9369	621,00	0,0001****
Interaction	8	2,4534	0,30667	29,706	0,0001****	8	2,2613	0,28266	48,219	0,0001****
Résiduelle	60	0,33035	0,01032			60	0,18759	0,00586		
Totale	74					74				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

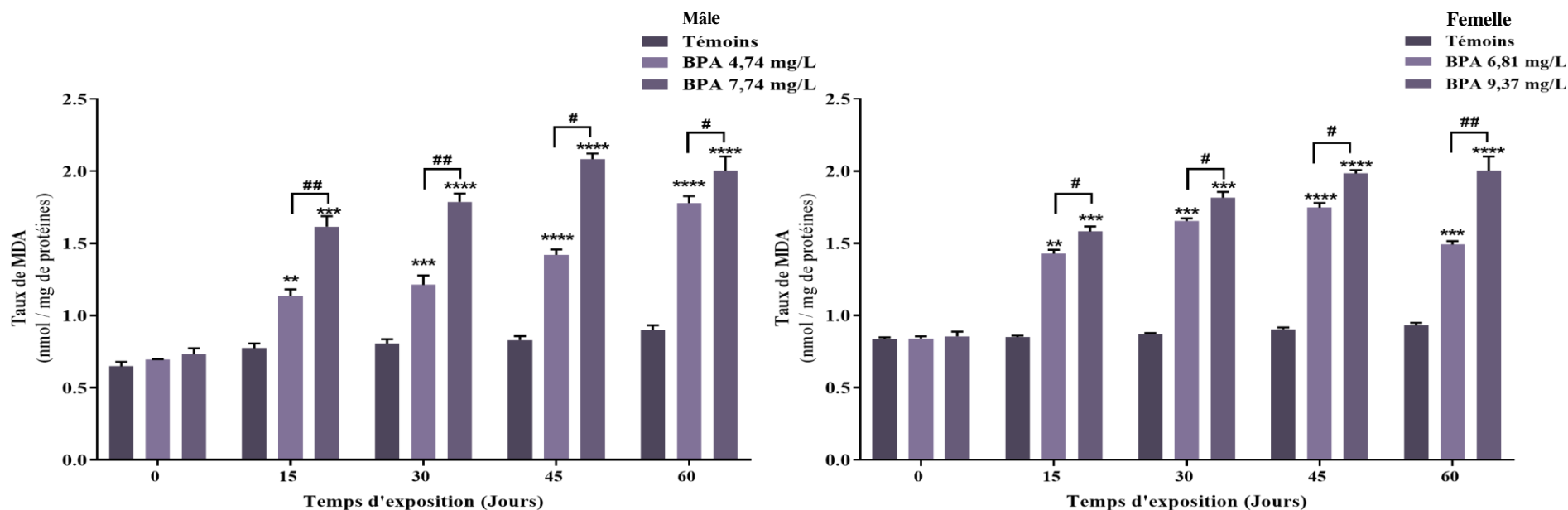


Figure 44 . Variation de taux de Malondialdéhyde (nmol / mg protéines), chez les mâles et les femelles adultes de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL₂₅ et CL₅₀, (Moyenne ± SEM ; n = 5) ;

*p : Significativité statistique entre témoins et traités ;

#p : Significativité statistique entre traités CL₂₅ et traités CL₅₀ ;

* : Test de Tukey ; # : Test de Mann-Whitney.

3.6 Effet sur le taux des vitellines

Le suivi du taux des vitellines chez les adultes femelles de *Gambusia affinis* révèle une altération significative du processus de vitellogenèse en réponse à l'exposition au BPA. Dans la série témoin, les concentrations de vitellines augmentent de manière significative passant de $6,09 \pm 0,009 \mu\text{g}/\text{mg}$ au début de l'expérimentation à $8,01 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ au 60^e jour. En revanche, les séries exposées au BPA présentent une inhibition progressive et dose-dépendante. À la concentration de 6,81 mg/L (CL₂₅), le taux de vitellines diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur moyenne de $4,24 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ au 60^e jour, soit une réduction extrêmement significative près de 48 % par rapport aux séries témoins. L'effet est encore plus prononcé à 9,37 mg/L (CL₅₀), où une diminution expéditive observée dès le 15^e jour d'exposition avec une moyenne de $3,70 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$, pour atteindre une valeur minimum de $2,42 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$ à 60 jours, correspondant à une diminution extrêmement significative de plus de 70 %.

L'analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA) appliquée aux taux des vitellines chez *Gambusia affinis* a mis en évidence des effets extrêmement significatifs des trois sources de variation : le temps d'exposition, le traitement au bisphénol A, ainsi que leur interaction. Le facteur temps présente une valeur Fobs de 26,534 avec un seuil de significativité très élevé ($p < 0,0001$). Le traitement montre également un effet extrêmement significatif avec une valeur F = 49,843 ($p < 0,0001$), indiquant une altération importante du taux de vitellines selon la dose administrée. L'interaction est également extrêmement significative (F = 16,593 ; $p < 0,0001$).

L'évaluation des différences significatives entre les séries exposées à deux concentrations distinctes de bisphénol A (BPA) (CL₂₅ : 6,81 mg/L et CL₅₀ : 9,37 mg/L) a été réalisée à l'aide du test de Mann-Whitney, appliqué à chaque point temporel (0, 15, 30, 45 et 60 jours). Les résultats ont révélé une différence statistiquement significative entre les deux séries dès le 15^e jour ($p < 0,05$), indiquant une réponse mesurable dès les premières étapes de l'expérience. Cette différence s'est renforcée au 30^e et 45^e jours, devenant hautement significative ($p < 0,01$), suggérant une réponse plus marquée à mesure que l'exposition au BPA progresse. Cette différence significative persiste également jusqu'au 60^e jour ($p < 0,05$), soulignant une réponse dose-dépendante au BPA qui se maintient sur toute la durée de l'expérience.

Ces résultats montrent que l'exposition à des concentrations plus élevées de BPA entraîne une réponse plus intense et plus persistante au fil du temps, comme l'illustrent le **Tableau 21** et la **Figure 45**.

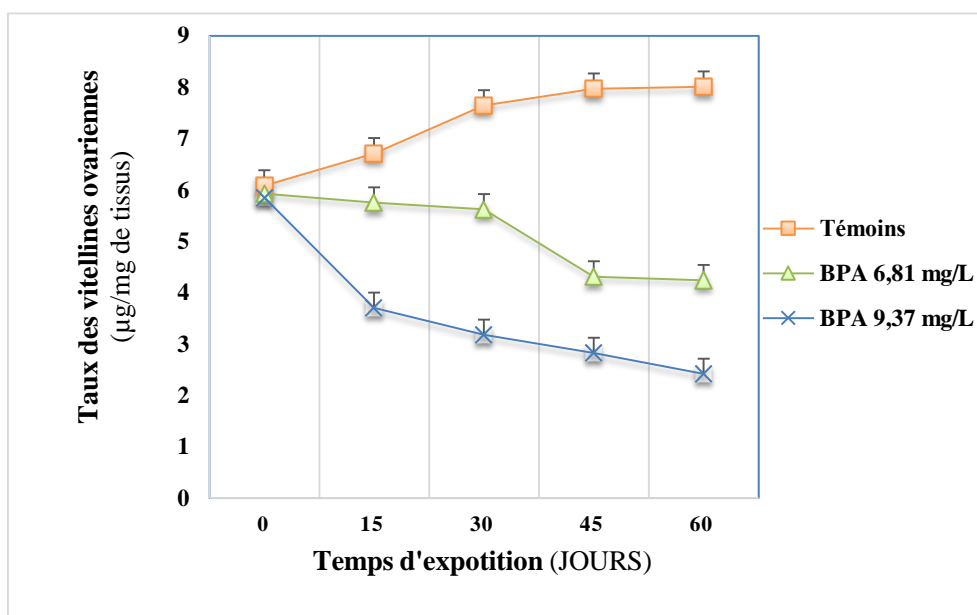


Figure 45. Variation du taux de vitellines ovariennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus) chez les adultes femelles de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL_{25} (6,81 mg/L) et CL_{50} (9,37 mg/L), (Moyenne \pm SEM ; $n = 5$).

Tableau 21: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur le taux de vitellines ovariennes ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus), chez les femelles adultes de *G. affinis* en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL_{25} (4,74 mg/L) et CL_{50} (7,74 mg/L).

Source de variation	DDL	SCE	CM	Fobs	P
<i>Temps</i>	4	0,18723	0,01276	26,534	0,0001***
<i>Traitement</i>	2	0,15245	0,06523	49,843	0,0001****
<i>Interaction</i>	8	0,04563	0,00243	16,593	0,0001****
<i>Résiduelle</i>	32	0,05467	0,00254		
Totale	46				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

3.8 Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour explorer la variabilité des réponses biochimiques liées au stress oxydatif chez les mâles et les femelles de *Gambusia affinis*. En se basant sur cinq biomarqueurs clés (AChE, GSH, GST, MDA, CAT), l'ACP a mis en évidence une structuration claire des individus selon le niveau d'exposition au BPA. Les groupes exposés (CL₂₅ et CL₅₀) se distinguent nettement des témoins, suivant un gradient dose-dépendant sur l'axe principal F1.

Chez les mâles, l'analyse en composantes principales (ACP) (**Figure 46, (a,b)**) a révélé que l'axe F1 explique à lui seul 95,74 % de la variance totale, constituant ainsi l'axe principal de discrimination entre les groupes expérimentaux. Ce premier axe est fortement corrélé positivement avec les marqueurs de stress oxydatif — malondialdéhyde (MDA : $r = 0,9922$), glutathion S-transférase (GST : $r = 0,9663$) et catalase (CAT : $r = 0,9710$) — tandis qu'il est corrélé négativement avec l'acétylcholinestérase (AChE : $r = -0,9895$) et le glutathion réduit (GSH : $r = -0,9730$). L'axe F2 (2,88 % de variance) n'apporte que des variations mineures, sans structure biologique significative. L'ensemble de la distribution spatiale des individus sur le plan F1–F2 reflète une réponse biologique dose-dépendante au BPA, avec une transition nette du groupe témoin vers les groupes traités. L'analyse du biplot chez les mâles (**Figure 46b**) montre une structuration claire des groupes expérimentaux selon leur exposition au BPA. L'axe F1, qui explique 95,74 % de la variance, distingue nettement les individus témoins, associés à une forte activité de l'AChE et du GSH, des individus exposés (CL₂₅ et CL₅₀), orientés vers les marqueurs de stress oxydatif (GST, MDA, CAT). Cette répartition illustre un effet toxique dose-dépendant, où l'augmentation de la concentration en BPA entraîne une perturbation biochimique caractérisée par l'inhibition des défenses antioxydantes et l'activation des enzymes de détoxification.

Chez les femelles, l'ACP (**Figure 46, (c,d)**) présente une structure similaire avec un axe F1 dominant expliquant 97,92 % de la variance totale. L'opposition biologique reste marquée entre AChE ($r = -0,979$) et GSH ($r = -0,992$) d'un côté, et GST ($r = 0,998$), MDA ($r = 0,988$) et CAT ($r = 0,990$) de l'autre. Cette structuration traduit une dynamique comparable à celle observée chez les mâles, mettant en évidence une perturbation du métabolisme antioxydant et cholinergique sous exposition au BPA, avec une séparation claire entre les témoins et les groupes exposés, notamment CL₅₀. L'analyse du biplot chez les femelles (**Figure 46d**) révèle une structuration nette des groupes selon l'exposition au BPA. Les deux premiers axes expliquent 99,00 % de la variance totale, dont 97,92 % pour l'axe F1, principal discriminatoire des profils biochimiques. Cet axe oppose clairement les biomarqueurs protecteurs (AChE, GSH), associés aux témoins, aux marqueurs de stress oxydatif (GST, MDA, CAT), exprimés davantage chez les groupes exposés. La progression des groupes CL₂₅ et CL₅₀ vers les extrémités positives de F1 indique une réponse toxique dose-dépendante. L'axe F2, explique que 1,08 % de la variance, reflète des variations mineures sans impact significatif sur l'interprétation globale.

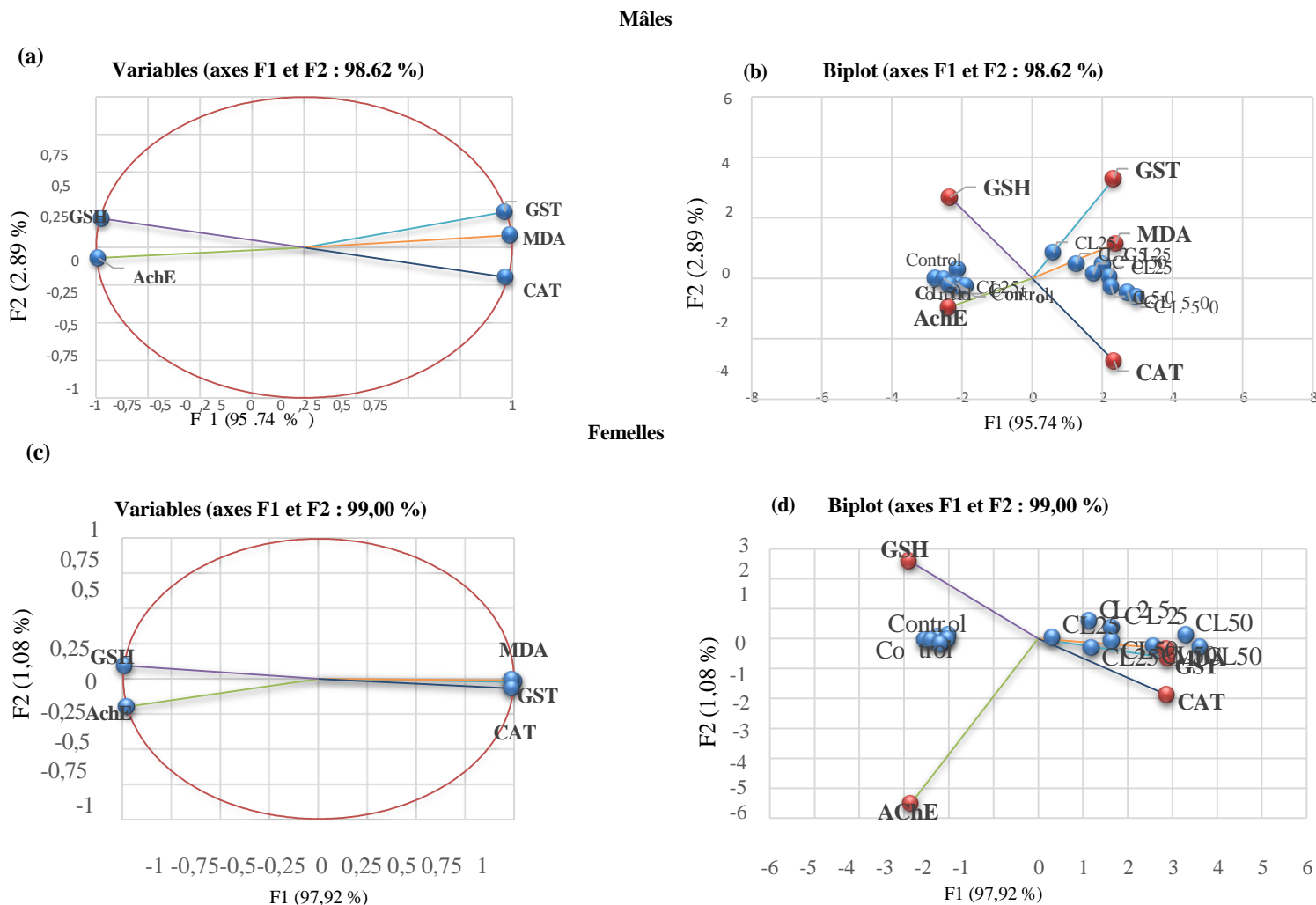


Figure 46. Analyse en composantes principales (ACP) des biomarqueurs de stress oxydatif chez les mâles et femelles de *Gambusia affinis* exposés au BPA. L'ACP a été réalisée à partir de cinq biomarqueurs de stress oxydatif : le glutathion réduit (GSH), le malondialdéhyde (MDA), la catalase (CAT), la glutathion S-transférase (GST) et l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE). Chez les mâles (Figure 46 a,b), les deux premiers axes F1 et F2 expliquent respectivement 95,74 % et 2,88 % de la variance totale, tandis que chez les femelles (Figure 46 c,d), ces axes représentent 97,92 % et 1,08 % de la variance. C = Témoin ; BPA = bisphénol A ; CL25/CL50 = concentrations testées ; J = jour d'exposition.

4. Effet du bisphénol a sur les réserves énergétiques de *Gambusia affinis*

L'évaluation des réserves énergétiques testiculaires chez les mâles de *Gambusia affinis* exposés au bisphénol A (CL₂₅ et CL₅₀) révèle une réponse métabolique significative, notamment au niveau des lipides et des protéines. Chez les individus traités, une accumulation progressive des lipides est observée dès les premières phases d'exposition. Le taux de lipides passe de $59,69 \pm 4,23$ µg/mg chez les témoins à $63,86 \pm 3,65$ µg/mg pour la concentration de 4,74 mg/L (CL₂₅), et atteint $78,16$ µg/mg pour la concentration de 7,74 mg/L (CL₅₀) dès le 15^e jour. Cette accumulation se poursuit jusqu'au 60^e jour d'exposition, où les séries traitées atteignent respectivement $82,17 \pm 2,91$ µg/mg pour CL₂₅ et $91,78 \pm 4,67$ µg/mg pour CL₅₀.

Parallèlement, une diminution progressive de la teneur en protéines testiculaires est observée chez les poissons exposés au BPA, tandis que les valeurs moyennes demeurent relativement stables chez les témoins. Une réduction significative est observée dès le 30^e jour d'exposition, avec des concentrations atteignant $38,72 \pm 2,89$ µg/mg pour la série traitée à 4,74 mg/L (CL₂₅) et $29,95 \pm 3,43$ µg/mg pour la concentration de 7,74 mg/L (CL₅₀), contre $47,72 \pm 4,23$ µg/mg chez les témoins. Cette diminution se poursuit jusqu'au 60^e jour, atteignant des niveaux extrêmement significatifs, avec des teneurs moyennes de $29,92 \pm 4,02$ µg/mg (CL₂₅) et $15,67 \pm 4,01$ µg/mg (CL₅₀).

L'analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA) appliquée aux taux de lipides et de protéines testiculaires chez *Gambusia affinis* a révélé des effets hautement significatifs du temps d'exposition, du traitement au bisphénol A (BPA), ainsi que de leur interaction. Concernant les lipides, le facteur temps ($F = 273,45$; $p < 0,0001$), le traitement ($F = 156,71$; $p < 0,0001$) et leur interaction ($F = 3,90$; $p < 0,0001$) influencent de manière significative l'accumulation lipidique observée. Cette évolution témoigne d'une réponse progressive et dose-dépendante à l'exposition au BPA. Pour les protéines, des effets similaires sont constatés avec des valeurs de F également très significatives pour le temps ($F = 49,70$; $p < 0,0001$), le traitement ($F = 96,22$; $p < 0,0001$) et leur interaction ($F = 0,64$; $p < 0,0001$).

Afin d'évaluer la significativité des différences entre les séries exposées aux concentrations de 4,74 mg/L (CL₂₅) et 7,74 mg/L (CL₅₀) de BPA, un test de Mann-Whitney a été appliqué aux valeurs moyennes des taux de lipides et de protéines testiculaires. Les résultats montrent qu'aucune différence significative n'a été observée pour les lipides entre les deux groupes ($p = 0,42$), bien qu'une accumulation lipidique plus importante soit notée à la concentration la plus élevée. En revanche, les taux de protéines révèlent une tendance plus marquée à la diminution dans le groupe CL₅₀, avec une différence significative ($p = 0,095$) (**Tableau 22 ; Figure 47**).

Tableau 22: Analyse de la variance à 2 critères de classification (temps, traitement) sur les réserves énergétiques : lipides et protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus), chez les mâles adultes de *G. affinis* en période de reproduction suite à une exposition chronique au BPA : CL_{25} (4,74 mg/L) et CL_{50} (7,74 mg/L).

Source de variation	Taux des lipides					Taux des protéines				
	DDL	SCE	CM	Fobs	P	DDL	SCE	CM	Fobs	P
Temps	4	2742,72	178,43	273,45	0,0001****	4	432,12	30,10	49,70	0,0001****
Traitement	2	154,98	83,76	156,71	0,0001****	2	98,96	48,98	96,22	0,0001****
Interaction	8	56,28	1,83	3,90	0,0001****	8	14,43	0,76	0,64	0,0001****
Résiduelle	60	45,60	0,0053			60	67,36	0,0095		
Totale	74					74				

DDL : degré de liberté ; SCE : somme des carrés des écarts ; CM : carré moyen ; Fobs : F observé ; P : niveau de signification.

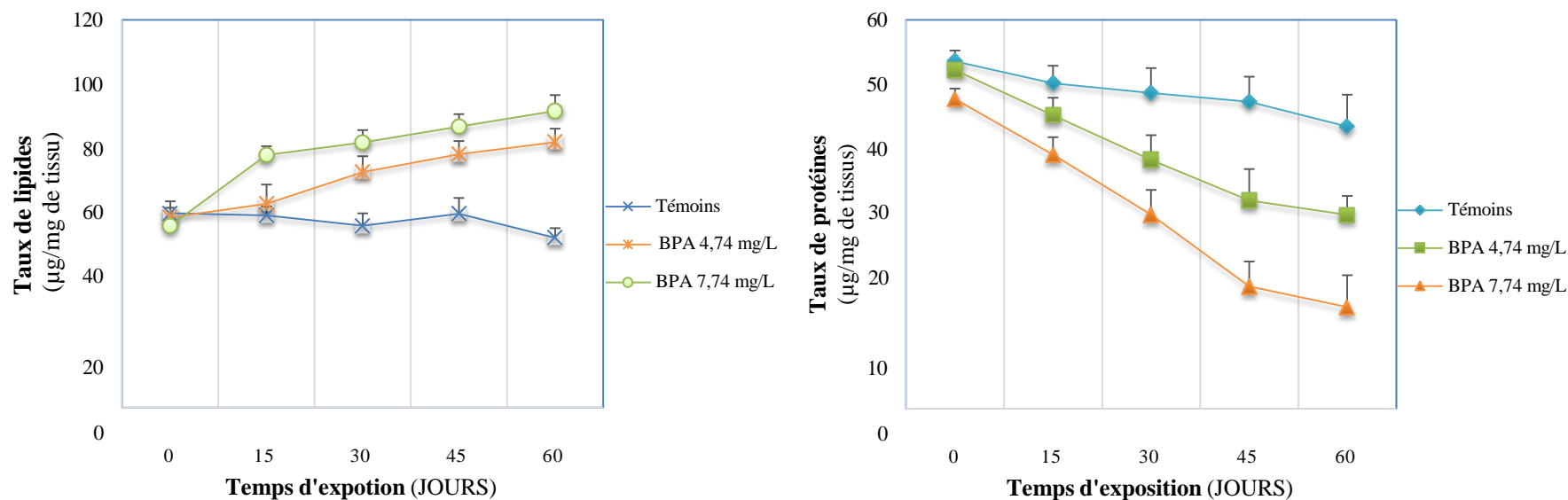


Figure 47. Variation du taux des réserves énergétiques : lipides et protéines ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissus) chez les adultes mâles de *Gambusia affinis* pendant la période de reproduction sexuelle, suite à une exposition chronique au BPA : CL_{25} (4,74 mg/L) et CL_{50} (7,74 mg/L) ; (Moyenne \pm SEM ; n = 5).

5. Etude histologiques testiculaires induites par le BPA chez *Gambusia affinis*

Les microphotographies représentatives de la Figure 47 illustrent des coupes transversales du tissu gonadique testiculaire de *Gambusia affinis*, comparant les individus témoins et ceux exposés au bisphénol A à la concentration CL₂₅ (4,74 mg/L) après 60 jours d'exposition.

L'analyse histologique des testicules de *Gambusia affinis* (**Figure 48**) révèle des différences structurelles marquées entre les poissons témoins et ceux exposés au bisphénol A. Chez les témoins (**Figure 48 A, B, C**), l'organisation de l'épithélium séminifère est bien conservée, avec la présence de tous les stades de la spermatogenèse : spermatogonies (Sg), spermatocytes (SC), spermatides (ST) et spermatozeugmata (SZM). Les cellules germinales au sein des kystes se développent de manière synchrone, et les spermatozoïdes matures (SP) apparaissent associés aux têtes sombres des cellules de Sertoli, reflétant une activité testiculaire fonctionnelle et intacte.

En revanche, les testicules des individus traités au BPA (**Figure 48 D, E, F**) présentent plusieurs altérations caractéristiques. On observe un amincissement de l'épithélium germinifère, une disposition désorganisée des kystes germinatifs, et une congestion des spermatozoïdes dans la lumière tubulaire. Ces modifications traduisent une altération significative de la spermatogenèse. Bien que la structure générale des tubules ne soit pas complètement effondrée, la dégradation de l'épithélium germinifère et l'absence de liaisons normales entre les cellules interstitielles et les cellules de Sertoli suggèrent une perturbation des processus de maturation germinale.

Aucun signe d'intersexualité n'a été observé, mais les modifications observées indiquent clairement une toxicité testiculaire induite par l'exposition chronique au BPA.

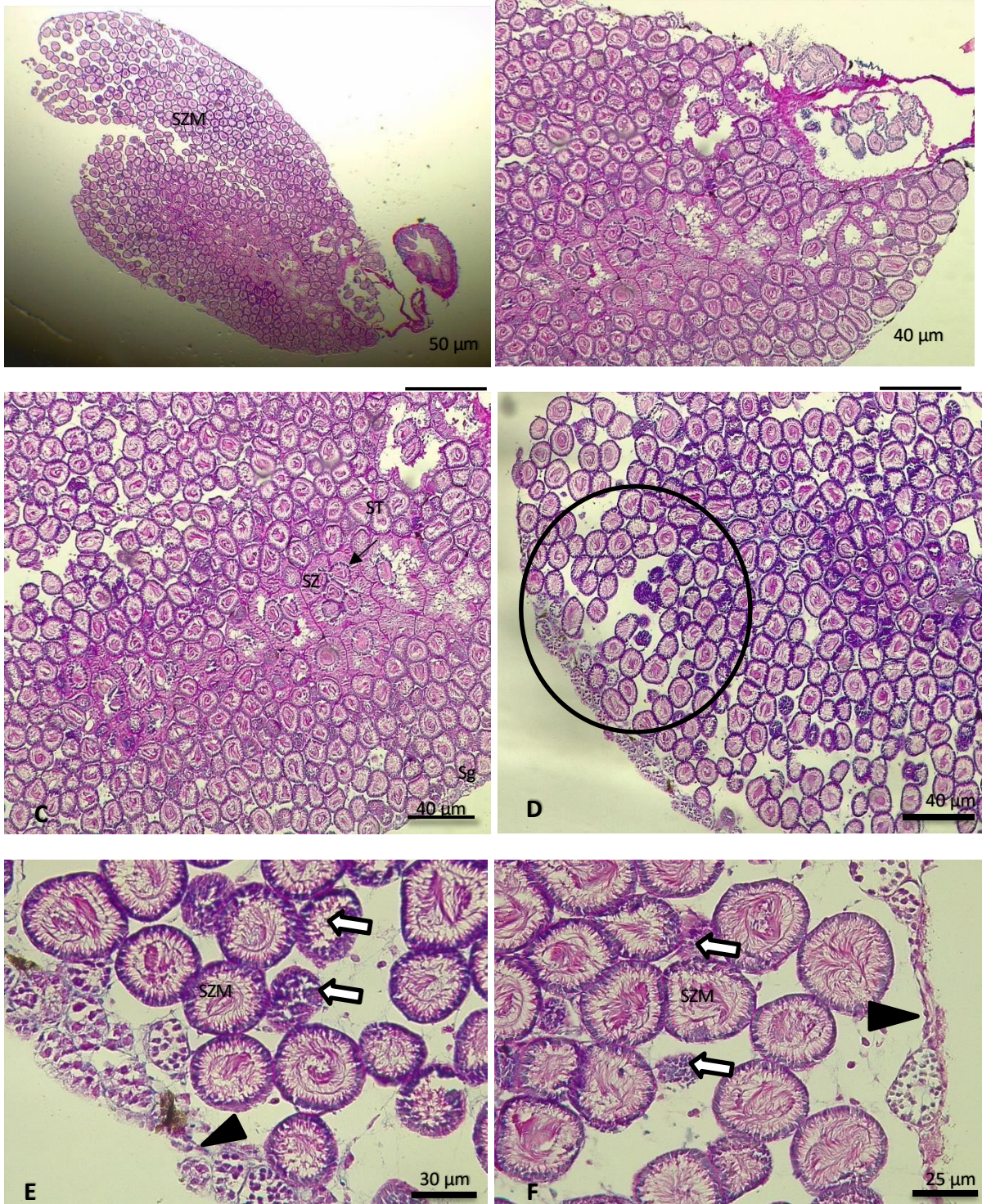


Figure 48. Histologie des testicules de *Gambusia affinis* de poissons témoins (A, B, C) et de poissons traités au BPA (D, E, F) montrant différents stades de la spermatogénèse. (A, B et C) Spermatogonies (Sg) à la périphérie du testicule, les cellules germinales dans les kystes sont à plusieurs stades de la spermatogénèse : spermatocyte (SC), spermatide (ST) et spermatozeugmata (SZM). Les types de cellules de chaque kyste se développent de manière synchrone. Les noyaux des spermatozoïdes (SP) sont associés aux têtes noires des cellules de Sertoli (barre d'échelle = 50 μ m). D, E et F section histologique de poissons traités au BPA montrant que la disposition des kystes est clairement perturbée (zone en cercle, D) avec un amincissement de l'épithélium germinal (flèche noire) entraînant une congestion des spermatozoïdes (têtes blanches).

Discussion

III. DISCUSSION

1. Toxicité aiguë du Bisphénol A

Les résultats obtenus mettent en évidence une toxicité aiguë dose-dépendante du bisphénol A, avec une corrélation claire entre l'augmentation de la concentration, la durée d'exposition et la mortalité observée. L'absence de mortalité naturelle chez le groupe témoin renforce la fiabilité des taux de mortalité corrigés, ce qui permet une évaluation plus précise de l'effet toxique du BPA.

La toxicité aiguë du bisphénol A chez les femelles adultes de *Gambusia affinis* suscite un intérêt croissant en raison de ses effets potentiels sur les fonctions physiologiques, métaboliques et reproductives. Si les effets chroniques du BPA sont bien documentés, les données récentes montrent que même une exposition brève peut entraîner des perturbations biologiques notables. Dès les premières 24 heures, les concentrations faibles (15 et 20 mg/L) induisent une mortalité modérée, suggérant une toxicité limitée à court terme. En revanche, une augmentation marquée de la mortalité est observée à partir de 25 mg/L, traduisant un seuil de concentration au-delà duquel la toxicité aiguë devient rapidement significative. Ces observations s'inscrivent dans la logique classique de la toxicologie, selon laquelle l'intensité des effets augmente avec la concentration. Un aspect particulièrement notable est l'effet cumulatif du BPA au fil du temps, des concentrations modérément toxiques à 24 heures deviennent fortement létales après 72 à 96 heures. En particulier, une exposition à 15 mg/L entraîne une mortalité de 13,33 % à 24 h, qui s'élève à 60 % après 72 h, puis 73,33 % à 96 h. Ce profil d'évolution suggère une accumulation progressive du contaminant dans l'organisme, aboutissant à une intensification des dommages cellulaires et des défaillances physiologiques. À partir de 20 mg/L, la toxicité devient particulièrement sévère, avec des taux de mortalité compris entre 70 et 90 % en seulement 48 à 72 heures. Cette réponse rapide indique des perturbations métaboliques aiguës, souvent irréversibles. La toxicité ainsi devient significative à partir de 25 mg/L dès 24 heures d'exposition, tandis que les concentrations de 15 et 20 mg/L n'induisent que des mortalités modérées aux premières phases, mais atteignent 60 à 83 % après 72 à 96 heures, confirmant l'effet cumulatif.

En revanche, chez les mâles adultes de *Gambusia affinis* l'exposition aiguë au bisphénol A a été réalisée à travers une série de concentrations croissantes (5, 10, 15, 20 et 25 mg/L), déterminées à la suite d'essais préliminaires. Comme pour les femelles, aucune mortalité naturelle n'a été observée dans le lot témoin, ce qui a permis d'attribuer l'ensemble des mortalités enregistrées à l'effet direct du contaminant.

Dès 24 heures d'exposition, une réponse toxique claire apparaît chez les mâles. À 10 mg/L et 15 mg/L, les mortalités atteignent respectivement 33,33 % et 36,67 %, traduisant une toxicité initiale modérée. Toutefois, à partir de 20 mg/L, une nette augmentation est observée, avec des taux de mortalité atteignant 70,00 %, et jusqu'à 83,33 % à 25 mg/L. Ces résultats indiquent que les concentrations moyennes et élevées entraînent une toxicité aiguë rapide, visible dès les premières heures d'exposition. À 48 heures, la progression de la mortalité en fonction de la concentration devient encore plus marquée. Le BPA provoque 43,33 % de mortalité à 15 mg/L, 76,67 % à 20 mg/L, et 86,67 % à 25 mg/L. Fait notable, même à la concentration la plus faible (5 mg/L), on enregistre déjà une mortalité de 30,00 %, ce qui révèle une toxicité non négligeable à faible concentration après deux jours. À 72 heures, les effets sont accentués. Les concentrations de 20 et 25 mg/L entraînent respectivement 93,33 % et 100 % de mortalité. La concentration de 5 mg/L maintient un niveau de mortalité modéré (30,00 %), mais montre des signes d'accumulation toxique. Après 96 heures, la mortalité continue d'augmenter, notamment à 15 mg/L (83,33 %), 20 mg/L (96,67 %), et 25 mg/L (100 %). Les concentrations initialement modérées deviennent fortement toxiques : à 5 mg/L, la mortalité atteint 43,33 %, et à 10 mg/L, elle monte à 83,33 %. Ces résultats soulignent un effet cumulatif évident, où des concentrations relativement faibles deviennent mortelles à mesure que l'exposition se prolonge.

L'analyse croisée des données expérimentales met en évidence une toxicité aiguë du bisphénol A à la fois dose-dépendante et cumulative chez *Gambusia affinis*, avec toutefois des différences notables entre les sexes. Les mâles présentent une sensibilité marquée dès les premières 24 heures d'exposition, avec des mortalités élevées à partir de 10 mg/L, tandis que les femelles réagissent de manière plus progressive, avec une augmentation significative de la mortalité principalement au-delà de 72 heures. À concentration équivalente, la cinétique de réponse est donc plus rapide chez les mâles que chez les femelles.

Ces différences peuvent s'expliquer par des mécanismes physiologiques, hormonaux et métaboliques différenciés. Chez les mâles, la réponse aiguë pourrait être liée à une moindre capacité de détoxification hépatique ou à une perméabilité cellulaire plus élevée au BPA. Cela rejoint les conclusions de [Jeon et al. \(2024\)](#), qui ont mis en évidence chez le poisson-zèbre une perturbation marquée du métabolisme lipidique hépatique chez les mâles exposés au BPA, accompagnée d'un stress oxydatif important dès 48 heures d'exposition. Ces altérations systémiques précoces pourraient expliquer la mortalité accélérée chez les mâles de *Gambusia affinis*.

De leur côté, les femelles semblent accumuler les effets toxiques de manière plus progressive, ce qui pourrait être lié à une réponse hormonale modulée par des cycles reproductifs ou à une meilleure capacité d'adaptation métabolique initiale. Toutefois, après 72 à 96 heures, elles atteignent également des niveaux de mortalité élevés à des concentrations similaires, ce qui démontre un effet cumulatif manifeste. L'étude de [Sanz et al. \(2024\)](#), sur des embryons de poisson-zèbre, a également révélé des profils d'expression génique différents entre mâles et femelles exposés au BPA, notamment sur les gènes impliqués dans la réponse au stress et la régulation hormonale. Les travaux de [Xu et al. \(2025\)](#), menés chez l'oursin marin *Heliocidaris crassispina*, ont mis en évidence que les mâles subissent une désorganisation cellulaire reproductrice plus rapide que les femelles, ce qui souligne une tendance interspèce selon laquelle les mâles pourraient être plus vulnérables aux polluants endocriniens lors d'expositions aiguës.

La modélisation toxicologique réalisée par [Vračko et Lagares \(2024\)](#) sur différentes espèces aquatiques a également permis d'identifier une tendance constante : à dose égale, les mâles atteignent souvent plus rapidement les seuils critiques de toxicité aiguë, en raison de différences dans les processus de métabolisation et de distribution du contaminant dans les tissus. Ainsi que l'étude comparative de [Wang et al. \(2024\)](#) sur le BPA et ses analogues renforce l'idée que la réponse toxique dépend fortement de facteurs biologiques tels que le sexe, l'âge ou le stade physiologique. Ils soulignent l'importance d'inclure ces variables dans l'évaluation des risques environnementaux, afin de mieux prédire les impacts à l'échelle des populations.

Les données obtenues dans notre étude chez *Gambusia affinis* confirment que le bisphénol A provoque une toxicité aiguë significative chez les deux sexes, bien que les dynamiques d'apparition et les seuils de sensibilité diffèrent. Cette double sensibilité a également été

rapportée par Wang et al. (2019) chez le carassin doré (*Carassius auratus*), où une exposition aiguë au BPA a entraîné des perturbations morphologiques et fonctionnelles sévères dans les gonades des mâles et des femelles. Chez les mâles, les chercheurs ont observé une apoptose cellulaire marquée dans les testicules dès les premières 96 heures, tandis que chez les femelles, une réduction significative de la croissance ovarienne et de l'activité hormonale a été constatée. Ces effets sont similaires à ceux enregistrés dans notre expérimentation, où les mâles présentaient une mortalité rapide dès 10 mg/L à 24 h, et où les femelles montraient une toxicité progressive culminant à 96 h.

2. Effet sur les indices biométriques

2.1 Effet sur l'indice Gonado-Somatique

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'exposition chronique au bisphénol A affecte significativement l'IGS chez les femelles de *Gambusia affinis*. Dès 72 heures d'exposition à la concentration CL₅₀ (9,37 mg/L), une diminution marquée est observée, et cette baisse se poursuit tout au long de l'expérimentation, atteignant des niveaux critiques au 60^e jour. À la concentration CL₂₅ (6,81 mg/L), une baisse progressive mais significative est également constatée, soulignant une réponse en fonction de la dose et du temps. Contrairement aux témoins, dont l'IGS suit une progression normale au cours du temps, les femelles exposées au BPA présentent une stagnation, puis une régression de l'indice. Cela suggère une altération du développement ovarien, probablement liée à une perturbation du système endocrinien. L'analyse de la variance (ANOVA) a révélé des effets hautement significatifs des facteurs temps, traitement et de leur interaction, confirmant la validité statistique des résultats. Ces données rejoignent celles de Wang et al. (2019), qui ont mis en évidence un ralentissement de la croissance ovarienne chez des femelles de *Carassius auratus* exposées au BPA. De même, Sanz et al. (2024) ont observé une altération des marqueurs du développement reproducteur chez des embryons femelles de poisson-zèbre exposés à des analogues du BPA. Ces études confirment que le BPA est capable de perturber le système reproducteur chez les femelles, même à des concentrations modérées. La baisse de l'IGS dès les premières 72 heures d'exposition suggère une action rapide du BPA, possiblement par une interférence avec les récepteurs hormonaux impliqués dans la maturation des ovocytes. Le BPA est connu pour perturber l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique en mimant ou en bloquant l'action des œstrogènes, ce qui pourrait inhiber la sécrétion de gonadotrophines nécessaires à la croissance folliculaire.

À long terme, l'effet cumulatif est évident : l'IGS chute jusqu'à des valeurs très faibles, atteignant $7,59 \pm 1,15$ dans le groupe CL₅₀ au 60^e jour. Cela suggère une inhibition presque complète de l'activité ovarienne. Un tel effondrement de l'IGS pourrait être indicatif d'une stérilité fonctionnelle si l'exposition au BPA se poursuit, même à des concentrations environnementalement réalistes. Ces résultats indiquent que l'IGS constitue un bon indicateur biologique des effets sublétaux du BPA, en particulier dans le cadre d'expositions prolongées. Sa sensibilité permet de détecter des altérations physiologiques précoces avant même l'apparition d'effets létaux, ce qui est essentiel pour l'évaluation des risques environnementaux associés aux polluants à activité endocrinienne. Ces résultats rejoignent ceux de plusieurs travaux récents. Notamment, l'étude de [Nam et al. \(2024\)](#) sur le *Java medaka* (*Oryzias javanicus*) a mis en évidence une réduction significative de l'IGS chez les femelles exposées chroniquement au BPA, associée à une baisse drastique de la ponte et à une altération histologique des gonades. Ces auteurs soulignent que la perturbation endocrinienne induite par le BPA entraîne un dérèglement hormonal systémique, affectant directement le cycle de reproduction.

L'indice gonado-somatique (IGS) chez les mâles de *Gambusia affinis* a montré une diminution marquée et rapide dès les premiers jours d'exposition au bisphénol A. Une baisse significative de l'IGS est observée dès le 15^e jour à la concentration CL₅₀ (7,74 mg/L), avec une valeur moyenne de $0,37 \pm 0,009$. Cette tendance se retrouve également à la concentration CL₂₅ (4,74 mg/L), bien que de manière légèrement moins prononcée ($0,44 \pm 0,02$), par rapport aux témoins qui présentent une valeur stable de $0,55 \pm 0,01$. À la fin de la période expérimentale, soit au 60^e jour, l'IGS continue de diminuer de manière significative, atteignant $0,30 \pm 0,01$ pour le groupe CL₂₅ et $0,22 \pm 0,02$ pour le groupe CL₅₀. Ces valeurs reflètent une réduction soutenue du développement des gonades chez les mâles, traduisant une inhibition progressive de la fonction reproductive.

2.2 Comparaison intersexués de l'indice Gonado-Somatique

Ces résultats confirment que les mâles de *Gambusia affinis* sont sensibles aux effets chroniques du BPA, même à des concentrations relativement modérées. La chute rapide et persistante de l'IGS indique une altération du développement testiculaire, probablement liée à une perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, comme observé dans d'autres études. Par exemple, [Wang et al. \(2019\)](#) ont mis en évidence des effets similaires chez les mâles

de *Carassius auratus*, avec une dégénérescence testiculaire et une baisse de la production de spermatozoïdes en réponse à une exposition prolongée au BPA. Des résultats analogues ont été rapportés par [Srivastava et Reddy \(2021\)](#) ont documenté chez *Heteropneustes fossilis* une baisse significative de l'IGS accompagnée d'altérations histopathologiques des testicules après exposition au BPA, avec des lésions sévères telles que la dégénérescence des tubules séminifères. De même, [Ribeiro et al. \(2021\)](#) ont observé chez *Astyanax lacustris* une réduction de l'IGS et une désorganisation cellulaire dans les gonades des mâles, démontrant que le BPA affecte non seulement la masse des gonades mais aussi leur structure fonctionnelle. [Forner-Piquer et al. \(2019\)](#), aussi ont rapporté une baisse de l'IGS et des dommages testiculaires confirmés par histologie, chez *Sparus aurata*, renforçant l'idée que le BPA exerce un effet inhibiteur transversal sur la spermatogenèse.

Chez les mâles de *Gambusia affinis*, la diminution de l'indice gonado-somatique (IGS) est précoce et marquée, apparaissant dès les premiers jours d'exposition au BPA, et se poursuivant de manière soutenue jusqu'à la fin de l'expérimentation. À l'inverse, chez les femelles, bien que la baisse soit également significative, elle s'installe de façon plus progressive, avec des valeurs critiques atteintes majoritairement vers la fin de la période d'exposition. Cette asymétrie temporelle dans la réponse biologique suggère que les mâles sont plus sensibles que les femelles aux effets chroniques du BPA sur la fonction gonadique. Cette plus grande vulnérabilité des mâles pourrait être liée à plusieurs facteurs : une structure testiculaire plus directement affectée par le stress oxydatif induit par le BPA, un métabolisme hormonal plus rapide, ou encore une moindre capacité de compensation endocrinienne face à la perturbation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études scientifiques. [Jeon et al. \(2024\)](#) ont montré que chez *Danio rerio*, les mâles présentent une altération plus rapide du métabolisme reproducteur que les femelles, notamment en raison d'une réponse hépatique et hormonale immédiate face au BPA. De plus, [Forner-Piquer et al. \(2019\)](#) ont mis en évidence chez *Sparus aurata* une réduction significative de l'IGS et des dommages histologiques testiculaires survenant rapidement après exposition, tandis que les effets sur les femelles étaient plus tardifs. De même, [Srivastava et Reddy \(2021\)](#) ont observé chez *Heteropneustes fossilis* une dégénérescence marquée des testicules dès les premières semaines, suggérant une atteinte rapide des fonctions de reproduction mâle.

Ces données renforcent l'idée que les effets du BPA sur la reproduction sont non seulement dose-dépendants, mais également sexuellement différenciés, avec une réactivité plus rapide et plus sévère chez les mâles. Kang *et al.* (2002) avaient déjà souligné cette distinction en observant une réduction significative de l'IGS et une altération structurale des gonades mâles de *Oryzias latipes*, comparativement aux femelles dont les réponses semblaient amorties sur le plan histologique.

2.3 Effet sur l'indice hépato-somatique

L'indice hépato-somatique (IHS), qui reflète la masse relative du foie par rapport au poids corporel total, est un indicateur bioénergétique et physiologique sensible, souvent utilisé pour évaluer l'impact de substances toxiques sur le métabolisme hépatique chez les poissons. Dans cette étude, l'exposition chronique au BPA a induit une augmentation significative et progressive de l'IHS chez les deux sexes de *Gambusia affinis*, bien que la cinétique et l'intensité de la réponse varient entre les mâles et les femelles.

Chez les femelles, les effets sur l'IHS ne se manifestent qu'à partir de 45 jours d'exposition, et de manière différenciée selon la concentration. Une augmentation significative est d'abord détectée à la concentration CL₅₀ (9,37 mg/L), suivie d'une élévation à CL₂₅ (6,81 mg/L) au 60^e jour. Ces résultats suggèrent une réponse hépatique cumulative, traduisant probablement une surcharge métabolique progressive ou une accumulation hépatique du BPA, liée à des mécanismes de détoxification plus lents ou plus complexes chez les femelles.

En revanche, chez les mâles, une augmentation de l'IHS est observée dès le 15^e jour à la concentration CL₅₀, et devient hautement significative au 30^e jour, atteignant $0,20 \pm 0,01$ contre $0,12 \pm 0,01$ chez les témoins. Cette réponse précoce témoigne d'une sensibilité hépatique plus immédiate, probablement en lien avec une mobilisation métabolique accélérée pour tenter de neutraliser ou d'éliminer le contaminant. À partir du 45^e jour, l'IHS augmente également à CL₂₅, et au 60^e jour, il atteint des valeurs comparables à celles des femelles traitées, indiquant une réaction hépatique marquée dans les deux sexes, mais selon des dynamiques distinctes.

Ces résultats sont en accord avec les observations de Mi *et al.* (2021) chez *Gobiocypris rarus*, où une exposition au BPA a induit une accumulation de triglycérides dans le foie, associée à une augmentation de l'IHS chez les mâles, dès les premières semaines d'exposition. De même, Chakraborty *et al.* (2023) ont rapporté une augmentation significative de l'IHS chez

Oryzias latipes après exposition transgénérationnelle au BPA, avec une réponse différenciée entre mâles et femelles, les femelles présentant des effets plus retardés mais persistants.

En outre, [Zahran et al. \(2020\)](#) ont mis en évidence chez *Oreochromis niloticus* une augmentation marquée de l'IHS chez les mâles exposés à des eaux usées contenant du BPA, accompagnée de modifications histopathologiques du foie, telles que des foyers inflammatoires et des lésions des hépatocytes.

2.4 Comparaison intersexués de l'indice hépato-somatique

La différence de temporalité dans la réponse hépatique observée entre les mâles et les femelles de *Gambusia affinis* peut être attribuée à des facteurs physiologiques et hormonaux distincts. Chez les femelles, le cycle reproductif et les exigences énergétiques liées à la vitellogenèse peuvent entraîner une priorisation métabolique qui retarde l'activation des mécanismes hépatiques de détoxification. À l'inverse, les mâles semblent activer plus rapidement leur système hépatique en réponse à l'exposition au BPA, ce qui se traduit par une élévation plus précoce de l'IHS.

Ce décalage de réponse entre les sexes est en accord avec plusieurs études antérieures. Par exemple, [Chakraborty et al. \(2023\)](#) ont montré chez *Oryzias latipes* que l'exposition transgénérationnelle au BPA induit une augmentation marquée de l'IHS, avec des effets plus durables chez les femelles. À l'opposé, [Zahran et al. \(2020\)](#) ont rapporté une réponse hépatique plus immédiate chez les mâles *Oreochromis niloticus* exposés à un mélange de xénostéroïdes incluant du BPA, ce qui appuie l'idée d'une réactivité hépatique masculine plus rapide.

De plus, les résultats de [Mi et al. \(2021\)](#) chez *Gobiocypris rarus* ont mis en évidence une augmentation significative de l'IHS chez les mâles dès la troisième semaine d'exposition, corrélée à une accumulation de triglycérides dans le foie. Cette observation suggère une stimulation du métabolisme lipidique hépatique induite par le BPA, susceptible d'expliquer l'hypertrophie hépatique observée. L'étude de [Naderi et al. \(2014\)](#) chez *Danio rerio* a montré que l'exposition prolongée au bisphénol S (BPS), un analogue du BPA, entraîne une élévation de l'IHS chez les deux sexes, mais avec des profils de réponse modulés selon le sexe, la concentration et le stade de développement.

Ces travaux confirment que l'indice hépato-somatique constitue un biomarqueur fiable de la détresse hépatique induite par les perturbateurs endocriniens comme le BPA. Ils soulignent également l'importance de considérer le sexe et les caractéristiques métaboliques propres à chaque individu dans l'évaluation de la toxicité chronique de ces composés.

2.5 Effet sur l'indice de condition

L'indice de condition (K) est un paramètre morphométrique utile pour évaluer l'état de santé général des poissons. Il reflète la relation entre le poids et la longueur du corps et permet d'estimer les réserves énergétiques ainsi que l'équilibre physiologique de l'individu. Dans cette étude, l'exposition chronique au bisphénol A a entraîné une baisse significative de l'indice de condition chez les mâles et les femelles de *Gambusia affinis*, avec des différences marquées dans la dynamique temporelle et l'intensité de la réponse.

Chez les femelles, aucune différence statistiquement significative n'a été observée pendant les 45 premiers jours d'exposition, même à la concentration la plus élevée (CL₅₀). Ce délai de réponse pourrait traduire une phase de compensation métabolique durant laquelle les mécanismes physiologiques sont mobilisés pour maintenir la reproduction et le métabolisme énergétique. Toutefois, à partir du 45^e jour, une diminution importante de l'indice de condition est enregistrée à la concentration CL₅₀. Ce déclin peut être attribué à une dégradation de la fonction hépatique ou à une altération de l'absorption des nutriments, affectant directement la réserve corporelle. À la concentration CL₂₅, en revanche, aucune variation significative de K n'a été détectée sur l'ensemble de la période, suggérant une capacité de tolérance plus élevée à cette concentration.

Chez les mâles, la réponse est plus précoce. Une baisse significative de l'indice de condition est détectée dès le 30^e jour, aussi bien à CL₂₅ qu'à CL₅₀. Cette réponse rapide indique une déstabilisation plus immédiate de l'équilibre énergétique et physiologique, probablement en lien avec une activité hépatique accrue face au stress chimique ou une mobilisation plus rapide des réserves métaboliques.

Ces résultats sont soutenus par plusieurs études similaires. [Ribeiro et al. \(2021\)](#) ont montré que l'exposition au BPA chez *Astyanax lacustris* provoque une diminution de l'indice de condition, corrélée à des perturbations métaboliques hépatiques. De même, [Mi et al. \(2021\)](#) ont observé chez *Gobiocypris rarus* une réduction de K associée à un déséquilibre lipidique,

résultant d'une perturbation des voies de régulation de l'énergie. Ces études, tout comme les données obtenues ici, suggèrent que l'exposition au BPA altère le métabolisme global, avec des effets visibles sur la masse corporelle et la réserve énergétique.

2.6 Comparaison intersexués de l'indice de condition

Les différences observées entre les sexes dans la réponse au BPA peuvent être attribuées à des priorités métaboliques distinctes. Chez les femelles, une proportion importante de l'énergie est mobilisée pour des fonctions reproductives spécifiques, telles que la vitellogenèse, ce qui pourrait retarder la mise en place de réponses physiologiques au stress toxique. Ce phénomène est cohérent avec les résultats de [Forner-Piquer et al. \(2019\)](#), qui ont montré que l'activation de la vitellogenèse chez *Sparus aurata* pouvait masquer temporairement les altérations métaboliques induites par le BPA, réduisant la réactivité des biomarqueurs comme l'indice de condition à court terme.

À l'inverse, chez les mâles, l'absence de vitellogenèse et de fonctions associées au stockage des réserves énergétiques pour la reproduction favorise une mobilisation métabolique immédiate en réponse au stress environnemental. Cette mobilisation rapide explique la baisse précoce de l'indice de condition observée dans cette étude. Ces résultats rejoignent ceux de [Sun et al. \(2020\)](#), qui ont démontré chez des poissons mâles que le BPA pouvait induire une féminisation métabolique en modifiant les voies de signalisation de l'AMPK et de mTOR, altérant la gestion énergétique et entraînant une chute de la condition corporelle. Une étude de [Liu et al. \(2021\)](#) sur *Hippocampus erectus* confirme également une altération marquée de l'état corporel chez les mâles exposés au BPA à des concentrations environnementales. Les auteurs y rapportent une baisse significative de l'indice de condition, accompagnée d'une accumulation hépatique de lipides et d'un déséquilibre endocrinien, corroborant l'idée d'une vulnérabilité masculine accrue face aux perturbateurs endocriniens.

[Rajapaksa et al. \(2024\)](#) ont récemment démontré chez *Danio rerio* que l'exposition à long terme au BPA entraînait une diminution marquée du facteur de condition chez les deux sexes, mais avec une cinétique plus rapide chez les mâles. Cette différence est expliquée par une activation plus précoce des voies métaboliques de détoxification chez les mâles, alors que les femelles, en période de reproduction, maintiennent prioritairement leur métabolisme reproductif.

En définitive, les différences entre mâles et femelles dans la variation de l'indice de condition (K) reflètent une divergence des priorités physiologiques et des stratégies de réponse métabolique. Ces résultats confirment que l'indice de condition est un biomarqueur sensible et utile pour détecter des altérations sublétales induites par le BPA, en tenant compte des variations intersexes.

3. Effet du Bisphénol a sur les biomarqueurs de dommage

3.1 Effet sur l'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme clé du système nerveux, responsable de la dégradation de l'acétylcholine au niveau des synapses. Sa sensibilité à divers contaminants chimiques, notamment les perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A (BPA), en fait un biomarqueur de choix pour évaluer les effets neurotoxiques sublétaux chez les poissons.

Dans cette étude, une inhibition significative de l'activité de l'AChE a été observée chez les mâles et les femelles de *Gambusia affinis* exposés chroniquement au BPA. Chez les mâles, la baisse de l'activité enzymatique est apparue dès le 15^e jour d'exposition, avec une inhibition marquée à la concentration CL₅₀, et des valeurs atteignant un minimum de 2,16 nM/min/mg au 60^e jour. Chez les femelles, l'inhibition s'est installée de manière plus progressive, avec des différences significatives à partir du 30^e jour et des valeurs minimales à 3,17 nM/min/mg à CL₅₀ après 60 jours.

Les analyses statistiques ont mis en évidence des effets significatifs du temps d'exposition, de la concentration de BPA, et de leur interaction, sur l'activité de l'AChE dans les deux sexes. Les tests non paramétriques ont également révélé une sensibilité plus marquée chez les mâles à partir du 15^e jour, avec des écarts plus prononcés entre les groupes à 30 et 45 jours. Ces observations sont cohérentes avec plusieurs travaux antérieurs. [Carnevali et al. \(2018\)](#) ont rapporté une inhibition précoce de l'AChE chez *Danio rerio* exposé au BPA, avec des effets comportementaux associés. [Qu et al. \(2019\)](#) ont démontré que le BPA et certains de ses analogues réduisent significativement l'activité de l'AChE chez *Carassius auratus*, accompagnés d'altérations morphologiques des tissus nerveux.

Chez *Oreochromis niloticus*, [Kassim et al. \(2021\)](#) ont montré une diminution marquée de l'activité enzymatique chez les mâles exposés au BPA, mettant en évidence une plus grande

vulnérabilité enzymatique par rapport aux femelles. Cette différence de réponse pourrait être liée à une activation plus intense du métabolisme hépatique chez les mâles, facilitant la conversion du BPA en métabolites plus réactifs. L'étude de [Ribeiro et al. \(2021\)](#) souligne que la réponse de l'AChE au BPA est également influencée par la température et le métabolisme basal, ce qui peut expliquer certaines variations dans l'évolution de l'activité enzymatique observées au fil du temps. De manière complémentaire, [Oliveira et al. \(2022\)](#) ont mis en évidence un phénomène de récupération partielle de l'activité de l'AChE après exposition prolongée, ce qui pourrait expliquer la tendance à la réduction des différences entre les concentrations à 60 jours observée dans cette étude. Ces résultats confirment l'intérêt de l'AChE en tant que biomarqueur neurotoxique fiable et sensible à l'exposition chronique au BPA. Son comportement différencié entre les sexes et sa réactivité dès les premières phases de l'exposition en font un indicateur pertinent pour l'évaluation des effets sublétaux de polluants environnementaux sur les poissons.

3.2 Comparaison intersexuée de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'analyse comparative entre les mâles et les femelles de *Gambusia affinis* révèle une différence notable dans la réponse enzymatique à l'exposition chronique au bisphénol A (BPA). Chez les mâles, la baisse de l'activité de l'AChE est apparue précocement, dès le 15^e jour d'exposition, et s'est accentuée avec le temps, notamment à la concentration la plus élevée (CL₅₀). Cette inhibition rapide traduit une sensibilité neurotoxique marquée, potentiellement liée à une mobilisation métabolique plus immédiate du foie et à une production accrue de métabolites réactifs du BPA, capables d'inhiber directement l'enzyme. Chez les femelles, bien que l'inhibition de l'AChE soit également significative, elle s'installe de manière plus progressive. Les premières différences nettes par rapport au groupe témoin n'apparaissent qu'à partir du 30^e jour d'exposition, suggérant une forme de résistance initiale ou un décalage dans l'activation des voies de détoxification. Ce phénomène pourrait être attribué à une priorisation métabolique en faveur de la reproduction, comme la vitellogenèse, mobilisant les ressources hépatiques au détriment des mécanismes de défense neurochimique immédiats.

Ces observations rejoignent celles de [Kim et al. \(2022\)](#) qui ont étudié les effets neurotoxiques d'un analogue du BPA (le bisphénol F) sur le cerveau de *Danio rerio*, en montrant une inhibition dose-dépendante de l'AChE chez les deux sexes, avec une réponse plus marquée chez les mâles.

Vega-López *et al.* (2024) ont démontré que l'activité de l'AChE dans le cerveau des *Oreochromis niloticus* est fortement réduite par l'exposition au BPA, avec des différences significatives entre les sexes selon la dose et la durée. Ils ont observé que les mâles expriment des altérations enzymatiques et histologiques plus précoces que les femelles. Heredia-García *et al.* (2023) ont confirmé que des concentrations environnementalement réalistes de BPA provoquent une inhibition de l'AChE dans le cerveau des *Danio rerio*, avec des différences de réponse entre les sexes corrélées à l'intensité de stress oxydatif. En définitive, la comparaison entre les sexes met en évidence une réponse neurotoxique différenciée au BPA : les mâles présentent une inhibition plus rapide et marquée de l'AChE, tandis que chez les femelles, cette réponse est plus progressive, mais atteint des niveaux similaires en fin d'exposition.

3.3 Effet sur Le Glutathione-S Transferase (GST)

L'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST), enzyme clé du système de détoxification cellulaire chez les poissons, a montré une induction progressive et significative en réponse à l'exposition chronique au bisphénol A (BPA). Cette augmentation traduit une activation du métabolisme de phase II, dont la fonction principale est la conjugaison des substances toxiques au glutathion, facilitant leur neutralisation et leur élimination. Chez les mâles, l'augmentation de l'activité enzymatique est apparente dès le 15^e jour, notamment à la concentration CL₅₀, et s'intensifie jusqu'au 45^e jour. Cette élévation rapide suggère une réponse adaptative immédiate à l'agression chimique. Toutefois, une légère diminution est observée au 60^e jour, ce qui pourrait traduire un phénomène de régulation négative ou un épuisement des capacités enzymatiques après une stimulation prolongée. Chez les femelles, l'induction de la GST est plus progressive, atteignant des valeurs enzymatiques maximales au 45^e jour, supérieures à celles observées chez les mâles. À la concentration CL₅₀, l'activité GST dépasse 1,9 µM/min/mg, ce qui indique une réponse métabolique soutenue. Cette dynamique pourrait être liée à une sollicitation hépatique accrue, possiblement en rapport avec les processus physiologiques de reproduction comme la vitellogénèse, qui mobilisent intensément les ressources hépatiques.

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec plusieurs recherches menées sur d'autres espèces de poissons exposés au bisphénol A (BPA), qui ont également mis en évidence une induction marquée de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) en réponse à une exposition prolongée. Qiu *et al.* (2016) ont observé chez *Oryzias latipes* que l'expression des

gènes liés au stress oxydatif, y compris la GST, était modulée différemment selon le sexe. Les mâles présentaient une induction enzymatique précoce, similaire à celle relevée chez *Gambusia affinis* dans notre étude, tandis que la réponse chez les femelles était plus tardive mais d'amplitude plus élevée. Ces résultats confortent l'idée d'une dynamique de réponse enzymatique différenciée entre les sexes. [Karami et Courtenay \(2015\)](#), en étudiant *Clarias gariepinus*, ont mis en évidence une variabilité de l'activité GST selon le sexe, le temps d'exposition et la concentration du contaminant. Ils ont également souligné que les mâles montraient une sensibilité métabolique accrue aux faibles doses, tandis que les femelles développaient des réponses plus importantes à long terme, ce qui correspond aux tendances observées dans notre expérience. [Rhee et al. \(2008\)](#), en travaillant sur *Kryptolebias marmoratus*, une espèce hermaphrodite, ont montré que la régulation du gène GSTM était influencée par des signaux endocriniens différenciés selon les tissus et le sexe phénotypique, confirmant ainsi le rôle du contexte hormonal dans la modulation de cette enzyme. [Sun et al. \(2019\)](#) ont démontré chez *Danio rerio* que l'exposition au BPA induit une augmentation de l'activité de la GST avec des différences notables entre les mâles et les femelles. Chez les mâles, la réponse était plus rapide, tandis que chez les femelles, elle était plus durable. Cette différenciation était attribuée à la régulation de voies métaboliques distinctes, influencées par les niveaux hormonaux et l'état physiologique.

3.4 Comparaison intersexuée de l'activité de la GST

L'analyse comparative entre les mâles et les femelles de *Gambusia affinis* révèle des différences notables dans la dynamique d'induction de l'enzyme glutathion S-transférase (GST), en réponse à une exposition chronique au BPA. Ces différences traduisent des sensibilités métaboliques divergentes entre les sexes. Chez les mâles, l'augmentation de l'activité enzymatique est détectable dès les premières phases de l'exposition (15^e jour), traduisant une réactivité précoce du système de détoxification. Cette réponse atteint un pic à 45 jours, suivi d'une légère réduction au 60^e jour, possiblement liée à une saturation ou une régulation négative du système enzymatique. Tandis que chez les femelles, l'induction de la GST soit plus tardive, elle est plus marquée en intensité. L'activité enzymatique reste élevée jusqu'au 60^e jour, suggérant une activation prolongée des mécanismes de biotransformation. Cette réponse pourrait être associée aux fonctions physiologiques spécifiques des femelles, notamment la vitellogénèse, qui mobilise fortement le foie.

L'analyse statistique a mis en évidence des différences significatives entre les sexes, les concentrations et les durées d'exposition. Ces différences confirment l'existence de sensibilités métaboliques différenciées, avec une réponse enzymatique plus rapide chez les mâles, mais plus soutenue chez les femelles. Les résultats observés ici sont confirmés par plusieurs études récentes : [Olsvik et al. \(2009\)](#) ont rapporté chez la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*) une variation de l'activité GST influencée par le sexe, avec une régulation plus marquée chez les mâles. [Mit et al. \(2023\)](#) ont récemment démontré, chez *Gasterosteus aculeatus*, que le BPA et ses analogues induisent une réponse GST plus prononcée dans le foie des mâles, mais une persistance plus élevée chez les femelles. [Rajapaksa et al. \(2024\)](#) ont documenté chez le *Danio rerio* juvénile que des niveaux environnementaux de BPA entraînent des modifications significatives de l'expression GST et d'autres enzymes antioxydantes, affectant aussi la croissance et la condition physique, avec une modulation sexuellement différenciée.

3.5 Effet sur l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'enzyme catalase (CAT), impliquée dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), a été identifiée comme un biomarqueur de choix pour évaluer le stress oxydatif chez les poissons exposés à des contaminants environnementaux. Dans notre étude, l'exposition chronique au BPA a provoqué une élévation significative de l'activité de la CAT chez *Gambusia affinis*, de manière dose-dépendante et temporellement différenciée selon le sexe.

Chez les mâles, l'induction de l'activité catalasique a été observée dès le 15^e jour, avec une augmentation très significative du taux de catalase. À la concentration CL_{25} (4,74 mg/L), l'activité catalasique moyenne était de $1,08 \pm 0,02 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$, contre $0,56 \pm 0,02 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$ chez les témoins. À la concentration CL_{50} (7,74 mg/L), l'activité catalasique était de $1,65 \pm 0,04 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$, toujours supérieure à celle des témoins. Cette tendance s'est poursuivie jusqu'au 45^e jour, où l'activité enzymatique a atteint des valeurs de $1,82 \pm 0,03 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$ à CL_{25} et $2,32 \pm 0,04 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$ à CL_{50} . Cependant, à 60 jours, l'activité a montré une légère réduction. Néanmoins, elle est restée supérieure à celle des témoins, avec des valeurs de $2,08 \pm 0,02 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$ à CL_{25} et $2,54 \pm 0,03 \mu\text{mol } H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$ à CL_{50} . Cette inversion de tendance suggère un épuisement des réserves enzymatiques ou une régulation négative après une activation prolongée, ce qui est en adéquation avec les résultats observés par [Mukherjee et al. \(2020\)](#) chez *Labeo bata*, où l'activité de la catalase suivait un schéma similaire après une exposition prolongée au BPA. Ainsi que [Salahinejad et al. \(2021\)](#),

ont rapporté une induction enzymatique soutenue de la catalase chez *Danio rerio* mâles exposés à des analogues du BPA, indiquant une sensibilité oxydative accrue chez ce sexe.

Chez les femelles, bien que l'induction de la catalase ait été significative dès les premières phases de l'exposition, le pic d'activité a été observé plus tôt, au 30^e jour. À la concentration CL₂₅ (6,81 mg/L), l'activité moyenne était de $1,52 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, et à CL₅₀ (9,37 mg/L), elle a atteint $2,16 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, comparativement à $0,66 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ chez les témoins. Cependant, contrairement aux mâles, une diminution progressive de l'activité enzymatique a été enregistrée à partir du 45^e jour, avec des valeurs de $1,18 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₂₅ et $1,76 \pm 0,05$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₅₀. Cette tendance s'est poursuivie jusqu'au 60^e jour, où les valeurs ont baissé à $1,14 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₂₅ et $1,44 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ pour CL₅₀. Cette réduction pourrait être due à un réajustement métabolique, ou à un déclin de la capacité de détoxification en raison de l'engagement des ressources hépatiques dans des processus reproductifs comme la vitellogenèse, comme le suggère l'étude de [Hamed et al. \(2021\)](#) sur *Clarias gariepinus*, où l'activité antioxydante a diminué en période de reproduction.

3.6 Comparaison intersexuée de l'activité de la catalase

L'analyse statistique intersexuée révèle une différence significative dans la sensibilité de la catalase au BPA. Les mâles montrent une induction plus rapide et soutenue, tandis que chez les femelles, l'induction est intense mais plus transitoire. Cette distinction est en cohérence avec les rôles physiologiques divergents des deux sexes et leur réactivité hormonale respective. La comparaison intersexuée met en évidence des différences notables. Les mâles présentent une réponse plus rapide et prolongée, tandis que chez les femelles, la réponse est plus transitoire malgré une élévation initiale importante. Ce décalage temporel peut être attribué à une modulation hormonale différenciée. Ces résultats sont en adéquation avec plusieurs travaux récents, comme l'ont montré [Qiu et al. \(2016\)](#) chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*), où l'induction de la CAT était influencée par les profils hormonaux selon le sexe. [Sun et al. \(2019\)](#), travaillant sur *Danio rerio*, ont également observé que la réponse de la catalase au BPA variait en intensité et en durée selon le sexe, avec une réponse masculine plus rapide, contre une activité féminine plus soutenue mais plus vulnérable au fil du temps. Les résultats de [Minaz et al. \(2022\)](#), chez *Oncorhynchus mykiss*, ont confirmé qu'une exposition prolongée au BPA entraîne d'abord une élévation de la CAT suivie d'une baisse, phénomène également constaté

dans notre étude à partir du 60^e jour, suggérant une régulation négative ou une fatigue enzymatique.

3.7 Effet sur le taux de glutathion réduit (GSH)

L'étude de l'évolution du taux de glutathion réduit (GSH) chez *Gambusia affinis* après une exposition chronique au bisphénol A révèle que le BPA induit une diminution progressive et significative du GSH, à la fois chez les mâles et les femelles, ce qui témoigne d'un stress oxydatif et d'une altération des capacités de détoxification. Chez les mâles, dès le 15^e jour, une baisse très hautement significative du GSH a été observée, particulièrement à la concentration CL₅₀ (7,74 mg/L), où la valeur moyenne du GSH a chuté à $0,21 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/mg}$ de protéines, par rapport à $0,34 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$ chez les témoins. Cette diminution s'est poursuivie de manière progressive tout au long de l'exposition, atteignant une valeur minimale de $0,19 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$ pour les individus exposés à la concentration CL₅₀ (7,74 mg/L) au 60^e jour, avec une concentration similaire chez les individus exposés à CL₂₅ (4,74 mg/L) ($0,19 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$). Ces résultats montrent clairement que l'exposition au BPA a un effet dose-dépendant sur l'épuisement du GSH, un biomarqueur clé du stress oxydatif.

Chez les femelles, une baisse très hautement significative du GSH a été observée dès le 45^e jour d'exposition. À ce stade, l'activité moyenne est passée de $0,49 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$ chez les témoins à $0,32 \pm 0,02$ $\mu\text{mol/mg}$ pour CL₂₅ (6,81 mg/L) et à $0,29 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$ pour CL₅₀ (9,37 mg/L). Cette inhibition enzymatique a continué de manière progressive jusqu'au 60^e jour, atteignant des valeurs de $0,24 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/mg}$ pour CL₂₅ et $0,22 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$ pour CL₅₀, montrant que l'exposition prolongée au BPA a entraîné une réduction marquée du GSH chez les femelles, à des concentrations plus faibles comparativement aux mâles. Ce phénomène pourrait être dû à des processus physiologiques spécifiques aux femelles, tels que la vitellogenèse, qui mobilise les ressources hépatiques pour la reproduction, limitant ainsi la capacité du foie à maintenir des niveaux élevés de GSH. Cette hypothèse est en accord avec les observations de [Hamed et al. \(2021\)](#) sur *Clarias gariepinus*, où l'activité antioxydante a diminué en période de vitellogenèse.

3.8 Comparaison intersexuée du taux de GSH

L'exposition chronique au bisphénol A (BPA) chez *Gambusia affinis* a révélé des réponses différenciées entre les mâles et les femelles, particulièrement en ce qui concerne le glutathion réduit (GSH), un biomarqueur clé du stress oxydatif. Chez les mâles, la diminution du GSH a été rapide et marquée dès les premiers jours d'exposition, avec une réduction continue tout au long de la période d'exposition. Cette réponse rapide est en adéquation avec les résultats de [Qiu et al. \(2016\)](#) et [Wang et al. \(2019\)](#), qui ont observé des effets similaires chez les mâles d'autres espèces, suggérant que ces individus sont particulièrement sensibles aux perturbations du métabolisme oxydatif induites par le BPA. En revanche, chez les femelles, bien qu'une réduction significative du GSH ait également été observée, celle-ci s'est produite plus lentement et n'a commencé qu'au 45^e jour d'exposition. Ce retard pourrait s'expliquer par les priorités métaboliques spécifiques aux femelles, telles que la vitellogenèse, un processus de reproduction qui mobilise des ressources énergétiques et métaboliques importantes, retardant ainsi leur réponse antioxydante au stress oxydatif. Cette observation est conforme aux résultats de [Hamed et al. \(2021\)](#), qui ont montré une réponse plus tardive chez les femelles de *Clarias gariepinus* en raison de l'engagement de leurs ressources dans les processus reproductifs. Ce contraste intersexué a également été documenté dans d'autres études, telles que celles de [Sun et al. \(2019\)](#) et [Minaz et al. \(2022\)](#), qui ont observé des différences de réponses enzymatiques entre mâles et femelles exposés à des perturbateurs endocriniens, avec des mâles réagissant plus rapidement aux facteurs de stress oxydatifs.

3.9 Effet sur le taux de Malondialdéhyde (MDA)

L'exposition au bisphénol A induit des réponses différenciées en fonction du sexe, notamment dans la production de Malondialdéhyde (MDA), un marqueur du stress oxydatif. Les résultats montrent des effets significatifs chez les mâles et les femelles adultes de *Gambusia affinis*, bien que les réponses diffèrent selon le temps d'exposition et la concentration. Chez les mâles, le taux de MDA augmente dès le 15^e jour d'exposition, atteignant des valeurs moyennes de $1,72 \pm 0,01$ nmol/mg dans le groupe traité à CL₂₅ (4,74 mg/L) et $1,95 \pm 0,03$ nmol/mg dans le groupe traité à CL₅₀ (7,74 mg/L), comparativement à 0,72 nmol/mg dans le groupe témoin. Cette augmentation se poursuit tout au long de l'exposition, culminant à $1,86 \pm 0,01$ nmol/mg pour CL₂₅ et $2,11 \pm 0,03$ nmol/mg pour CL₅₀ au 60^e jour. Cette réponse rapide et marquée chez les mâles suggère une réactivité plus forte au BPA, ce qui est en accord avec d'autres études,

telles que celles de [Tiwari et al. \(2018\)](#), qui ont également observé une réponse oxydative plus rapide chez les mâles exposés au BPA. Ces résultats sont aussi cohérents avec ceux de [Zahran et al. \(2020\)](#), qui ont trouvé une réponse rapide et marquée au BPA chez les mâles d'*Oreochromis niloticus*, où le MDA augmentait rapidement, suggérant une activation précoce des mécanismes de détoxification.

Chez les femelles, le taux de MDA commence à augmenter de manière significative à partir du 30^e jour. Les valeurs moyennes au 30^e jour sont de $1,65 \pm 0,01$ nmol/mg pour le groupe traité à CL₂₅ et $1,82 \pm 0,03$ nmol/mg pour le groupe traité à CL₅₀, comparativement à $0,87 \pm 0,01$ nmol/mg chez les témoins. Cette élévation se poursuit au 45^e jour, avec des taux atteignant $1,75 \pm 0,02$ nmol/mg pour CL₂₅ et $1,98 \pm 0,01$ nmol/mg pour CL₅₀. Au 60^e jour, une légère diminution est observée dans le groupe CL₂₅, avec une valeur de $1,49 \pm 0,02$ nmol/mg, tandis que CL₅₀ maintient un taux élevé de $1,78 \pm 0,03$ nmol/mg, contre $0,93 \pm 0,01$ nmol/mg chez les témoins. Cette réponse plus graduelle et prolongée chez les femelles expliquée par une gestion des ressources métaboliques dédiées à la reproduction, qui ralentirait leur réponse antioxydante au stress oxydatif induit par le BPA en accord avec [Hamed et al. \(2021\)](#), qui ont mentionné que les femelles de *Clarias gariepinus* avaient une réponse antioxydante plus durable pendant la période de reproduction.

3.10 Comparaison intersexuée du taux de MDA

L'exposition chronique au bisphénol A chez *Gambusia affinis* a révélé des réponses différenciées entre les mâles et les femelles. Les différences dans la dynamique du MDA entre les sexes soulignent l'importance de considérer les variations intersexuées dans l'étude des effets toxiques du BPA et d'autres polluants environnementaux. Ces résultats suggèrent que les mâles réagissent plus rapidement au stress oxydatif induit par le BPA, tandis que les femelles montrent une réponse plus soutenue, mais plus lente, probablement influencée par des processus physiologiques liés à la reproduction. Cela met en évidence la nécessité de tenir compte des différences sexuelles dans l'évaluation des risques écotoxicologiques, car les mécanismes de gestion du stress oxydatif et la réactivité aux polluants peuvent différer significativement selon le sexe. Cette réponse rapide chez les mâles est en accord avec les travaux de [Zahran et al. \(2020\)](#), qui ont observé chez *Oreochromis niloticus* une réponse rapide au BPA chez les mâles, ce qui suggère que ce sexe est particulièrement sensible aux perturbations du métabolisme oxydatif. [Minaz et al. \(2022\)](#) ont également observé des réponses

similaires chez *Oncorhynchus mykiss*, où les mâles ont montré une augmentation plus marquée du MDA en réponse à une exposition au BPA, suggérant que ce sexe est plus réactif au stress oxydatif induit par les contaminants.

En revanche, les femelles de *Gambusia affinis* ont montré une réponse plus gradualiste et prolongée, avec une augmentation plus lente du MDA, mais sur une période plus longue. Cette réponse plus soutenue chez les femelles pourrait être influencée par des priorités métaboliques, un processus de reproduction qui mobilise les ressources énergétiques et métaboliques des femelles, ce qui pourrait expliquer la réponse plus lente au stress oxydatif. Ce phénomène est soutenu par l'étude de [Hamed et al. \(2021\)](#), qui ont observé que les femelles de *Clarias gariepinus* exposées à des toxines ont montré une réponse antioxydante plus prolongée mais retardée, liée à l'engagement des ressources dans la reproduction. Les différences dans la dynamique du MDA entre les sexes ont également été documentées par [Sun et al. \(2019\)](#) dans une étude sur *Danio rerio*, où ils ont constaté que les mâles avaient une réponse plus rapide au BPA, tandis que les femelles ont montré une réponse plus durable mais moins rapide. Cette réponse différente peut être attribuée à des mécanismes hormonaux et des priorités physiologiques propres à chaque sexe. Chez les mâles, la réponse rapide pourrait être due à une mobilisation immédiate du système de défense antioxydante, tandis que chez les femelles, le ralentissement de la réponse pourrait être le résultat de l'engagement énergétique dans des fonctions reproductives essentielles.

4. Effet sur le taux des vitellines

L'analyse du taux de vitellines chez les femelles adultes de *Gambusia affinis* exposées au bisphénol A met en lumière une inhibition marquée de la vitellogénèse, traduisant une perturbation endocrine significative. Chez les séries témoins, le taux de vitellines suit une évolution physiologique attendue, augmentant progressivement tout au long de la période expérimentale passant de $6,09 \pm 0,009$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ au début de l'expérimentation à $8,01 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ au 60^e jour. Cette progression traduit une activité ovarienne fonctionnelle, cohérente avec un cycle reproducteur actif. En revanche, les séries exposées au BPA montrent une inhibition progressive, plus prononcée à des concentrations élevées. À la concentration de 6,81 mg/L (CL₂₅), le taux de vitellines diminue progressivement, avec une valeur enregistrée de $4,24 \pm 0,01$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ au 60^e jour, représentant une réduction de près de 48 % par rapport aux témoins. L'effet est encore plus prononcé à 9,37 mg/L (CL₅₀), où une régression marquée est observée

dès le 15^e jour ($3,70 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg}$) pour atteindre un minimum de $2,42 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$ à 60 jours, soit une diminution supérieure à 70 %. Cette inhibition forte et rapide indique un dérèglement endocrinien marqué.

Cette altération de la vitellogenèse est compatible avec le mode d'action connu du BPA en tant que xénoestrogène, capable de perturber la régulation hormonale des poissons. Le BPA interfère notamment avec l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG), inhibant la production d'œstradiol, hormone clé dans l'induction de la vitellogénine par le foie. La diminution du taux de vitellines observée ici est donc probablement la conséquence d'un blocage en amont dans cette voie de signalisation. Les observations de notre étude rejoignent de, [Luzio et al. \(2015\)](#) qui ont montré que l'exposition chronique au BPA induit une réduction significative du taux de vitellogénine chez les femelles de *Danio rerio*, même à faibles concentrations. De manière similaire, [Caldwell et al. \(2012\)](#) ont rapporté une suppression de l'expression du gène codant la vitellogénine chez *Menidia beryllina*, exposée à une faible dose de BPA durant plusieurs semaines. Ces effets sont souvent associés à une réduction de la fertilité, à une atrophie ovarienne et à une baisse du taux de ponte.

Nos résultats sont en adéquation avec d'autres études scientifiques, telles que celles de [Almeida et al. \(2020\)](#) chez *Fundulus heteroclitus*, ont également révélé une réduction dose-dépendante des taux de vitellogénine circulante suite à une exposition au BPA, en corrélation avec une diminution de la masse ovarienne et des altérations histopathologiques des gonades. Par ailleurs, [Rajapaksa et al. \(2024\)](#) ont confirmé que l'exposition chronique au BPA induit une perturbation de la transcription de *vtg1* et *vtg2* chez des poissons juvéniles, confirmant une sensibilité moléculaire importante de la voie de vitellogenèse à ce composé. [Luzio et al. \(2015\)](#) ont montré une réduction significative du taux de vitellogénine chez *Danio rerio* femelles exposées chroniquement au BPA, avec un lien établi entre les doses administrées et la baisse hormonale. De même, [Nam et al. \(2024\)](#) ont montré chez le Java medaka (*Oryzias javanicus*) qu'une exposition au BPA, seule ou combinée à des microplastiques, entraînait une réduction significative des taux de vitellogénine et une diminution marquée de la production d'œufs. Ces résultats démontrent que la réponse observée chez *Gambusia affinis* est partagée par d'autres espèces de poissons, confirmant le caractère universel de la vitelline comme biomarqueur sensible de perturbation hormonale.

La forte diminution des vitellines mesurée dans cette étude, surtout à la dose de CL₅₀, indique donc un effet biologique critique sur le système reproducteur des femelles, compromettant la maturation ovarienne. Le BPA, en réduisant la production hépatique de vitellogénine, limite l'accumulation des réserves protéiques essentielles pour le développement des ovocytes, ce qui peut avoir des conséquences graves sur le succès reproducteur à l'échelle des populations. La réponse temporelle et dose-dépendante observée, appuyée par une analyse statistique robuste, renforce la valeur de la vitellogénine en tant que biomarqueur sensible de l'exposition aux perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Ces résultats sont cohérents [Faheem et al. \(2017\)](#) ont observé chez *Catla catla* une inhibition significative de la production de vitellogénine après exposition au BPA, avec altération du développement ovarien et suppression de l'axe reproducteur. Pareillement, [Wang et al. \(2019\)](#), en étudiant les effets du BPA chez le poisson rouge (*Carassius auratus*), ont signalé une altération du développement des gonades associée à une baisse du taux de vitellogénine chez les femelles, ce qui a compromis la maturation des ovocytes. [Molina et al. \(2018\)](#) ont mis rapporté une inhibition significative de la production de vitellogénine et une régulation négative de l'aromatase chez *Danio rerio* femelles exposées au BPA, confirmant une désorganisation hormonale et métabolique.

Plus récemment, [Mukherjee et al. \(2024\)](#) ont montré que même à des concentrations environnementales, le BPA provoque un déséquilibre du système reproductif chez *Labeo bata*, affectant la synthèse de vitellogénine ainsi que la signalisation intra-ovocytaire, soulignant une toxicité reproductrice significative chez les femelles. Parallèlement, [Lee et al. \(2021\)](#) ont effectué une revue systématique des effets des analogues du BPA et ont conclu que l'inhibition de la vitellogénine constitue un biomarqueur fiable de la perturbation endocrine chez les espèces aquatiques

5. Effet du Bisphénol a sur les réserves énergétiques de *Gambusia affinis*

L'évaluation des réserves énergétiques testiculaires chez les mâles de *Gambusia affinis* exposés chroniquement au bisphénol A à deux concentrations (CL₂₅ : 4,74 mg/L et CL₅₀ : 7,74 mg/L) met en évidence des perturbations métaboliques notables. Une accumulation progressive et dose-dépendante des lipides testiculaires est observée au fil du temps. Dès le 15^e jour, les taux atteignent $63,86 \pm 3,65$ µg/mg pour CL₂₅ et $78,16 \pm 4,67$ µg/mg pour CL₅₀, contre 59,69

$\pm 4,23 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les témoins. Cette accumulation s'accroît jusqu'au 60^e jour, avec des taux de $82,17 \pm 2,91 \mu\text{g}/\text{mg}$ et $91,78 \pm 4,67 \mu\text{g}/\text{mg}$, respectivement.

Cette tendance à l'accumulation lipidique est cohérente avec les travaux de [Zhang et al. \(2021\)](#), qui ont montré chez *Gobiocypris rarus* une stimulation des voies lipogénétiques suite à une exposition chronique au BPA. De même, [Sun et al. \(2019\)](#) ont observé un remodelage du métabolisme lipidique chez les mâles de *Danio rerio*, vers un profil plus femelle, en réponse aux perturbateurs œstrogéniques. Ces résultats sont soutenus par la recherche de [Liu et al. \(2018\)](#), qui ont mis en évidence un dérèglement du métabolisme des acides gras et du cholestérol dans les gonades de poissons exposés au BPA, compromettant les fonctions reproductrices. Par ailleurs, [Wang et al. \(2020\)](#) ont également signalé une hausse des taux de lipides totaux dans les tissus gonadiques de *Carassius auratus* exposés au BPA, indiquant une altération de l'équilibre énergétique cellulaire. Par ailleurs, [Zhao et al. \(2024\)](#) ont rapporté que l'exposition au BPA et à ses analogues provoque une accumulation anormale de lipides dans les embryons de poisson-zèbre, indiquant un dérèglement précoce du métabolisme énergétique, ce qui pourrait également affecter le développement gonadique.

Parallèlement, une réduction marquée des protéines testiculaires est constatée dans les groupes exposés. Dès le 30^e jour, les taux chutent à $38,72 \pm 2,89 \mu\text{g}/\text{mg}$ pour CL₂₅ et $29,95 \pm 3,43 \mu\text{g}/\text{mg}$ pour CL₅₀, contre $47,72 \pm 4,23 \mu\text{g}/\text{mg}$ chez les témoins. Cette baisse se poursuit jusqu'au 60^e jour, atteignant $29,92 \pm 4,02 \mu\text{g}/\text{mg}$ (CL₂₅) et $15,67 \pm 4,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ (CL₅₀). L'éventuelle diminution des réserves protéiques est souvent liée au stress oxydatif induit par le BPA. Ces résultats sont en accord avec ceux de [Schönemann et al. \(2022\)](#), qui ont observé une dérégulation des voies de biosynthèse protéique et de la spermatogenèse chez *Cyprinodon variegatus*. [Mourabit et al. \(2020\)](#), dans une étude sur *Oryzias latipes*, ont aussi démontré une réduction des protéines testiculaires et une altération hormonale, en lien avec une baisse d'expression des gènes liés à la croissance et à la différenciation cellulaire. De même, [Zhang et al. \(2019\)](#) ont rapporté chez *Oncorhynchus mykiss* une inhibition marquée de la production protéique dans les testicules, accompagnée d'une désorganisation cellulaire après exposition au BPA.

Ainsi, la combinaison d'une accumulation lipidique et d'une diminution des protéines suggère une réorientation métabolique défavorable dans les testicules de *Gambusia affinis*, révélatrice d'une perturbation endocrine profonde. Ces modifications traduisent une altération

de la fonction reproductive et confirment que le BPA agit comme un xénobiotique perturbant le métabolisme énergétique et structurel des tissus reproducteurs chez les poissons. Cette double perturbation a été observée dans plusieurs études expérimentales. De même, [Mourabit et al. \(2020\)](#) ont montré chez *Oryzias latipes* que le BPA provoque une réduction des protéines testiculaires, couplée à une baisse des androgènes plasmatiques, ce qui affecte directement la fonction reproductive. Les effets délétères sur la structure des gonades ont également été mis en évidence par [Schönemann et al. \(2022\)](#), qui ont révélé une désorganisation du protéome testiculaire chez *Cyprinodon variegatus*, notamment dans les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, le cytosquelette et le transport intracellulaire. Cette désorganisation s'accompagne d'un dérèglement transcriptionnel, touchant les gènes liés à la spermatogenèse et à l'homéostasie cellulaire.

Dans des modèles similaires, [Wang et al. \(2020\)](#) ont souligné que le BPA augmentait les lipides totaux dans les testicules de *Carassius auratus*, tout en inhibant les enzymes antioxydantes et en activant les voies de signalisation pro-inflammatoires, aggravant ainsi les effets sur le métabolisme gonadique. [Qu et al. \(2019\)](#) ont montré que chez *Misgurnus anguillicaudatus*, une exposition subchronique au BPA perturbait l'équilibre des protéines structurales et des enzymes de la spermatogenèse, appuyant l'idée d'une altération globale du système reproducteur mâle. De même, dans le modèle du *Danio rerio*, [Batista-Silva et al. \(2022\)](#) ont démontré que le BPA altère les réserves énergétiques testiculaires en modulant les voies de signalisation de l'AMPK et de la glycolyse, aboutissant à une déplétion protéique. Également, [Srivastava et Reddy \(2021\)](#) ont observé chez *Heteropneustes fossilis* une désorganisation des tissus testiculaires, associée à une accumulation lipidique et une diminution du contenu en protéines totales, suggérant une toxicité oxydative et une perte de fonction. [Moura et al. \(2022\)](#) chez *Danio rerio*, où le BPA a induit un déséquilibre énergétique dans les testicules, marqué par une élévation du lactate et une diminution du glycogène et des protéines, accompagnée d'altérations histologiques. Plus récemment, [Zhu et al. \(2025\)](#) ont démontré chez les rats que l'exposition environnementale au BPA affecte directement l'axe intestin-sang-testicule, entraînant une inflammation et une altération de l'intégrité testiculaire, accompagnées d'un déséquilibre du métabolisme lipidique.

L'ensemble de ces études conforte l'idée que les effets du BPA sur le métabolisme testiculaire sont universellement reproductibles, affectant à la fois la disponibilité énergétique (via les lipides) et les fonctions structurales et enzymatiques (via les protéines). Cette synergie

toxique s'inscrit dans un profil typique de perturbation endocrinienne, compromettant gravement la fertilité et la viabilité des gamètes mâles chez les poissons d'eau douce.

6. Etude histologiques testiculaires induites par le BPA chez *Gambusia affinis*

L'analyse histologique des testicules de *Gambusia affinis* a mis en évidence une altération significative de l'organisation du tissu gonadique après exposition chronique au BPA. Les coupes des tissus montrent un amincissement de l'épithélium germinale, une désorganisation des kystes, ainsi qu'une congestion des spermatozoïdes dans la lumière tubulaire. Ces signes reflètent une perturbation marquée du processus de spermatogenèse, malgré l'absence de signes d'intersexualité. Ces observations traduisent une toxicité testiculaire structurelle et fonctionnelle du BPA.

Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux rapportés par [Lora et al. \(2016\)](#) chez le *Danio rerio*, où une réduction de l'épaisseur de l'épithélium séminifère et une désorganisation des cellules germinales ont également été observées après exposition au BPA. De manière similaire, [Cervantes-Camacho et al. \(2024\)](#) ont observé chez *Goodea atripinnis* une fragmentation des kystes spermatogéniques, une réduction du nombre de spermatides et une congestion vasculaire dans les testicules, ce qui soutient l'idée d'une atteinte généralisée de la spermatogenèse chez les poissons vivipares exposés à des perturbateurs endocriniens. Chez le poisson *Astyanax bimaculatus*, [Ribeiro et al. \(2021\)](#) ont démontré que l'exposition au BPA entraîne une atrophie testiculaire et une altération des tubules séminifères, particulièrement lorsque les poissons sont soumis simultanément à un stress thermique. Cette interaction entre le BPA et d'autres facteurs environnementaux pourrait aggraver les effets histologiques observés.

Par ailleurs, [Mahmoud et al. \(2019\)](#) ont noté une désintégration des jonctions entre cellules de Sertoli et germinales chez des carpes exposées au BPA, ce qui compromet gravement la maturation des spermatozoïdes. Des résultats similaires ont été rapportés par [Forner-Piquer et al. \(2019\)](#) chez *Sparus aurata*, où une désorganisation des tubes séminifères et une réduction du nombre de cellules germinales ont été notées après exposition au BPA. Ils ont également rapporté une diminution du volume des cellules de Sertoli, affectant leur rôle de soutien et de nutrition dans la spermatogenèse. De manière analogue, [Chakraborty et al. \(2020\)](#) ont observé chez *Labeo rohita* une désintégration de l'architecture testiculaire accompagnée d'une dégénérescence cellulaire et d'un espacement anormal entre les cellules de Sertoli et les

spermatogonies après traitement au BPA. Ces changements histopathologiques ont été associés à une baisse de la fertilité et à une réduction du nombre de spermatozoïdes fonctionnels. Une étude intégrée menée par [Zhang et al. \(2023\)](#) sur *Gobiocypris rarus* a confirmé que l'exposition au BPA provoque une désorganisation complète de la structure testiculaire, y compris l'atrophie des tubules séminifères, la perte des cellules de Sertoli et l'altération du tissu interstitiel, accompagnées d'une élévation du stress oxydatif. Plus récemment, [Zhu et al. \(2025\)](#) ont montré chez des rats que l'exposition environnementale prolongée au BPA affectait la jonction entre cellules de Sertoli et cellules germinales, compromettant la barrière hémato-testiculaire, un élément essentiel au maintien de la spermatogenèse.

Ces études convergent toutes vers l'idée que le BPA agit comme un perturbateur structurel majeur des tissus reproducteurs mâles, affectant non seulement la spermatogenèse, mais également l'intégrité des cellules de soutien et la communication intercellulaire. L'absence d'intersexualité chez *Gambusia affinis* dans cette étude peut refléter une spécificité d'espèce ou une concentration en-dessous du seuil d'induction d'effets morphologiques plus extrêmes.

Conclusion et Perspectives

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'évaluation des impacts des polluants chimiques sur la faune aquatique des milieux dulçaquicoles, avec un intérêt particulier porté sur les conséquences biologiques du bisphénol A (BPA) un perturbateur endocrinien ubiquitaire. L'étude a porté sur un poisson larvivoire *Gambusia affinis* reconnu comme espèce sentinelle bio-indicatrice pertinente d'eau douce, en combinant des approches toxicologiques, morphométrique, biochimiques, physiologiques et histologiques. À travers une double analyse — aiguë et chronique — chez les deux sexes. Afin de caractériser les réponses physiopathologiques induites par ce xénobiotique sur les fonctions vitales, notamment la reproduction, le métabolisme et le système antioxydant.

Dans un premier temps, l'évaluation de la toxicité aiguë du bisphénol A (BPA) chez *Gambusia affinis* a permis de mettre en évidence une mortalité cumulative et dose-dépendante, conduisant à l'estimation des concentrations létales (CL₂₅ et CL₅₀). Les mâles se sont révélés plus sensibles que les femelles, présentant un taux de mortalité significatifs observées dès les premières 24 heures d'exposition, même à de faibles concentrations. En revanche, les femelles ont réagi plus lentement, avec une mortalité marquée seulement après 72 à 96 heures, et à des concentrations plus élevées. Ce différentiel de sensibilité pourrait s'expliquer par une mobilisation métabolique plus rapide chez les mâles, une capacité de détoxification hépatique moindre, ou encore à des différences hormonales intrinsèques entre les sexes.

Dans une seconde série expérimentale, la toxicité chronique du bisphénol A (BPA) a été évaluée à travers une approche multidisciplinaire biologique :

Sur le plan morphométrique, les résultats ont révélé une sensibilité accrue chez les mâles de *Gambusia affinis*, illustrée par une diminution significative des indices gonado-somatique (IGS) et de condition (K) a été enregistrée, traduisant une atteinte de la capacité reproductive et de l'état général. Parallèlement, l'augmentation notable de l'indice hépato-somatique (IHS) témoigne d'un déséquilibre métabolique et d'une sollicitation hépatique accrue, probablement liée à l'activation des mécanismes de détoxification. Ces perturbations confirment l'impact du BPA sur les fonctions physiologiques essentielles des poissons d'eau douce.

Sur le plan biochimique, l'évaluation enzymatique a mis en évidence une activation précoce des systèmes antioxydants, notamment la glutathion S-transférase (GST) et la catalase (CAT), traduisant une tentative initiale de compensation face au stress engendré par le BPA. Par ailleurs, une inhibition significative de l'acétylcholinestérase (AChE), biomarqueur clé du système nerveux, a été observée, indiquant un effet neurotoxique du BPA. Simultanément, la diminution significative des taux de glutathion réduit (GSH), combinée à une élévation notable des concentrations de malondialdéhyde (MDA), marqueur de la peroxydation lipidique, atteste d'un stress oxydatif sévère. L'ensemble de ces variations biochimiques s'installent de manière plus rapide et plus prononcée chez les mâles que chez les femelles, soulignant une sensibilité biologique accrue par rapport aux mâles. Par ailleurs, les analyses statistiques multivariées, notamment l'analyse en composantes principales (ACP), ont permis de discriminer clairement les profils biochimiques en fonction du sexe, de la concentration et du temps d'exposition. Cette structuration reflète la dynamique toxique progressive du BPA et son effet dose-dépendant au sein des milieux aquatique.

Sur le plan physiologique, une diminution progressive et dose-dépendante du taux de vitellines a été observée chez les femelles indiquant une inhibition de la vitellogenèse, probablement induite par un effet œstrogéno-mimétique du BPA qui constitue un marqueur central de perturbation endocrinienne. Le bisphénol A, agissant comme un xénoestrogène, interfère avec l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique en altérant la production d'estradiol, hormone essentielle à la stimulation de la synthèse hépatique de vitellogénine, précurseur direct des vitellines. Ces perturbations physiologiques, associées aux effets métaboliques constatés chez les mâles, notamment le déséquilibre prononcé des réserves énergétiques (lipidiques et protéiques) et renforcées par les anomalies histologiques observées (amincissement de l'épithélium germinale, désorganisation des kystes spermatogéniques), confirment ainsi le potentiel toxique du BPA sur les fonctions gonadiques. En altérant gravement la fertilité, la qualité des gamètes et, par conséquent, la dynamique reproductive à long terme. Cette inhibition entrave le processus de maturation ovocytaire, compromettant ainsi le potentiel reproducteur des femelles.

En perspective, il apparaît pertinent d'approfondir ces travaux de recherche à travers plusieurs axes complémentaires, notamment :

- La réalisation de tests de toxicité aiguë sur d'autres stades comme les alevins afin d'affiner les seuils de sensibilité au BPA ;
- Dosage d'autres biomarqueurs moléculaires (cytochrome P450, vtg1/vtg2, etc.) pour mieux comprendre les mécanismes d'action du BPA ;
- Réaliser test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) permettrait de mesurer avec précision les niveaux de vitellogénine chez les femelles, confirmant ainsi l'effet œstrogéno-mimétique du BPA et de ce fait son utilisation comme biomarqueur de l'exposition aux composés œstrogéniques;
- Suivre l'accumulation du BPA par la chromatographie liquide haute performance (HPLC) notamment chez les males pour déterminer le degré de féminisation ;
- L'analyse des effets transgénérationnels du BPA sur les fonctions reproductives, le développement embryonnaire et la survie des descendants.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdel-Tawwab, M., & Hamed, H. S. (2018). Effect of bisphenol A toxicity on growth performance, biochemical variables, and oxidative stress biomarkers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 34(5), 1117–1125. <https://doi.org/10.1111/jai.13694>
- Abraham, A., & Chakraborty, P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on Environmental Health*, 35(2), 201–210. DOI: <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0022>
- Abu Hasan, H., Muhamad, M. H., & Kurniawan, S. B. (2023). Managing bisphenol A contamination: Advances in removal technologies and future prospects. *Water*, 15(20), 3573. <https://doi.org/10.3390/w15203573>
- Afzal, G., Ahmad, H. I., Hussain, R., Jamal, A., Kiran, S., Hussain, T., & Saeed, S. (2022). Bisphenol A induces histopathological, hematobiochemical alterations, oxidative stress, and genotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, Article ID 6854919. <https://doi.org/10.1155/2022/6854919>
- Ahammad, A. K. S., Hasan, M., Begum, M., Akter, S., & Nahid, M. A. (2021). Environmental factors and genetic diversity as drivers of early gonadal maturation in *Tenualosa ilisha*. *Frontiers in Marine Science*, 8, 758868. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.758868>
- Ahmed, F., Chehadé, L., Garneau, L., Caron, A. and Aguer, C. (2020). The effects of acute BPA exposure on skeletal muscle mitochondrial function and glucose metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 499, 110580. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110580>
- Ahn, B-Y., Kang, S-W., Yoo, J., Kim, W-K., Bae, P-H. & Jung, J. (2012). Identification of estrogenic activity change in sewage, industrial and livestock effluents by gammairradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1757-1762. DOI : [10.1016/j.radphyschem.2012.06.012](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.06.012)
- Akram, R., Iqbal, R., Hussain, R., Rehman, A., Ali, M., Ali, S., & Mehmood, K. (2022). Effects of bisphenol A on hematological, serum biochemical, and histopathological biomarkers in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) under long-term exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 21380–21395. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17022-9>

- Al Kaddissi, S., 2012. Comparaison de la réponse (en termes d'accumulation, d'impacts cellulaires et génétiques) de l'écrevisse *Procambarus clarkii* après exposition à un polluant métallique (cadmium) et un polluant radiologique (uranium 238 et 233) (Thèse de doctorat). Bordeaux 1.
- Alanazi F , Radwan A, Aou-Auda H (2022). Molecular scaffold and biological activities of anti-Alzheimer agents. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* February 2022; 21 (2): 439-451 ISSN: 1596-5996 (print); 1596-9827
- Alavi, S. M. H., Ramezani, R., Nezhadi, M., & Rahmani, R. (2021). A review on environmental contaminants-related fertility threat in male fishes: effects and possible mechanisms of action learned from wildlife and laboratory. *Animals*, 11(10), 2817. <https://doi.org/10.3390/ani11102817>
- Alexander, H. C., Dill, D. C., Smith, L. W., Guiney, P. D., & Dorn, P. (1988). Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 7(1), 19-26.
- Ali, A., Kaouthar, K., Abdelhamid, K., Khaled, S., Imed, M., 2012. Influence of cadmium exposure on growth and fecundity of freshwater mosquitofish *Gambusia affinis*: in situ and in vivo studies. *Biol. Trace Elem. Res.* 148.
- Ali, NFM ; Sajid, M.; Abd Halim, WIT ; Mohamed, AH; Zain, NNM ; Kamaruzaman, S.; Hanapi, NSM ; Ibrahim, (2023) ; Yahaya, N. Progrès récents dans les méthodes d'extraction en phase solide pour la détermination du bisphénol A et de ses analogues dans les matrices environnementales : une revue mise à jour. *Microchem. J.* , 184 , 108158.
- Alioua, A., Agoudjil B, A Boudenne, Benzarti K, (2021). *Integrated use of condition indexes and biomarkers to assess pollution in Mullus barbatus. South Asian Journal of Experimental Biology.*
- Almeida S, Raposo A, Almeida-González M, Carrascosa C. Bisphenol A: food exposure and impact on human health. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* (2018) 17:1503–17. doi: 10.1111/1541-4337.12388
- Almeida, A. R., Ferreira, P., Oliveira, M., Monteiro, S. M., & Figueiredo, S. (2020). Assessment of the endocrine disruption potential of bisphenol A in *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic Toxicology*, 226, 105576 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105576>
- Almeida, S.; Raposo, A.; Almeida-González, M.; Carrascosa, C. Bisphenol A: Food exposure and impact on human health. *Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf.* 2018, 17, 1503–1517.

- Amir, S., Chakraborty, S., & Docea, A. (2021). *Endocrine disruptors acting on estrogen and androgen pathways cause reproductive disorders through multiple mechanisms: A review. Frontiers in Endocrinology*, 11, 612396. DOI: 10.3389/fendo.2020.612396
- An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* 24, 225–239.
- Andersen, H. R., Halling-Sørensen, B., & Kusk, K. O. (1999). A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartiatonsa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 44(1), 56-61.
- Angus, R.A., McNatt, H.B., Howell, W.M., & Peoples, S.D. (2001). Gonopodium development in normal male and 11-ketotestosterone-treated female mosquitofish (*Gambusia affinis*): a quantitative study using computer image analysis. *General and Comparative Endocrinology*, 123, 222–234.
- ANSES. 2019. Les perturbateurs endocriniens. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://www.anses.fr/fr/content/les-perturbateurs-endocriniens> [Accès en mars 2020] *Aquat. Toxicol.* 192, 69e77.
- 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. DOI : .1016/j.envint.2014.04.011
- Authman, M. M., Zaki, M. S., Khallaf, E. A., & Abbas, H. H. (2015). Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6(4).
- Authman, M. M., Zaki, M. S., Khallaf, E. A., & Abbas, H. H. (2015). Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6(4). <https://www.researchgate.net/publication/281318977>

B

- Babiuch, K., Bednarczyk, A., Gawlik, K., Pawlica-Gosiewska, D., Kesek, B., Darczuk, D., Stepień, P., Chomyszyn-Gajewska, M. & Kaczmarzyk, T. 2019. Evaluation of enzymatic and non-enzymatic antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia: a pilot study. *Acta Odontol. Scand.* 77, 408-418. <https://doi.org/10.1080/00016357.2019.1578409>.

- Bagenal, T.B., & Tesch, F.W. (1978). Age and growth. In T. Bagenal (Ed.), *Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters* (3rd ed., pp. 101-136). IBP Handbook No. 3. Blackwell Scientific Publications, Oxford..
- Baird, S. F., & Girard, C. (1853). Descriptions of new species of fishes collected by Mr. John H. Clark, on the U.S. and Mexican boundary survey, under Lt. Col. Jas. D. Graham.
- Balaguer, P., Bourguet, W., 2017. Caractérisation des interactions entre récepteurs nucléaires et perturbateurs endocriniens contenus dans l'alimentation. Cah. Nutr. Diététique 52, 239–243 <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2017.06.003>.
- Balian, E.V., Segers, H., Leveque, C., and Martens, K. 2008. An introduction to the freshwater animal 0 and challenges in valuing coastal and marine ecosystem services. Review of Environmental Economics and Policy, 6: 1–19.
- Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. Méthodes analytiques pour la détermination du bisphénol A dans les aliments. *J. Chromatogr. A* 2022 , 182 , 113952.
- Barbier G, Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques. (O.P.E.C.S.T.). Assemblée Nationale. Les perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution. Paris: Sénat; 2011 juill p. 131p
- Barbier G., “Rapport sur les perturbateurs endocriniens, le temps de laPrécaution”, Assemblée Nationale. Paris ; SENAT. Paris - 2011.
- Barboza, L. G. A., Cunha, S. C., Monteiro, C., Fernandes, J. O and Guilhermino, L. “Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the North East Atlantic Ocean in relation to microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 393, article 122419, 2020.
- Barough, S. P. H., Suárez-Rodríguez, M., & Aspbury, A. S. (2024). *Hormonal dynamics of matrotrophy vs. lecithotrophy in live-bearing fish reproduction*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4857542>
- Bar-El Dadon, S., & Reifen, R. (2010). Soy as an endocrine disruptor: Cause for caution? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 23(9), 855–861. <https://doi.org/10.1515/jpem.2010.141>
- Barrios-Estrada, C., de Jesús Rostro-Alanis, M., Muñoz-Gutiérrez, B.D., Iqbal, H.M., Kannan, S., Parra-Saldívar, R., 2018. Emergent contaminants: endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation—a review. *Sci. Total Environ.* 612, 1516–1531. *Basis. Dis.* 1866 (2), 165354 <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.005>.

- Batista-Silva, P. A., Santos, H. B., Oliveira, T. S., & Freitas, M. L. (2022). Testicular energetic imbalance and AMPK pathway modulation in *Danio rerio* exposed to BPA. *Chemosphere*, 291, 132894. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132894>
- Bazzoli, N., et al. (2014). *Reproductive biomarker responses induced by xenoestrogens in characid fish Astyanax fasciatus*. *Environmental Research*, 132, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.044>
- Belmokhtar, R., Belmokhtar, F., & Kerfouf, A. (2024). *Multi-biomarker Approach as a Response of Oxidative Stress in Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) Obtained from the Algerian west coast*. *Journal of Marine Environmental Research*.
- Beltrand, J., Godot, C., Kerbouch, S., Lepage, N., Jourdon, I., Polak, M., Schmidt, M.E., 2017. Utilisation d'un serious game dans l'éducation thérapeutique des patients d'âges pédiatriques atteints de diabète de type 1 : évaluation de l'intérêt et de l'adhérence chez des patients âgés de 10 à 16 ans. *Ann. Endocrinol.* 78, 203–204. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2017.07.749>.
- Bernery, C., Bellard, C., & Courchamp, F. (2022). *Freshwater fish invasions: A comprehensive review*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*.
- Bernery, C., Marino, C., & Bellard, C. (2023). Relative importance of exotic species traits in determining invasiveness across levels of establishment: Example of freshwater fish. *Functional Ecology*, 37(4), 748–762. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14393>
- Beronius A, Ruden C, Hakansson H, Hanberg A. (2010). A comparative analysis of controversies in the health risk assessment of Bisphenol A. *Reproductive Toxicology*; 29(2):132-146.
- Besaratinia, A. (2023). "The state of research and weight of evidence on the epigenetic effects of bisphenol A". *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7951. DOI:10.3390/ijms2497951
- Bonnefont-Rousselot D (2020). Markers of lipid oxidation: *Markers of lipid oxidation. Revue Francophone des Laboratoires*.
- Bhat, S. K., & Ganesh, C. B. (2019). Domperidone treatment attenuates stress-induced suppression of reproduction in viviparous mosquitofish *Gambusia affinis*. *Journal of FishBiology*.
- Bhattacharya, H., Xiao, Q., & Lun, L. (2008). Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (*Puntius conchonius*): A biochemical and histopathological evaluation. *Tissue and Cell*, 40(4), 243-249.

- Bilal, M., Iqbal H.M., Barceló, D., 2019. Mitigation of bisphenol A using an array of laccase-based robust bio-catalytic cues – A review. *Science of the Total Environment* 689 (2019) 160–177. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486: 59–67.
- Biol J. Chem.* 282 (42), 30452–30465. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 11 (22), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/2052-336X-11-22>.
- Bisht, S.; Faiq, M.; Tolahunase, M. (2017); Dada, R. Oxidative stress and male infertility. *Nat. Rev. Urol*, 14, 470–485.
- Blanchette, B., Feng, X., Singh, B.R., 2007. Marine glutathione S-transferases. *Mar. Biotechnol.* 9, 513–542.
- Borges, M., Garcia, D., Hernandez, T., Ruiz-Morales, J., & Esparza, P. (2015). Supported photocatalyst for removal of emerging contaminants from wastewater in a continuous packed-bed photoreactor configuration, *Catalysts*, 5, 77–87
- Borzelleca, J.F., Paracelsus (2000). Herald of modern toxicology. *Toxicol sci* 53 : 2-4 ;
- Boucheseiche, C., Cremille, E., Pelte, T., Pojer, K., 2002. Pollution toxique et écotoxicologie : Notions de base. Ed. (Guide technique No. 7). Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse, France.
- Boudalia, S., Folia, M., Menetrier, F., & Decocq, L. (2012). *Effets d'une exposition orale en bisphénol A sur la préférence au sucré et la structure de la glande sous-mandibulaire chez le rat mâle adulte. La Revue de Médecine*, 2012.
<https://www.researchgate.net/publication/282865322>
- Bousoumah R, Leso V, Iavicoli I, Huuskonen P, Viegas S, Porrás S, Santonen T, Frery N, Robert A, Nadaw S (2021) Biomonitoring of occupational exposure to bisphenol A, bisphenol S and bisphenol F: a systematic review. *Sci Total Environ* 783:146905
- Bowes, D.A., Halden, R.U., 2019. Breast Cancer and Dietary Intake of Endocrine Disruptors: a Review of Recent Literature. *Curr. Pathobiol.* <https://doi.org/10.1007/s40139-019-00199-1>
- Brennan, S. J., Brougham, C. A., Roche, J. J., & Fogarty, A. M. (2006). Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 64(1), 49-55.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A. & Sumpter, J.P. (2005). Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 113, 721-728.
<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.7598>.

- Brown MS, Somma L, Mendoza M, Noh Y, Mahler GJ, Koh A(2022). Upcycling compact discs for flexible and stretchable bioelectronic applications. *Nat Commun.* 13:3727.
- Bulayeva, N. N., & Watson, C. S. (2004). Xenoestrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Environmental health perspectives*, 112(15), 1481-1487.
- Bunke, M. (2018). *A new look at factors influencing intraguild predation and cannibalism between native and invasive species..*
- Buxton, R.T., McKenna, M.F., Mennitt, D., Fristrup, K., Crooks, K., Angeloni, L., and Wittemyer, G. 2017. Noise pollution is pervasive in U.S. protected areas. *Science*, 356: 531–533.

C

- Caballero-Huertas, M., et al. (2022). *Somatic condition and reproductive potential as a tandem in European sardine. Fishes*, 7(3), 105. <https://doi.org/10.3390/fishes7030105>
- Cabrera, M.B., Bogan, S., Posadas, P., Somoza, G.M., Montoya-Burgos, J.I., Cardoso, Y.P., 2017. Risks associated with introduction of poeciliids for control of mosquito larvae: first record of the non-native *Gambusia holbrooki* in Argentina. *J. Fish Biol.* 91, 704–710.
- 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. <https://doi.org/10.1002/etc.1825>
- Campuzano-Caballero, J.C. (2022). Viviparous Teleosts: Unique Type of Gestation among Vertebrates. *Animal Reproduction*. DOI: 10.1007/978-3-030-92096-6
- Cao, X. L., Popovic, S., Dabeka, R. W. (2021). Trends of bisphenol A occurrence in canned food products from 2008–2020. *Food Additives & Contaminants: Part A*. DOI: 10.1080/10408398.2021.1980369
- Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A., Kinzig, A.P., Daily, G.C., Loreau, M., Grace, J.B., Larigauderie, A., Srivastava, D., and Naeem, S. 2012.
- Careghini, A., Mastorgio, A.F., Saponaro, S., Sezenna, E., 2015. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (8), 5711–5741.

- Cariati, F.; D'Uonno, N.; Borrillo, F.; Iervolino, S.; Galdiero, G.; Tomaiuolo, R. Bisphenol A: An emerging threat to male fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2019, 17, 6.
- Carlson, J.M., Hyde, E.R., Petrosino, J.F., Manage, A.B.W., Primm, T.P., 2015. The host effects of *Gambusia affinis* with an antibiotic-disrupted microbiome. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 178, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.10.004>.
- Carnevali, O., Santangeli, S., Forner-Piquer, I., & Basili, D. (2018). Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environments: Role of AChE as biomarker of effect in fish. *Environmental Research*, 164, 492–500. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.03.022>
- Cartier, T., Baert, A., Cabillic, P.J., Casellas, C. (2012). *Évaluation des risques sanitaires liés aux situations de contamination physico-chimique des eaux de boisson : le cas des ions perchlorate et bromate. Risques & Santé.* doi: 10.1684/ers.2012.0544
- Catenza CJ, Farooq A, Shubear NS, Donkor KK (2021). A targeted review on fate, occurrence, risk and health implications of bisphenol analogues. *Chemosphere* 268:129273
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., Garcia, A., Pringle, R.M., and Palmer, T.M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, 1: e1400253
- Celino-Brady, F.T., Lerner, D.T., Seale, A.P., 2021. Experimental approaches for characterizing the endocrine-disrupting effects of environmental chemicals in fish. *Front. Endocrinol.* 11, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.619361>
- Cervantes-Camacho, I., Barrera-Rodríguez, R., Paniagua-Chávez, C. G., & López-López, E. (2024). *Effects of Bisphenol A on Male Gonadal Tissue of Viviparous Fish: Histopathological Evidence in Goodea atripinnis.* *International Journal of Environmental Research.* <https://www.researchgate.net/publication/382940999>
- Cervantes-Camacho, R., et al. (2024). Histopathological effects of BPA on *Goodea atripinnis* testis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 260, 115072. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.115072>
- Česen, M., Lenarčič, K., Mislej, V., Levstek, M., & Heath, E. (2018). The occurrence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters. *Science of the Total Environment*, 616-617, 744-752. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.268
- Cesen, M., Lenarčič, K., Mislej, V., Levstek, M., Kovačič, A., Cimrmančič, B., Uranjek, N., Kosjek, T., Heath, D., & Dolenc, M. S. (2018). Presence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters. *Science of the Total Environment*, 616–617, 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.265>.

- Chabet Dis, C., Kara, F. Z. T., Bouamama, S., Kherici, N., Chabane-Bana, H., Gherib, A., Djeloul, R., & Mechakra, A. (2022). *Eco-biological study of the Mosquitofish Gambusia affinis from Oubeira Lake. Journal of Aquatic and Fish Health.* <https://doi.org/10.5281/zenodo.6351207>
- Chahouri, A., Agnaou, M., El Hanaoui, M., Yacoubi, B., & Bouthir, F. (2022). *Assessment of seasonal and spatial variation responses of integrated biomarkers in two marine sentinel bivalve species: Agadir Bay (Southern of Morocco). Marine Pollution Bulletin*, 174, 113291. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113291>
- Chakraborty, S., Dissanayake, M., Godwin, J., Feng, C., Li, W., Inoue, K., Yamamoto, Y., Wang, J., & Wang, H. (2023). Ancestral BPA exposure caused defects in the liver of medaka for four generations. *Science of The Total Environment*, 867, 161255. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161255>
- Chakraborty, T., Ghosh, A., & Ghosh, R. (2020). Degenerative effects of BPA on *Labeo rohita* testicular architecture. *Toxicology Reports*, 7, 1165–1172. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.07.005>
- Chang, C.-H., Huang, Y.-F., Wang, P.-W., Lai, C.-H., Huang, L.-W., Chen, H.-C., Lin, M.-H., Yang, W., Mao, I.-F., & Chen, M.-L. (2019). Associations between prenatal exposure to bisphenol A and neonatal outcomes in a Taiwanese cohort study: Mediated through oxidative stress? *Chemosphere*, 226, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.155>
- Chausse, R. (2022). *Impact de la biodégradation du bisphénol A dans les milieux marins et leur influence sur les organismes marins. Marine Pollution Bulletin*, 174, 113066. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2022.113066
- Cheng, Y., Xiong, W., Tao, J., Chen, Y., Wang, H., Du, Z., Li, X., Zeng, Y., Wang, H., & Liu, J. (2018). Life-history traits of the invasive mosquitofish (*Gambusia affinis* Baird and Girard, 1853) in the central Yangtze River, China. *BioInvasions Records*. <https://doi.org/10.1007/s10641-018-0883-2>
- Chiarello, D.I., Abad, C., Rojas, D., Toledo, F., V´azquez, C.M., Mate, A., Sobrevia, L., CNRDPA (2021). *Rapport de mission à la wilaya d'Alger, Juillet 2021*. Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et l'Aquaculture.
- Colborn, T. (1991). *Statement from the Work Session on Chemically-Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection*. Racine, Wisconsin: Wingspread Conference Center, Princeton Scientific Publishing Co.
- Combarrous, Y., Nguyen, T.M.D., Zhang, T. (2022). *Membrane hormone receptors and their signaling pathways as targets for endocrine disruptors. International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5710. DOI: 10.3390/ijms23105710.

- Comité de la Prévention et de la Précaution. (2003). *Les perturbateurs endocriniens* : Ministère de l'Écologie et du Développement Durable, République Française.
- Coumoul X (2015). *Toxicologie et alimentation: nouveaux concepts. Cahiers de Nutrition et de Diététique*, Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(15\)30016-X](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(15)30016-X)
[Get rights and content](#)
- Cousins, I. T., Staples, C. A., Klečka, G. M. et Mackay, D. (2002) A Multimedia Assessment of the Environmental Fate of Bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment: An international Journal*, vol. 8, n°5, p. 1107-1135.
- Cousins, I. T., Staples, C. A., Clecka, G. M., & Mackay, D. (2002). A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 8(5), 1107–1135.
<https://doi.org/10.1080/20026091094365>
- Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., & Guillette, L. J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 225–239.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.008>
- Cui, J., Yang, G., Pan, Z., Zhao, Y., Liang, Y., Li, W., Zhou, X., & Cui, T. (2017). Hormetic response to low-dose radiation: Focus on the immune system and its clinical implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 280.
<https://doi.org/10.3390/ijms18020280>
- Curtis D. Klaassen. Casarett and Doull's Toxicology. 6e ed. McGraw-Hill Medical publishing division; 2001.

D

- Daphnia magna, to endocrine disrupters. *Journal of health science*, 50(1), 97-100.
- Darbre P.D. Chemical components of plastics as endocrine disruptors: Overview and commentary *Birth Defects Res.*, 112 (2020), pp. 1300-1307, 10.1002/bdr2.1778
CrossRefView Record in ScopusGoogle Scholar
- Darbre, P.D. & Harvey, P.W. (2014). Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: A review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 925-938. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3027>

- David, S., Vivienne M.F, G.M., Catriona, A.D., (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *J. Biol. Chem.* 360, 1–16.
- De Castilhos Ghisi, N., Larentis, C., & De Oliveira, E. C. (2020). Environmental assessment of Neotropical streams using fish as bioindicators: a multibiomarker and integrated approach. *Hydrobiologia*, 847, 487–499.
- De Castilhos Ghisi, N., Larentis, C., & De Oliveira, E. C. (2020). Environmental assessment of Neotropical streams using fish as bioindicators: a multibiomarker and integrated approach. *Hydrobiologia*, 847, 487–499. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04460-2>
- De Sousa Rangel, B., & Hammerschlag, N. (2021). *Dietary and reproductive biomarkers in a generalist apex predator reveal differences in nutritional ecology across life stages.* *Marine Ecology Progress Series*, 664, 149–163.
- Delfosse, V. (2023). *Biodégradation et métabolisme du bisphénol A par les plantes : perspectives écologiques et industrielles.* *Ecotoxicology*, 32(5), 743-755. DOI: 10.1007/s10646-023-02608-5
- Delfosse, V., Balaguer, P., Grimaldi, M. (2013). *Vers des bisphénols sans effets hormonaux*, *Médecine/Sciences*, 29(1), 14-20.
- Delfosse, V., Maire, A., Balaguer, P. (2019). A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*. DOI: 10.1038/s41401-019-0214-9
- Deng, C. L., Qin, R. Y., Wang, N. N., Cao, Y., Gao, J., Gao, W. J., ; (2012). Karyotype of asparagus by physical mapping of 45S and 5S rDNA by FISH. *J. Genet.* 91, 209–212. doi: 10.1007/s12041-012-0159-1
- Denslow, N. D., & Sabo-Attwood, T. (2015). Molecular bioindicators of pollution in fish. In R. Armon & O. Hänninen (Eds.), *Environmental Indicators* (pp. 697–716). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9499-2_40
- Devi, P., & Syad, A. (2014). Botanic: a potential source of new therapies for Alzheimer's disease? *Botanics: Targets and Therapy*, 11. <https://doi.org/10.2147/BTAT.S33554>
- Dewalque, L. (2015). Evaluation de l'exposition de l'Homme à différents perturbateurs endocriniens non persistants. (Thèse de doctorat). Faculté de médecine. Université de Liège, Belgique. Récupéré de BICTEL/e-Ulg <http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-09022015-090414/unrestricted/DewalqueLucas-These.pdf>.

- Dianin, A. P. (1891). *Condensation of ketones with phenols*. *Zhurnal Russkogo Fiziko-Khimicheskogo Obshchestva (Journal of the Russian Physical-Chemical Society, St. Petersburg)*, **23**, 601–611.
- Dietrich, G. J., Florek-Łuszczki, M., Wyszowska, J., Czerniejewski, P., & Kołodziejczyk, L. (2022). Fish as bio-indicators of environmental pollutants and associated health risks to the consumer. *Journal of Elementology*. Retrieved from <https://bibliotekanauki.pl/articles/54161443.pdf>
- Ding, L., Liu, Y., Kang, M., et al. (2022). *UPLC-QTOF/MS metabolomics and biochemical assays reveal changes in hepatic nutrition and energy metabolism during sexual maturation in female rainbow trout*. *Biology*, 11(11), 1679. <https://doi.org/10.3390/biology11111679>
- Dodds, E.C., Lawson, W., 1936. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137, 996.
- Doering, J. A., et al. (2021). *Assessing effects of aromatase inhibition on fishes using *Gambusia affinis* as a model*. *Aquatic Toxicology*, 233, 105789. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105789>
- Draredja-Beldi, S. (1993). Contribution à l'étude de *Gambusia affinis* (Téléostéens, Poeciliidae), poisson prédateur des larves de moustiques: croissance des alevins, étude du cycle sexuel et corrélations métaboliques. Mémoire de Magister Univ Annaba. 107p.
- Duan, Z., Zhu, L., Zhu, L., Kun, Y., & Zhu, X. (2008). Individual and joint toxic effects of pentachlorophenol and bisphenol A on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(3), 774-780.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L., and Sullivan, C.A. 2006. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81: 163–182.
- Dueñas-Moreno, J., Mora, A., & Cervantes-Avilés, P. (2022). Groundwater contamination pathways of phthalates and bisphenol A: origin, characteristics, transport, and fate—a review. *Environment International*, 163, 107220. DOI: 10.1016/j.envint.2022.107220
- Duggan, I. C. (2024). *Ovarian development in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) and its implications for reproductive success*. *Journal of Fish Biology*. DOI:10.1111/jfb.14183
- Dwassy, A. (2014). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques (Doctoral dissertation).

E

- ECHA (2017). Member State Committee Unanimously Agrees that Bisphenol A is an Endocrine Disruptor. URL <https://echa.europa.eu/documents/10162/769b2777-19cd-9fff-33c4-54fe6d8290d5>. Accessed 20 Apr 2021
- ECHA (2020). Liste des substances extrêmement préoccupantes candidates en vue d'une autorisation. European Chemicals Agency. <https://echa.europa.eu/fr/candidate-list-table>.
- Eckstrum, K. S., Weis, K. E., Baur, N. G., Yoshihara, Y., & Raetzman, L. T. (2016). Icam5 expression exhibits sex differences in the neonatal pituitary and is regulated by estradiol and bisphenol A. *Endocrinology*, 157(4), 1408-1420.
- EFSA (2023). Scientific opinion on the risks to human health related to the presence of bisphenol A in food. *European Food Safety Authority Journal*. DOI: [10.2903/fr.efsa.2023.FR-0011](https://doi.org/10.2903/fr.efsa.2023.FR-0011)
- El Henafy, H.M.A.; Ibrahim, M.A.; Abd El Aziz, S.A.; Gouda, E.M. Oxidative Stress and DNA methylation in male rat pups provoked by the transplacental and translactational exposure to bisphenol A. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2020, 27, 4513–4519. [CrossRef] [PubMed] [Volume 2020, Issue 522, May 2020, Pages 47-55](#)
- El-Sisy, D. M., et al. (2024). *Effects of Salinity on Stress Response and Reproduction in Liza ramada*. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries*. [EBSCOHost](#)
- Ember, F. (2023). *Dietary overlap between the non-native mosquitofish (Gambusia affinis) and native common bully (Gobiomorphus cotidianus)*. University of Waikato. DOI: [10.26686/wt14690](https://doi.org/10.26686/wt14690)
- Environnement Canada and Santé Canada (2008) "Evaluation préalable finale pour le Défi concernant le Phénol, 4,4'-(1-méthylethylidène) bis (Bisphénol-A)." *Evaluation des substances existantes* Volume, 90.
- Esposito, A. (2024). *Étude des parasites de la faune piscicole introduite et autochtone de Corse*. HAL Archives Ouvertes. Sciences agricoles. Thèse doctorat. Université Pascal Paoli, 2024. Français. <https://theses.hal.science/tel-04634732v1>
- Erbs, V., & Joubert, O. (2017). Les perturbateurs endocriniens et la glande thyroïde. *Environnement, Risques & Santé*.
- Evelin Rautenberg, G., Valeria Ame, M., Victoria Monferran, M., Ines Bonansea, R., Cecilia Hued, A., 2015. A multi-level approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquia River. *Ecol. Indic.* 48, 706–720.

F

- Faheem, M., & Bhandari, R. K. (2021). Detrimental effects of bisphenol compounds on physiology and reproduction in fish: a literature review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 81, 103497.
- Faheem, M., Lone, K. P., & Anwar, H. (2017). Disruption of the reproductive axis in freshwater fish *Catla catla* exposed to bisphenol A. *Zoological Science*, 34(5), 405–413. <https://doi.org/10.2108/zs170009>
- Fan, X., Zhang, M., Wang, Y., Zhao, J., Zhang, J., et al. (2021). Stress responses of testicular development, inflammatory and apoptotic activities in male zebrafish (*Danio rerio*) under starvation. *Developmental & Comparative*
- Farmer, L. A., Wu, Z., Poon, J.-F., Rooklin, D., Lee, J., Kellogg, G. E., & Stockwell, B. R. (2022). Intrinsic and extrinsic limitations to the design and optimization of inhibitors of lipid peroxidation and associated cell death. *Journal of the American Chemical Society*, 144(33), 14706–14721. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c06068>
- Fedeila, M. (2019). *Études sur la dégradation du bisphénol A par les plantes et ses mécanismes enzymatiques*. *Environmental Research*, 177, 108624. DOI: 10.1016/j.envres.2019.108624
- Fiege, H.; Voges, H.W.; Hamamoto, T.; Umemura, S.; Iwata, T.; Miki, H.; Fujita, Y.; Buysch, H.J.; Garbe, D.; Paulus, W. Phenol Derivatives. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2000. [CrossRef]
- Flaws, J., Damdimopoulou, P., Patisaul, H. B., Gore, A., Raetzman, L., Vandenberg, L. N., & IPEN-Endocrine Society. (2020). *Plastiques, santé et produits chimiques perturbateurs endocriniens (PE) : un guide pour les organisations d'intérêt public et les décideurs politiques sur les produits chimiques perturbateurs endocriniens et les plastiques*. IPEN-Endocrine Society. <https://doi.org/10.1641/b581107>
- Flint S, Markle T, Thomson S, Wallace E. (2012). Bisphenol A exposure effects and policy; a wildlife perspective. *J. Environ.Manag.* 104, 19–34.
- Forner-Piquer, I., Fakriadis, I., & Mylonas, C. C. (2019). Effects of dietary Bisphenol A on the reproductive function of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) testes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5003. <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/20/5003>
- Franco, R., & Cidlowski, J. A. (2012). Glutathione efflux and cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(12), 1694–1713. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4721>

- Franco, R., Panayiotidis, M. I., & Cidlowski, J. A. (2007). Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 30452–30465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703981200>
- Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J., Kavanagh, T.J., (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Asp. Med.* 30 (1–2), 86–98.
- Furness, A.I., Avise, J.C., Pollux, B.J.A., et al. (2021). The evolution of the placenta in poeciliid fishes. *Current Biology*, 31(9), 1957-1965. DOI: [10.1016/j.cub.2021.02.051](https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.02.051)

G

- Gaggini, M., Sabatino, L. & Vassalle, C. 2020. Conventional and innovative methods to assess oxidative stress biomarkers in the clinical cardiovascular setting. *Biotechniques*, 68, 223-231. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0138>.
- Gao, J., Ouyang, X., Chen, B., Jourdan, J., & Plath, M. (2017). *Molecular and morphometric evidence for the widespread introduction of Western mosquitofish *Gambusia affinis* (Baird and Girard, 1853) into freshwaters of China*. BioInvasions Records.
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Geens, T., Govarts, E., & Dhooge, W. (2022). Inhalation of bisphenol A from dust particles: implications for human health. *Environmental Pollution*, 292, 118178. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.118178](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118178)
- Gerberich, J. B., & Laird, M. (1968). Bibliography of the Mosquito Fish, *Gambusia affinis* and *G. holbrooki*. University of North Carolina.
- Ghazi, M. (2023). *Impact de l'aluminium sur la fertilité masculine*. Thèse HAL. <https://theses.hal.science/tel-04523033/file/These-Ghazi-Mohamed-2023.pdf>
- Ghosh, A., Ghosh, D. (2022). *Impact of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on reproductive health of human*. *Proceedings of the Zoological Society*. DOI: [10.1007/s12595-021-00412-3](https://doi.org/10.1007/s12595-021-00412-3)
- Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., & Souidi, M. (2020). *Méthodologie pour l'établissement de relations dose-réponse*. ResearchGate.

- Global Invasive Species Database (GISD), 2015. In: Species profile *Gambusia affinis*; Global Invasive Species Database. World Fish Database.
- Gomes, I., Simões, M., Pereira, A. R. (2023). Parabens as environmental contaminants of aquatic systems affecting water quality and microbial dynamics. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 25(22), 12363. DOI: [10.3390/ijerph252212363](https://doi.org/10.3390/ijerph252212363)
- Gong, H., Luo, J., Zhu, Y., et al. (2023). Occurrence of bisphenol A and microplastics in landfill leachate: lessons from South East Europe. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: [10.1007/s11356-023-28305-2](https://doi.org/10.1007/s11356-023-28305-2)
- Goodman, J.E.; Peterson, M.K (2014). Bisphenol A. In Encyclopedia of Toxicology; Elsevier Inc./Academic Press: Amsterdam, The Netherlands; Volume 1, pp. 514–518.
- Goralczyk, K. (2023). A review of the impact of selected anthropogenic chemicals from the group of endocrine disruptors on human health. *Toxics*. DOI: [10.3390/toxics9010013](https://doi.org/10.3390/toxics9010013)
- Gore, A. C., La Merrill, M. A., & Patisaul, H. (2024). *Endocrine Disrupting Chemicals: Threats to Human Health*. IPEN.
- Goyal, M.M., Basak, A., 2012. Hydroxyl radical generation theory: a possible explanation of unexplained actions of mammalian catalase. *International journal of biochemistry and molecular biology* 3 (3), 282.
- Grison, S. (2018). *Étude des effets multigénérationnels d'une exposition chronique à faible dose d'uranium par analyses omiques*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse. https://theses.hal.science/tel-02059646v1/file/2018CLFAC043_GRISON.pdf
- Gu, Z., Jia, R., He, Q., Cao, L., Du, J., (2021). Effects of BPA on lipid metabolism, autophagy, apoptosis, and immune response in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111627. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111627>
- Guarnotta, V., Frasca, F., Aversa, A. (2022). Impact of chemical endocrine disruptors and hormone modulators on the endocrine system. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5710. DOI: [10.3390/ijms23105710](https://doi.org/10.3390/ijms23105710).
- Guerrero-Estévez, S. M., & López-López, E. (2016). Effects of endocrine disruptors on reproduction in viviparous teleosts with intraluminal gestation. *Reviews in Fish*

- Guo, Y., Liang, X., Li, H., Ye, M., Zou, H., Yu, H., Qi, T., et al. (2023). *Effects of norethindrone on the growth, behavior, and thyroid endocrine system of adult female western mosquitofish (Gambusia affinis)*. Ecotoxicology and Environmental Safety*. DOI:10.1016/j.ecoenv.2023.115478
- Guo, Y., Liu, Z., Sun, X. (2023). Bisphenol A contamination in aquatic environments: a review of sources, environmental concerns, and microbial remediation. *Environmental Pollution*. DOI: 10.1016/j.envpol.2023.118678
- Gur, C., Akarsu, S. A., Akaras, N., Tuncer, S. C. & Kandemir, F. M. 2023. Carvacrol reduces abnormal and dead sperm counts by attenuating sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in the testicular tissues of rats. *Environ. Toxicol.* 38, 1265-1276. <https://doi.org/10.1002/tox.23762>
- Guzman, A., Miller, O., & Gabor, C. R. (2023). *Elevated water temperature initially affects reproduction and behavior but not cognitive performance or physiology in Gambusia affinis. General and Comparative Endocrinology*. DOI:10.1016/j.ygcen.2023.114134

H

- Hahladakis, JN, Iacovidou E, Gerassimidou S (2022). An overview of the occurrence, fate, and human risks of the bisphenol-A present in plastic materials, components, and products. *Integr Environ Assess Manag*.
- Haman, C. (2014). Les parabènes dans l'eau : introduction dans l'environnement, occurrence et toxicité. (Thèse de doctorat). Faculté de pharmacie. Université de Lorraine, France.
- Hamed EM, Li SF (2022). Molecularly imprinted polymers-based sensors for bisphenol-A: recent developments and applications in environmental, food and biomedical analysis. *Trends Environ Anal Chem*. 35:e00167. doi: 10.1016/j. teac.2022.e00167
- Hameister, R., Kaur, C., Dheen, S.T., Lohmann, C.H., Singh, G., (2020). Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *J. Biomed. Mater*.
- Hamma, S.A., Nouri, N., Fergani, I., Lekhal, A. (2015). *Biologie des espèces réactives et stress oxydant. Journal Algérien de Biologie*. <https://www.biologie-des-espèces-réactives-et-stress-oxydant.-1.pdf>

- Han, X., Chen, J., Wu, L., Zhang, G., Fan, X., & Yan, T. (2024). *Species distribution modeling combined with environmental DNA analysis to explore distribution of invasive alien mosquitofish (*Gambusia affinis*) in China*. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Han, Y., Zhang, W., & Li, H. (2024). The global distribution and ecological impact of *Gambusia affinis*. *Environmental Biology of Fishes*, 107(1), 23–41. <https://doi.org/10.1007/s10641-024-01348-5>
- Harmon, J.J., Smith, G.R. (2021). *Invasive fish (*Gambusia affinis*) as an ecological filter for macroinvertebrate colonization of experimental ponds*. *Freshwater Science*. DOI: [10.1086/713006](https://doi.org/10.1086/713006)
- Harner, T. (2021). Bisphenol A in the environment: Overview of its sources and environmental impact. *Environmental Pollution*, 284, 117072. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.117072](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117072)
- Hashimoto, H., Yamada, T., & Fujimoto, K. (2024). The role of human-mediated transport in the global expansion of *Gambusia affinis*. *Hydrobiologia*, 850(3), 511–526. <https://doi.org/10.1007/s10750-024-05578-3>
- Hashimoto, S., Kaneko, S., & Chiba, N. (2024). *Growth and diet of the invasive mosquitofish *Gambusia affinis* in lotic and lentic habitats in Japan*. *Biological Invasions*. DOI: [10.1007/s10530-024-03286-6](https://doi.org/10.1007/s10530-024-03286-6)
- Hassannia, B., Vandenabeele, P., & Vanden Berghe, T. (2019). Targeting ferroptosis to iron out cancer. *Cancer Cell*, 35, 830–849. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.04.002>
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
- Heredia-García, G., & Elizalde-Velázquez, G. A. (2023). Realistic concentrations of bisphenol-A trigger a neurotoxic response in the brain of zebrafish. *Chemosphere*, 340, 139709. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139709>
- Hiramatsu, N., et al. (2006). *Multiple piscine vitellogenins: Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments*. *Marine Biology*, 149(1), 35–47. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0214-z>
- Hirano, M., Ishibashi, H., Matsumura, N., Nagao, Y., Watanabe, N., Watanabe, A., ... & Arizono, K. (2004). Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Hotchkiss*, A.K., Ankley, G.T., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Durhan, E.J., Jensen, K.M.,

- Hou, L., Chen, S., Chen, H., Ying, G., Chen, D., Liu, J., Liang, Y., Wu, R., Fang, X., Zhang, C., Xie, L., (2019). Rapid masculinization and effects on the liver of female western mosquitofish (*Gambusia affinis*) by norethindrone. *Chemosphere* 216, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.130>
- Hou, L.-P., Xu, H.-Y., Ying, G.-G., Yang, Y., Shu, H., Zhao, J.-L., et al., 2017. Physiological responses and gene expression changes in the western mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to progesterone at environmentally relevant concentrations.
- Howard, P.H., Muir, D.C., 2010. Identifying new persistent and bioaccumulative organics among chemicals in commerce. *Environ. Sci. Technol.* 44, 2277–2285. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-1143-8>.
- Hu, M., Zhang, Z., Zhang, Y., Zhan, M., Qu, W., He, G., Liu, J., Zhang, H., Wang, X., & Yang, Y. (2023). Développement de modèles PBPK dermiques humains pour les bisphénols BPA, BPS, BPF et BPAF avec un compartiment cutané à couches parallèles : sur la base d'études d'administration cutanée chez l'homme. *Science of The Total Environment*, 868, 161639. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161639>
- Hua, X., Teng, X., Yue, W., Suo, A., Zhou, W., Ding, D. (2023). The effect of acute toxicity from tributyltin on *Liza haematocheila* liver: Energy metabolic disturbance, oxidative stress, and apoptosis. *Marine Pollution Bulletin*, 171, 112794. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2023.112794
- Huang, Y., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., & Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.04.010>
- Huang, G., Liu, Y., Liang, Y., Shi, W., Hu, L., Tian, F., Chen, J., Ying, G., (2016). Multi-biomarker responses as indication of contaminant effects in *Gambusia affinis* from impacted rivers by municipal effluents. *Sci. Total Environ.* 563, 273–281.
- Huang, G.Y., Liu, Y.S., Liang, Y.Q., Shi, W.J., Yang, Y.Y., Liu, S.S., Hu, L.X., Chen, H.X., Xie, L., Ying, G.G., (2019). Endocrine disrupting effects in western mosquitofish *Gambusia affinis* in two rivers impacted by untreated rural domestic wastewaters. *Sci. Total. Environ.* 683, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.231>.
- Huang, Q., Weber, W.J., (2005). Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling reactions: efficacy, products, and pathways. *Environmental Science & Technology* 39 (16), 6029–6036.

- Hurlbert, S.H. and Mulla, M.S., (1981). Impacts of mosquitofish *Gambusia* predation on plankton communities. *Hydrobiologia*, 83(1), pp.125-151. <https://doi.org/10.1007/BF02187157>
- Hurst, C.H., Waxman, D.J., 2003. Activation of PPAR and PPAR by Environmental Phthalate Monoesters. *Toxicological Sciences* 74, 297–308. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg145>
- Hutchinson, T. H., Ankley, G. T., Segner, H., & Tyler, C. R. (2006). Screening and testing for endocrine disruption in fish—biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 114(Suppl 1), 106–114. <https://doi.org/10.1289/ehp.8062>
- Ighalo, J. O., Kurniawan, S. B., Buhari, J. (2024). *Bisphenol A (BPA) toxicity assessment and insights into current remediation strategies. Environmental Research. DOI: 10.1016/j.envres.2024.119056*

I

- Iglesias-Carrasco, M., Kruuk, L.E.B., Brookes, S. (2020). *Sex-specific responses to competitive environment in the mosquitofish *Gambusia holbrooki**. *Evolutionary Ecology*. DOI: [10.1007/s10682-020-10080-y](https://doi.org/10.1007/s10682-020-10080-y)
- Ike, M., Chen, M. Y., Jin, C. S., & Fujita, M. (2002). Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol-A. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 17(5), 457-461.
- Im, J., & Löffler, F. E. (2016). Fate of bisphenol A in terrestrial and aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, 50(3), 1333-1345. DOI: [10.1021/acs.est.6b00877](https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00877)
- INERIS (2022) - institut national de l'environnement industriel et des risques Base de données fiches toxicologiques : bisphénol A. consulté le 2/1/2022 sur www.inrs.fr/fichetox
- INERIS (2010). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Bisphénol A, INERIS –DRC-10-102861-01251B, 77 p. (<http://rsde.ineris.fr/> ou <http://ineris.fr/substances/fr/>)
- Iwamuro, S., Sakakibara, M., Terao, M., Ozawa, A., Kurobe, C., Shigeura, T., & Kikuyama, S. (2003). Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology*, 133(2), 189-198.

J

- Jaffiol, C. (2022). *Perturbateurs endocriniens et diabète : mythe ou réalité*. Bull. Acad. Sc. Lettr. Montp. vol. 53
- Jan, K., Ahmed, I., & Dar, N. A. (2022). *Role of sex, season and reproduction status on blood parameters in Schizothorax labiatus*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194, 1032. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10250-1>
- Jankiewicz, U., Gałazka, A. (2022). Endocrine disrupting compounds (nonylphenol and bisphenol A)–sources, harmfulness, and laccase-assisted degradation in the aquatic environment. *Microorganisms*. DOI: 10.3390/microorganisms10112236
- Jenkins, S., Wang, J., Eltoum, I., Desmond, R., & Lamartiniere, C. A. (2011). Chronic oral exposure to bisphenol A results in a nonmonotonic dose response in mammary carcinogenesis and metastasis in MMTV-erbB2 mice. *Environmental Health Perspectives*, 119(11), 1604. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003328>
- Jeon, S., Park, H., & Lee, K. (2024). Early reproductive toxicity of bisphenol A in zebrafish: Sex-specific metabolic and endocrine responses. *Aquatic Toxicology*, 260, 106597.
- Jeon, Y., Choi, S. G., Noh, W., Song, J., Yu, J. W., & Lee, S. H. (2024). *Integrated lipidomics and metabolomics approach to assess sex-dependent effects of acute Bisphenol A exposure on hepatic lipid metabolism in zebrafish*. SSRN.<https://papers.ssrn.com/sol3/Delivery.cfm?abstractid=5108786>
- Jiang, X., Li, J., Zhang, Q. (2020). Molecular mechanisms of bisphenol A-induced endocrine disruption: A review. *Environmental Pollution*, 263, 114534. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114534
- Jin, Y., Wang, L., Fu, Z., Jin, C., Wu, J., & Liu, W. (2009). Estrogen-responsive gene transcription in zebrafish life stages as biomarkers of short-term exposure to endocrine-disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(2), 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.006>
- Johnson, I., J.M. Weeks et P. Kille. (2005). Endocrine disruption in aquatic and terrestrial invertebrates. Final report produced by WRc NSF Ltd., Marlow, Buckinghamshire for the United Kingdom Department of Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA). Mars 2005.
- Josephy, P.D., 2010. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genom. Proteom.* 2010,876940.

Jung, K. K., Kim, S. Y., Kim, T. G., Kang, J. H., Kang, S. Y., Cho, J. Y., & Kim, S. H. (2007). Differential regulation of thyroid hormone receptor-mediated function by endocrine disruptors. *Archives of pharmacal research*, 30(5), 616-623.

K

Kang, I. J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Shimasaki, Y., & Honjo, T. (2002). Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(11), 2394–2400. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211121>

Kang, J. H., Aasi, D., & Katayama, Y. (2007). Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(7), 607–625. <https://doi.org/10.1080/10408440701404170>

Kang, J., & Kondo, R. (2020). *Biodégradation du bisphénol A par des bactéries aquatiques et ses implications environnementales*. *Journal of Environmental Management*, 243, 26-34. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.03.076

Kang, J., and Kondo, R. (2022). *Effect of oxygen conditions on the biodegradation of bisphenol A in aquatic ecosystems*. *Environmental Pollution*, 286, 117361. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117361

Kang, J.H., Katayama, Y., 2008. Biodegradation or metabolism of bisphenol A in the environment. *Environmental Biodegradation Research Focus*. Nova Publishers New York, pp. 49–76.

Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z (2016). Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity—a review. *Environmental Science & Technology*. DOI: 10.1021/acs.est.5b05387

Karami, A., & Courtenay, S. C. (2015). Glutathione S-transferase activities in African catfish injected with β -naphthoflavone: Effects of ploidy, gender, dose, and sampling time. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 457. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-015-4906-7>

Kassim, N. M., Elgawish, R. A., & El-Nahas, A. F. (2021). Bisphenol A exposure induces neurobehavioral and enzymatic changes in Nile tilapia: Sex-dependent responses. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 52549–52561. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14512-w>

Katkova-Zhukotskaya, O., & Kalyujnaya, S. (2023). Bioindication using Fish and its Role in an Integrated Assessment of the Condition of Coastal Ecosystems: a Review. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*.

- Katkova-Zhukotskaya, O., & Kalyujnaya, S. (2023). Bioindication using Fish and its Role in an Integrated Assessment of the Condition of Coastal Ecosystems: A Review. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 19(2). <https://cyberleninka.ru/article/n/bioindication-using-fish-and-its-role-in-an-integrated-assessment-of-the-condition-of-coastal-ecosystems-a-review>
- Kaur, J., & Singh, P. K. (2022). Trypsin Detection Strategies: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(6), 949–967. <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1974526>
- Kim, S. S., Kim, J. L., Hwang, K. S., & Park, H. C. (2022). Mechanism of action and neurotoxic effects of chronic exposure to bisphenol F in adult zebrafish. *Science of the Total Environment*, 852, 158401. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969722053578>
- Konieczna A, Rutkowska A, Rachon D. Health risk of exposure to bisphénol A (BPA). *Roczniki Państw Zakł Hig.* (2015) 66:5–11.
- Kotha, R.R., Tareq, F.S., Yildiz, E., Luthria, D.L., 2022. Oxidative stress and antioxidants-a critical review on in vitro antioxidant assays. *Dec 1 Antioxidants* 11 (12). <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>.
- Koya, Y., Fujita, A., Niki, F., Ishihara, E., Miyama, H., 2003. Sex differentiation and pubertal development of gonads in the viviparous mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Zool. Sci.* 20 (10), 1231–1242. <https://doi.org/10.2108/zsj.20.123>
- Krumholz, L. A. 1948. Reproduction in the western mosquitofish, *Gambusia affinis affinis* (Baird & Girard), and its use in mosquito control. *Ecological Monographs* 18(1):1-43.
- Kulsange, S. E., Sharma, M., & Sonawane, B. (2024). Environmental pollutants and their impact on the endocrine system: Focus on bisphenol A. *Food and Chemical Toxicology*, 164, 113029. DOI: 10.1016/j.fct.2024.113029
- Kumar, S., Pandey, P., & Tiwari, S. (2019). Pigment cell dynamics in poeciliid fishes: Mechanisms and ecological significance. *Journal of Fish Biology*, 95(3), 765–778. <https://doi.org/10.1111/jfb.14075>
- Kumar, V., Sharma, N., & Arisekar, U. (2023). *Toxicological Effects of Endocrine Disrupting Heavy Metals on Aquatic Ecosystems: Focus on Neurotoxicity*. *Environmental Toxicology*, 40(5), 2901-2911. DOI: 10.1002/etc.5633.

- Kundakovic, M., & Champagne, F. A. (2011). Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(6), 1084–1093. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.005>
- Kurniawan, S. B., Omidoyin, K. C., Bonyadi, Z. (2024). *Landfill leachates as a significant source for emerging pollutants of phthalic acid esters: identification, occurrence, characteristics, fate, and transport. Journal of Environmental Management. DOI: 10.1016/j.jenvman.2024.119382*
- Kurtul, I., Tarkan, A.S., Sari, H.M., Haubrock, P.J., & Soto, I. (2024). *Exploring invasiveness and versatility of used microhabitats of the globally invasive Gambusia holbrooki* Science of the Total Environment. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.170135
- Kwon, B., Ji, K., & Kim, P. G. (2016). Thyroid endocrine disruption in male zebrafish following exposure to bisphenol AF. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 161-167. DOI: 10.1016/j.etap.2016.03.001

L

- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., & Weismann, T. (2005). Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquatic Toxicology*, 75(3), 213-224.
- Layali I, Shahriaryb A , Talatappe N, Tahmasbpourc E , Rostamid H, Harchegani A (2018). Sulfur mustard triggers oxidative stress through glutathione depletion and altered expression of glutathione-related enzymes in human airways. IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY. <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1460754>
- Le Cren, E.D. (1951). The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20(2), 201-219.
- Le Gac, S. (2022). *La microfluidique au service de la médecine de la reproduction. DOI : 10.1051/rmp/20220150*
- Lee, D. Y., Park, J., & Kim, Y. H. (2021). Endocrine disrupting potential of bisphenol analogues: A review on the inhibition of vitellogenin synthesis in aquatic species. *Applied Sciences*, 11(4), 1837. <https://doi.org/10.3390/app11041837>
- Lee, F., Simon, K.S., Perry, G.L.W. (2018). *Prey selectivity and ontogenetic diet shift of the globally invasive western mosquitofish (Gambusia affinis) in agriculturally impacted streams. Ecology of Freshwater Fish. DOI: 10.1111/eff.12395*

- Lee, H., Park, J., & Kim, Y. (2020). Diurnal Variations in Fish Feeding Behavior and Implications for Sampling Strategies. *Fisheries Ecology and Management*, 27(3), 210-225.
- Lei, D. Q., Huang, G. Y., Qiu, S. Q., Li, X. P., Wang, C. S., & Fang, G. Z. (2023). *Exposure to estrone disrupts the endocrine system of western mosquitofish (Gambusia affinis)*. *Aquatic Toxicology*. DOI:10.1016/j.aquatox.2023.106755
- Li, H., Wang, X. R., Hu, Y. F., Zhang, L., Chen, J., Zhao, Z., & Liu, Q. (2024). Advances in immunology of male reproductive toxicity induced by common environmental pollutants. *Environment International*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.05.006>
- Li, H., Wei, Y., & Zhang, S. (2022). *Toxicity overview of endocrine disrupting chemicals interacting in vitro with the oestrogen receptor*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. DOI: 10.1016/j.etap.2023.103235
- Li, M., He, X., Zhang, Y. (2017). Bisphenol A and its analogs: Toxicological effects and mechanisms of action. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 15665-15676. DOI: 10.1007/s11356-017-9075-0
- Li, Y., Tan, Z., Zuo, P., Li, M., Hou, L., & Wang, X. (2024). *Gestodene causes masculinization of the western mosquitofish (Gambusia affinis): Insights from ovary metabolomics*. *Science of The Total Environment*. DOI:10.1016/j.scitotenv.2024.167129
- Liang, Y. Q., Zhong, L., Jiang, M., Lu, M., Li, C., Dong, Z. (2023). *Physiological and transcriptional effects in the male western mosquitofish (Gambusia affinis) following exposure to dexamethasone*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. DOI:10.1016/j.ecoenv.2023.114786
- Liang, Y., Gong, Y., Jiang, Q., Yu, Y., Zhang, J. (2023). *Exposure, toxicological mechanism of endocrine disrupting compounds and future direction of identification using nano-architectonics*. *Food and Chemical Toxicology*, 160, 112788. DOI: 10.1016/j.fct.2022.112788.
- Liu, S., Zhang, Q., & Wang, H. (2021). Bisphenol A and its effects on estrogen-related receptors and GPR30: A molecular perspective. *Endocrine Research*, 46(2), 123-135. DOI: 10.1080/07435800.2020.1825090
- Liu, Y., Wu, Y., Qin, G., Chen, Y., Wang, X., & Lin, Q. (2021). *Bioaccumulation and reproductive toxicity of bisphenol A in male-pregnant seahorse (Hippocampus erectus) at environmentally relevant concentrations*. *Science of the Total Environment*, 754, 142148. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142148>

- Liu, Z., Zhang, Y., Zheng, Y., Feng, Y., Zhang, W., Gong, S., Lin, H., Gao, P., Zhang, H., (2023). Genome-wide identification glutathione-S-transferase gene superfamily in *Daphnia pulex* and its transcriptional response to nanoplastics. *Int. J. Biol. Macromol.* 230.
- Lizcano, F. (2022). Roles of estrogens, estrogen-like compounds, and endocrine disruptors in adipocytes. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 921504. DOI: 10.3389/fendo.2022.921504
- Lora, A. J., Santos, S. T., & Alves, R. M. (2016). Histological alterations in zebrafish testes exposed to bisphenol A. *Veterinarni Medicina*, 61(10), 537–544. <https://doi.org/10.17221/8697-VETMED>
- Lu, Q., Sun, Y., Ares, I., Anadón, A., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.R., Yuan, Z., Wang, X., Martínez, M.A., (2019). Deltamethrin toxicity: a review of oxidative stress and metabolism. *Environ. Res.* 170, 260–281. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.045>
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (5), 3143–3153.
- Luzio, A., Monteiro, S. M., Garcia-Santos, S., Rocha, E., & Fontáinhas-Fernandes, A. (2015). Effects of chronic exposure to low concentrations of bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*) gonads: Histological and endocrine findings. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.12.010>

M

- Macdonald, J., & Tonkin, Z. (2008). A review of the impact of eastern gambusia on native fishes of the Murray-Darling Basin. *Victoria Arthur Rylah Institute for Environmental Research, Department of Sustainability and Environment*. Heidelberg.
- Mahmoud, S. H., Aly, A. A., & Elshobaky, M. M. (2019). Histological and ultrastructural alterations in carp testes induced by BPA. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(1), 35–46. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.36772>
- Makowska K, Lech P, Majewski M, Rychlik A, Gonkowski S, (2021). Bisphenol A affects vipergic nervous structures in the porcine urinary bladder trigone. *Sci Rep* 11:12147
- Manfo, F.P.; Jubendradass, R.; Nantia, E.A. (2014). Moundipa, P.F.; Mathur, P.P. Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 228, 57–82. [PubMed]

- Manzoor, M. F., Tariq, T., Sahar, A., & Tariq, F. (2022). An insight into bisphenol A, food exposure and its adverse effects on health: A review. *Frontiers in Nutrition*. DOI: [10.3389/fnut.2022.1047827](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1047827)
- Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., Fernández-Checa, J.C., (2013). Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (5), 3317–3328.
- Marín, R., (2020). Oxidative stress: normal pregnancy versus preeclampsia. *Acta Mol.*
- Marques, A. (2014). Phtalates et parabènes dans les médicaments : impact pour l'industrie pharmaceutique d'une évolution de la réglementation visant à les interdire. U.F.R des sciences pharmaceutiques. Université de Bordeaux. Récupéré de Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance <http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01128686/document>.
- Marrocco, I., Altieri, F. & Peluso, I. (2017). Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6501046>.
- Marshall, C., McGuire, J. L., Lindsy, E. L., Maguire, K. C., Mersey, B., and Ferrer, E. A. (2011). Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*, 471: 51–57.
- Martínez, C., Gómez, R., & Torres, L. (2018). Small Fish Sampling with Fine-Mesh Nets: Efficiency and Stress Reduction. *Marine and Freshwater Research*, 69(4), 512-524.
- Martinovic, D., Gray, L.E., (2008). Of mice and men (and mosquitofish): antiandrogens and androgens in the environment. *Bioscience* 58 (11), 1037–1050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.04000.x>.
- Mathieu-Denoncourt J, Wallace SJ, de Solla SR, Langlois VS (2015). Plasticizer endocrine disruption: highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *Gen Comp Endocrinol* 219:74–88
- Mathieu-Denoncourt, J. M. L. (2014). Lethal and sublethal effects of phthalates in Western clawed frog (Doctoral dissertation).
- Mathieu-Denoncourt, J., Wallace, S. J., de Solla, S. R., & Langlois, V. S. (2016). Influence of lipophilicity on the toxicity of bisphenol A and phthalates to aquatic organisms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97(1), 4-10.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F. & Blaise, C. (2008). Vitellogenin as biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates : A review. *Environment International*, 34, 531-545. DOI : 10.1016/j.envint.2007.09.008

- Matschke V., Theiss C., Matschke J. (2019). Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. *Neural Regen Res.* 14 (2): 238-241.
- Matsushima, A., Kakuta, Y., Teramoto, T., Koshihara, T., Liu, X., Okada, H., & Shimohigashi, Y. (2007). Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR γ . *Journal of biochemistry*, 142(4), 517-524.
- Mattingly, H.T. & Laha, M. (2006). *Identifying environmental conditions to promote species coexistence: an example with the native Barrens topminnow and invasive western mosquitofish.* *Biological Invasions.* DOI: 10.1007/s10530-005-3426-8
- McKinlay R, Plant JA, Bell JNB, Voulvoulis N (2014). Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environ Int*;34(2):168-183.
- Mekonnen, E., Asmare, E., Habte-Tsion, H.-M., Li, X., Zhang, Y., Zhou, C., & Liu, B. (2025). *Effects of temperature on growth and reproduction of hybrid red tilapia.* *Aquaculture International.* <https://doi.org/10.1007/s10499-025-01930-z>
- Mi, K., Chen, X., Lu, K., Zhang, Q., & Lin, D. (2021). *Bisphenol A induces hepatic triglyceride level in adult male rare minnow *Gobiocypris rarus*.* *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111869. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111869>
- Guérin, M. (2003). *Environnement et santé publique.* Paris, France: Tec & Doc.
- Migliaccio, M., Chioccarelli, T., Ambrosino, C., Suglia, A., Manfredola, F., Carnevali, O., & Cobellis, G. (2018). Characterization of follicular atresia responsive to BPA in zebrafish by morphometric analysis of follicular stage progression. *International journal of endocrinology.*
- Milkovic, L., Cipak Gasparovic, A., Cindric, M., Mouthuy, P. A., & Zarkovic, N. (2019). Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells*, 8(8), 793. <https://doi.org/10.3390/cells8080793>
- Mills, L. J., & Chichester, C. (2005). *Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Science of The Total Environment*, 343(1–3), 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.070>
- Minaz, M., Kurtoğlu, İ. Z. (2024). *Effects of chronic bisphenol A exposure on aquatic species: Insights into molecular toxicity and environmental impact.* *Environmental Science and Pollution Research.* DOI: 10.1007/s11356-024-33168-2
- Miranda, L. A., & Somoza, G. M. (2022). *Effects of anthropic pollutants identified in Pampas lakes on the development and reproduction of Pejerrey fish.* *Frontiers in Physiology*, 13, 939986. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.939986>

- Mit, C., Beaudouin, R., Palluel, O., Turiès, C., Cachot, J., & Cousin, X. (2023). Exposure and hazard of bisphenol A, S and F: a multi-biomarker approach in three-spined stickleback. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-023-28462-4>
- Mnemba, S., Bakari, S., & Mwevura, H. (2022). Condition factor and Hepatosomatic index of goby fish in Zanzibar. *Int. J. Fisheries & Aquatic Studies*.
- Mohapatra, D.P., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., (2010). Physico-chemical retreatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge–Fate of bisphenol A. *Chemosphere* 78 (8), 923–941.
- Molina A., Abril N., Morales-Prieto N., Monterde J., Ayala N., Lora A., Moyano R (2018). Hypothalamic-pituitary-ovarian axis perturbation in the basis of bisphenol A (BPA) reproductive toxicity in female zebrafish (*Danio rerio*) *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 156, pp. 116-124
- Molina, A. M., Zúñiga, L., & del Río, M. (2018). Bisphenol A disrupts hormone synthesis and vitellogenin expression in female zebrafish (*Danio rerio*). *Food and Chemical Toxicology*, 114, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.028>
- Morales-Grahl, E., Hiltz, E. N., & Gore, A. C. (2024). Bisphenol A analogues and their impact on thyroid hormone signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 6887. DOI: 10.3390/ijms25136887
- Morck, T.J.; Sorda, G.; Bechi, N.; Rasmussen, B.S.; Nielsen, J.B.; Ietta, F.; Rytting, E.; Mathiesen, L.; Paulesu, L.; Knudsen, L.E. (2010). Placental transport and in vitro effects of bisphenol, A. *Reprod. Toxicol.* 30, 131–137.
- Moreau, J., & Gayrard, V. (2022). *Exposition aux bisphénols et résultats en assistance médicale à la procréation*. DOI : 10.1051/rmp/20220162
- Mouna, B., et Roumissa, D. (2023). *Étude de la biodégradation de polluants organiques en milieu aquatique et ses effets sur les populations bactériennes*. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(8), 19501-19512. DOI: 10.1007/s11356-023-25992-4
- Moura, M. M., Oliveira, R., Rodrigues, J., & Monteiro, S. M. (2022). BPA disturbs energy homeostasis in zebrafish testis. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(6), 9324–9336. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15846-7>
- Mourabit, S., Collin, H., Loiseau, A.-M., & Le Page, Y. (2020). Disruption of testicular proteins and androgen levels in *Oryzias latipes* exposed to bisphenol A. *Aquatic Toxicology*, 220, 105401. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105401>

- Mukherjee, S., Das, M., & Banerjee, R. (2024). Sub-lethal exposure to bisphenol A impairs ovarian function and reproductive output in *Labeo bata*. *Science of The Total Environment*, 901, 165921. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165921>
- Mustieles V, D'Cruz S, Couderq S, Rodrigez-Carrillo A, Fini J-B, Hofer T, Steffensen I-L, Dirven H, Barouki R, Olea N, Fernandez M, David A (2021). Bisphenol A and its analogues: a comprehensive review to identify and prioritize effect biomarkers for human biomonitoring. *Environ Int* 144:105811
- Mylonas CC, Zohar Y (2001). Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 463-491.

N

- Naderi, M., Wong, M. Y. L., & Gholami, F. (2014). *Developmental exposure of zebrafish (Danio rerio) to bisphenol-S impairs reproduction and hormonal balance. Aquatic Toxicology*, 148, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.019>
- Naffaa, V. (2022). Neurotoxicité des perturbateurs endocriniens: évaluation de l'impact du bisphénol A sur la myélinisation par une approche lipidomique globale. Thèse de doctorat. Disponible en ligne :<https://theses.hal.science/tel-04295637/document>
- Nam, S. E., Haque, M. N., Lee, S., Kim, C. H., & Kim, T. H. (2024). *Effects of fragmented polyethylene terephthalate microplastics on the growth and reproductive performance of Java medaka exposed to 17β-estradiol and bisphenol A. Aquatic Toxicology*.<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X24002224>
- Nasirian, H., Mahvi, A.H., Hosseini, M., Vazirianzadeh, B., Mohammad, S., Sadeghi, T., Nazmara, S., (2013). Study on the heavy metal bioconcentrations of the shadegan international wetland mosquitofish, *Gambusia affinis*, by inductively coupled plasma technique.
- Nations Unies. (2023). *Guide des Nations Unies sur les dangers pour les milieux aquatiques : Évaluation de la toxicité aiguë des polluants dans les milieux aquatiques*. Programme des Nations Unies pour l'environnement.
- Nebert, D.W., Vasiliou, V., 2004. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum. Genom.* 1 (6), 460–464.
- Neufeld K, Ezell K, Grow WA (2015). Plastic additives decrease agrin-induced acetylcholine receptor clusters and myotube formation in C2C12 skeletal muscle cell culture. *CellBio.* 4:12. doi: 10.4236/cellbio.2015.41002.

- Nico, L., Fuller, P., Jacobs, G., Cannister, M., Larson, J., Fusaro, A., Makled, T.H., & Neilson, M. (2016). *Gambusia affinis*. U.S. Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, Florida. Disponible : <http://nas.er.usgs.gov/queries/FactSheet.aspx?speciesID=846> .
- Nihoul, F. (2019). *Ontogénèse de l'axe gonadotrope chez le bar européen (Dicentrarchus labrax) et effets des xénoestrogènes sur sa mise en place*. Thèse de doctorat. Disponible en ligne : <https://theses.hal.science/tel-02512831/document>

O

- Ohore O, Zhang S. (2021) Endocrine disrupting effects of bisphenol A exposure and recent advances on its removal by water treatment systems. A review. *Scient Afr* 5:e00135
- Ohore OE , Zhang S (2019) . Effets perturbateurs endocriniens de l'exposition au bisphénol A et avancées récentes sur son élimination par les systèmes de traitement de l'eau. Une revue . *Sci. Afr* . ; 5 :e00135.
- Oka T, Adati N, Shinkai T, Sakuma K, Nishimura T, Kurose K. (2003). Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun* 312:877–88
- Okwuosa, O. B., Eyo, J. E., & Omovwohwovie, E. E. (2019). Role of fish as bioindicators: A Review. *Iconic Research and Engineering Journal*, 2(12), 240–245. https://www.academia.edu/download/77107591/IRE_Journals_17030571.pdf
- Olivares-Rubio, H. F., & Dzul-Caamal, R. (2015). Relationship between biomarkers and endocrine-disrupting compounds in wild *Girardinichthys viviparus* from two lakes with different degrees of pollution. *Ecotoxicology*, 24(1), 110–119. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1414-4>
- Oliveira, R., Monteiro, S. M., Santos, M. A., & Castro, L. F. C. (2022). Adaptive enzymatic response and partial recovery from BPA exposure in juvenile fish. *Aquatic Toxicology*, 245, 106128. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106128>
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Sturve, J., Hasselberg, L., & Andersen, O. K. (2009). Transcriptional effects of nonylphenol, bisphenol A and PBDE-47 in liver of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere*, 75(3), 360–367. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508015622>

Ouiram, T., Moonla, C., Preechaworapun, A., Muangpil, S., Maneeprakorn, W., Tangkuaram, T., (2021). Choline oxidase based composite ZrO₂@AuNPs with Cu₂O@ MnO₂ platform for signal enhancing the choline biosensors. *Electroanalysis* 33, 455–463. <https://doi.org/10.1002/elan.202060340>.

Oviya, J. C., et al. (2023). *Deleterious effect of gestagens from wastewater effluent on fish reproduction in aquatic environments: A review*. *Environmental Research*, 229, 115917. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115917>

P

Padmanabhan, V., & Song, W. (2021). *Praegnatio perturbatio—impact of endocrine-disrupting chemicals*. *Endocrine Reviews*, 42(3), 295–308. DOI: 10.1210/edrev/bnab027.

Pan, Q., Xu, C., Zang, Q., Ma, J., & Li, S. (2019). Vitellogenin and its role in fish oocyte maturation: molecular insights and applications. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(5), 1473–1483. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00665-1>.

Pannetier, M. (2022). *Détermination du sexe, différenciation de la lignée germinale, épigénétique et fertilité*. HAL. <https://hal.science/tel04295545v1/file/HDR%20Maele%20PANNETIER%202022%20sans%20GERMIMALE.pdf>

Patterson J.C., Joughin B.A., van de Kooij B., Lim D.C., Lauffenburger D.A. & Yaffe M.B. (2019). ROS and oxidative stress are elevated in mitosis during asynchronous cell cycle progression and are exacerbated by mitotic arrest. *Cell Syst.* 8 (2):163-167.

Peña-Bautista C., Baquero M., Vento M. & Chafer-Pericas C. (2019). Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clin Chim Acta.* 491: 85-90.

Piazzon, M. C., Céspedes, C. A., & Picard-Sánchez, A. (2020). Life history and reproductive traits of *Gambusia affinis* in invasive populations. *Aquatic Invasions*, 15(4), 732–746. <https://doi.org/10.3391/ai.2020.15.4.08>

Pinson, A., Franssen, D., Gérard, A., Parent, A.-S., Bourguignon, J.-P., (2017). Neuroendocrine disruption without direct endocrine mode of action: Polychloro-biphenyls (PCBs) and bisphenol A (BPA) as case studies. *C. R. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.006>

Plattard, N., Dupuis, A., Migeot, V., Haddad, S., & Venisse, N. (2021). *An overview of the literature on emerging pollutants: chlorinated derivatives of Bisphenol A (ClxBPA)*. *Environ. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106547>

Predieri, B., Iughetti, L., Bernasconi, S., Street, M. E. (2022). Endocrine disrupting chemicals' effects in children: What we know and what we need to learn? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11899. <https://doi.org/10.3390/ijms231911899>

Q

Qin, Y., Liu, J., Han, L., Ren, J., Jing, C., Lu, G., & Yang, X. (2024). Medium distribution, source characteristics and ecological risk of bisphenol compounds in agricultural environment. *Emerging Contaminants*. DOI: 10.1016/j.emcon.2023.11.009

Qiu, W., Shen, Y., Pan, C., Liu, S., Wu, M., Yang, M., & Wang, L. (2016). The potential immune modulatory effect of chronic bisphenol A exposure on gene regulation in male medaka (*Oryzias latipes*) liver. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 93–102. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651316301221>

Qu, R., Chen, L., Chen, Y., Wang, Z., & Yu, Z. (2019). BPA subchronic toxicity in *Misgurnus anguillicaudatus*: Reproductive disruption and proteomic analysis. *Environmental Research*, 179, 108786. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108786>

Qu, R., Feng, M., Wang, Z., & Wang, L. (2019). Acetylcholinesterase inhibition and neurotoxicity in goldfish (*Carassius auratus*) induced by BPA and its analogs. *Environmental Pollution*, 248, 776–784. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.050>

Quesada, I., Fuentes, E., Viso-León, M. C., Soria, B., Ripoll, C., & Nadal, A. (2002). Low doses of the endocrine disruptor Bisphenol-A and the native hormone 17 β -estradiol rapidly activate the transcription factor CREB. *The FASEB Journal*, 16(12), 1671–1673.

Quvatov, A.Q., & Atamuratova, M.S. (2014). *Morphometric characteristics of Gambusia holbrooki and Gambusia affinis living in different habitats*. The Way of Science.

R

Rajapaksa, G., & Pathirajage, K. S. (2024). *Long-term exposure to environmentally relevant bisphenol-A levels affects growth, swimming, condition factor, sex ratio and histology of juvenile zebrafish*. *Scientific Reports*, 14, 2215. <https://www.nature.com/articles/s41598-024-73538-x>

Rajapaksa, T. W., Kim, H. J., & Han, J. (2024). Comparative transcriptomic analysis of BPA-exposed zebrafish reveals sex-specific gene regulation of reproductive pathways. *Environmental Science and Technology*, 58(1), 212–225. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c05678>

- Rajapakse, N., Silva, E. & Kortenkamp, A. (2002). Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environmental Health Perspectives*, 110, 917-921. Récupéré de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240992/pdf/ehp0110-000917.pdf>.
- Ramade, F., (2007). Introduction à l'écotoxicologie. Fondements et applications. Tec&Doc, France.
- Ramirez V, Galvez-Ontiveros Y, Porrás-Quesada P, Martínez-González LJ, Rivas A, Álvarez-Cubero MJ. (2021). Metabolic pathways, alterations in miRNAs expression and effects of genetic polymorphisms of bisphenol A analogues: a systematic review. *Environ Res* 197:111062
- Ramírez-García, A., Moncayo-Estrada, R., & García-Ramírez, M. E. (2021). Reproductive cycle of native viviparous fish species (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Goodeidae) in a subtropical Mexican lake. *Neotropical Ichthyology*, 19(1). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2020-0087>
- Rauchenberger, M. (1989). Systematics and biogeography of the genus *Gambusia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *American Museum Novitates*, 2951, 1-74.
- Rautenberg, G.E., Amé, M.V., Monferrán, M.V., Bonansea, R.I., Hued, A.C., (2015). A multilevel approach using *Gambusia affinis* as a bioindicator of environmental pollution in the middle-lower basin of Suquía River. *Ecol. Indic.* 48, 706–720. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.09.025>.
- Ray, S., & Shaju, S. T. (2023). *Bioaccumulation of pesticides in fish resulting in toxicities in humans through the food chain and forensic aspects. Environmental Analysis, Health and Toxicology*. DOI: [10.5620/eaht.38.3.e2023017](https://doi.org/10.5620/eaht.38.3.e2023017)
- Rehage, J.S., Maurer, E.F., Lopez, L.K., & Sih, A. (2020). *A closer look at invasiveness and relatedness: life histories, temperature, and establishment success of four congeners*. *Ecosphere*, 11(8), e03222. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3222>
- Rehan, M., Ahmad, E., Sheikh, I. A., Abuzenadah, A. M., Damanhour, G. A., Bajouh, O. S., AlMehdar, H. A., & Saleem, M. (2015). Androgen and progesterone receptors are targets for bisphenol A (BPA), 4-methyl-2,4-bis-(p-hydroxyphenyl)pent-1-ene—a potent metabolite of BPA, and 4-tert-octylphenol: A computational insight. *PLOS ONE*, 10(9), e0138438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138438>
- Reif, D. M., Martin, M. T., Tan, S. W., Houck, K. A., Judson, R. S., Richard, A. M., & Kavlock, R. J. (2010). Endocrine profiling and prioritization of environmental chemicals using ToxCast data. *Environmental health perspectives*, 118(12), 1714- 1720.

- Renner, E. D., & Duggan, I. C. (2024). *Season, size, and sex: factors influencing monogenean prevalence and intensity on *Gambusia affinis* in New Zealand*. *Parasitology Research*. DOI:10.1007/s00436-024-08241-x
- Reshi, Q. M., & Ahmed, I. (2020). *Seasonal Variation in Biological Indices of *Schizothorax esocinus**. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*.
- Rettig, J. E., Smith, G. R., Eng-Surowiac, G., & Mirzashvili, D. (2018). Consumption of invasive Western Mosquitofish fry by adult conspecifics and native crayfish. *Northeastern Naturalist*, 25(1), 109–118. <https://doi.org/10.1656/045.025.0109>
- Reynolds, J. D., Smith, R., & Taylor, B. W. (2022). Two centuries of spatial and temporal dynamics of freshwater fish introductions. *Global Ecology and Biogeography*, 31(10), 1192–1210. <https://doi.org/10.1111/geb.13714>
- Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N., & Mornagui, B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, 64, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.007>
- Reznick, D. N., & Bryant, M. J. (2021). The evolution of reproductive strategies in live-bearing fishes. *Biological Reviews*, 96(2), 564–589. <https://doi.org/10.1111/brv.12612>
- Rhee, J. S., Yu, I. T., Raisuddin, S., & Lee, J. S. (2008). Cloning and characterization of the glutathione S-transferase-Mu (GSTM) gene sequence and its expression in the hermaphroditic fish *Kryptolebias marmoratus* as a function of development, gender, and endocrine disruption. *Chemico-Biological Interactions*, 174(1), 61–69. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279708002779>
- Ribeiro, A. R., Oliveira, M., & Santos, M. A. (2021). BPA and heat stress in *Astyanax bimaculatus* testis: Histological consequences. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 88, 103727. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103727>
- Ribeiro, F., Banha, F., & Lopes, I. (2018). Morphometric and meristic variability in *Gambusia affinis* populations across environmental gradients. *Environmental Biology of Fishes*, 101(9), 1285–1298. <https://doi.org/10.1007/s10641-018-0785-7>
- Ribeiro, Y. M., Weber, A. A., Paschoalini, A. L., Cardoso, C. M., Oliveira, L. R., & Umbuzeiro, G. A. (2021). Biomarker responses induced by bisphenol A on spermatogenesis in a Neotropical teleost fish are temperature-dependent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112408. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112408>

- Richardson, J.R., Fitsanakis, V., Westerink, R.H.S., Kanthasamy, A.G., 2019. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.* 138, 343–362. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>.
- Richter, C. A., Birnbaum, L. S., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, B. S., Talsness, C. E., Vandenberg, J. G., Walser-Kuntz, D. R., & vom Saal, F. S. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 199–224. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.004>
- Riesch, R., Araújo, M. S., Bumgarner, S., Filla, C., Plath, M., Jourdan, J., & Langerhans, R. B. (2022). Resource competition explains rare cannibalism in the wild in livebearing fishes. *Ecology and Evolution*, 12(6), e8872. <https://doi.org/10.1002/ece3.8872>
- Rigol, A., Latorre, A., Lacorte, S., Barceló, D., (2002). Determination of toxic compounds in paper-recycling process waters by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 963 (1–2), 265–275.
- Robins, C. R., R. M. Bailey, C. E. Bond, J. R. Brooker, E. A. Lachner, R. N. Lea, and W. B. Scott. (1991). Common and scientific names of fishes from the United States and Canada, 5th edition. American Fisheries Society, Special Publication 20, Bethesda, Maryland.
- Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
- Rosenfeld, C. S. (2021). Endocrine disruption and its effects on reproductive and developmental health. *Environmental Health Perspectives*.
- Roslan, M. Q. J., Razak, M. R., Yusoff, F. M. (2023). Occurrence, ecological risk and estrogenic effect of bisphenol analogues in the surface water used for drinking water in Shanghai, China. *Water Research*. DOI: [10.1016/j.watres.2023.118592](https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.118592)
- Rotimi, O. A., Olawole, T. D., De Campos, O. C., Adelani, I. B., & Rotimi, S. O. (2021). Bisphenol A in Africa: A review of environmental and biological levels. *Science of The Total Environment*, 764, 142854.
- Routledge EJ, White R, Parker MG, Sumpter JP. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J. Biol. Chem.* 2000 nov 17; 275(46):35986-35993.
- Rudel, R. A., Cardona, B., & Brody, J. G. (2021). Application of an in vitro assay to identify chemicals that increase estradiol and progesterone synthesis and are potential breast cancer risk factors. *Environmental Health Perspectives*, 129(9), 097005. <https://doi.org/10.1289/EHP8608>

S

- Shahraki, S., Delarami, H. S., Saeidifar, M., & Nejat, R. (2020). Catalytic activity and structural changes of catalase in the presence of Levothyroxine and Isoxsuprine hydrochloride. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.241>
- Saha, S., Narayanan, N., Singh, N. (2022). Occurrence of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in river water, ground water, and agricultural soils of India. *Environmental Monitoring and Assessment*. DOI: 10.1007/s10661-023-11977-1
- Sanjay, S. S., & Shukla, A. K. (2021). *Potential Therapeutic Applications of Nano-Antioxidants*. Cham, Switzerland: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-64354-3>
- Santé Publique France. (2019). *Que sont les perturbateurs endocriniens ?* Santé Publique France. Consulté le 26 août 2021, à l'adresse : <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/exposition-a-des-substances-chimiques/perturbateurs-endocriniens/articles/que-sont-les-perturbateurs-endocriniens>
- Sanz, C., Cruz-Alcalde, A., Porcar-Santos, O., & Petrovic, M. (2024). Assessment of toxicity and endocrine-disrupting activity of bisphenol analogues during ozone and UV treatments in zebrafish eleutheroembryos. *Science of the Total Environment*, 919, 170125. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969724077489>
- Sanz, C., Cruz-Alcalde, A., Porcar-Santos, O., & Petrovic, M. (2024). Assessment of toxicity and endocrine-disrupting activity of bisphenol analogues during ozone and UV treatments in zebrafish eleutheroembryos. *Science of the Total Environment*, 919, 170125. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969724077489>
- Schjenken, J. E., Green, E. S., Overduin, T. S. (2021). Endocrine disruptor compounds a cause of impaired immune tolerance driving inflammatory disorders of pregnancy? *Frontiers in Endocrinology*. DOI: 10.3389/fendo.2021.607539
- Schönemann, A. M., Thomas, P., & Bergner, C. L. (2022). Testicular proteome disruption in *Cyprinodon variegatus* following BPA exposure. *Environmental Pollution*, 292, 118339. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118339>
- Schultz, M.M., Minarik, T.A., Martinovic-Weigelt, D., Curran, E.M., Bartell, S.E., & Schoenfuss, H.L. (2013). Environmental estrogens in an urban aquatic ecosystem: II. Biological effects. *Environment International*, 61, 138-149. DOI: 10.1016/j.envint.2013.08.006

- Seal, W. P. (1910). Fishes in their relation to the mosquito problem. Paper presented before the Fourth International Fishery Congress held at Washington, U.S.A., September 22 to 26, 1908. *Bulletin of the Bureau of Fisheries* 28(683):831-838.
- Seale, A. (1905). Report of Mr. Alvin Seale of the United States Fish Commission, on the introduction of top-minnows to Hawaii from Galveston, Texas. *The Hawaiian Forester and Agriculturist*, 2, 364-367.
- Saghir, S.A., Bartels, M.J., and Marty, M.S. (2019). Deterministic and probabilistic approaches for the derivation of toxicity reference values. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 101, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.11.009>
- Sharma, K., Cook, A., Smith, M., Valancius, C., and Inscho, E. W. (2005). TGF- β Impairs Renal Autoregulation via Generation of ROS. *Am. J. Physiology-Renal Physiol.* 288, F1069–F1077. doi:10.1152/ajprenal.00345.2004
- Sharma, N., Kumar, V., & Arisekar, U. (2023). *Endocrine-disrupting activity of xenobiotics in aquatic animals. Environmental Quality*, 52(3), 42. DOI: 10.1002/tqem.70063.
- Sharma, P., Chukwuka, A. V., Chatterjee, S., Bhowmick, S., and Banerjee, S. (2024). *Fluorene-induced stress in the benthic oligochaete Tubifex tubifex: A multi-biomarker assessment of toxicological pathways and mechanisms. Chemosphere*, 348, 139367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.139367>
- Shen, Y.Y., Wang, W.K., Li, C.R., Guan, X.K., Wang, X.X., (2011). Research on soil catalase activity for petroleum contaminations. In: 2011 International Symposium on Water Resource and Environmental Protection, vol. 3. IEEE, pp. 1855–1858.
- Sheng, Z. G., & Zhu, B. Z. (2011). Low concentrations of bisphenol A induce mouse spermatogonial cell proliferation by G protein–coupled receptor 30 and estrogen receptor- α . *Environmental health perspectives*, 119(12), 1775-1780.
- Sibiya, A., Al-Ghanim, K. A., Govindarajan, M., & Nicoletti, M. (2023). *Biochemical Patterns and Genotoxicity of the Endocrine Disruptor Metformin in the Freshwater Fish Labeo rohita. Fishes*, 8(7), 380. DOI: 10.3390/fishes8070380.
- Singh, M., Kapoor, A., Bhatnagar, A. (2015). Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-biological interactions*. 234, 261-273.
- Singh, N. and Gupta, P.K., 2010. Food and feeding habits of an introduced mosquitofish, *Gambusia holbrooki* (Girard) (Poeciliidae) in a subtropical lake, Lake Nainital, India. *Asian Fisheries Science*, 23(3), pp.355–366. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2010.23.3.007>
- Singh, S., Dagar, M., Kumari, P., Mirza, A. M. W., Singh, S., & Ain, N. U. (2023). The hidden threat: Endocrine disruptors and their impact on insulin resistance. *Cureus*, 15(3), e190793. <https://doi.org/10.7759/cureus.190793>

- Smejkal, G. B., & Kakumanu, S. (2019). Enzymes and their turnover numbers. *Expert Review of Proteomics*, 16(7), 543–544. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1636077>
- Smiley, R. A., LaSharr, T. N., Abernathy, H. N., et al. (2022). *Biomarkers of animal nutrition: from seasonal to lifetime indicators of environmental conditions*. *Life*, 12(3), 375. <https://doi.org/10.3390/life12030375>
- Smith, R. J. (2023). *Legacy effects in temporally separated tadpole species are not mediated by invasive Western Mosquitofish (Gambusia affinis)**. *Ecology and Evolution*. DOI:10.1002/ece3.10034
- Snelson, F. F., & Krabbenhoft, T. J. (2021). Feeding ecology and trophic interactions of poeciliid fishes. *Freshwater Biology*, 66(5), 901–918. <https://doi.org/10.1111/fwb.13695>
- Sone K, Hinago M, Kitayama A, Morokuma J, Ueno N, Watanabe H, Iguchi T. (2004) Effects of 17 β -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *Gen Comp Endocrinol* 138:228–236
- Sordello, R., De Lachapelle, F.F., Livoreil, B., and Vanpeene, S. (2019). Evidence of the environmental impact of noise pollution on biodiversity: A systematic map protocol. *Environmental Evidence*, 8: 1–7.
- Souza, T. L., de Moraes, T. P., Neto, F. F., Opuskevitch, I., Bezerra, R. S., Bezerra, R. J. A., & Moreira, R. A. (2023). Physicochemical and bioinformatic characterization of *Oreochromis niloticus* vitellogenin as an endocrine disruption biomarker. *Ecotoxicology*, 32(6), 972–985. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02612-9>
- Squires, E. J. (2024). *Applied Animal Endocrinology*. CAB International. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/book/10.1079/9781800620742.0000>
- Srivastava, B., & Reddy, P. B. (2020). Haematological and Serum Biomarker Responses in *Heteropneustes fossilis* Exposed to Bisphenol A. *Nature Environment and Pollution Technology*, 19(4), 1577-1584.
- Srivastava, B., & Reddy, P. B. (2021). Assessment of reproductive disruption in Bisphenol A (BPA) exposed fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1794). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 10(4), 59–65.
- Srivastava, S., & Reddy, P. M. (2021). Oxidative testicular damage in *Heteropneustes fossilis* due to BPA: Lipid accumulation and protein loss. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. & Pharmacol.*, 247, 109062. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109062>

- Stearns, S. C. (1983). The evolution of life-history traits in mosquito fish since their introduction to Hawaii in 1905: rates of evolution, heritabilities, and developmental plasticity. *American Zoologist* 23:65-75.
- Stephenson, S. T., Brown, L. A. S., Helms, M. N., Qu, H., Brown, S. D., Brown, M. R., & Fitzpatrick, A. M. (2015). Cysteine oxidation impairs systemic glucocorticoid responsiveness in children with difficult-to-treat asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(2), 454–461.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.035>
- Stockwell, C. A., M. Mulvey, and G. L. Vinyard. (1996). Translocations and the preservation of allelic diversity. *Conservation Biology* 10(4):1133-1141.
- Strasburg, M., Boone, M.D. (2022). *Can predators stabilize host–parasite interactions? Changes in aquatic predator identity alter amphibian responses and parasite abundance across life stages*. *Ecology and Evolution*. DOI: 10.1002/ece3.9512
- Sumpter, J.P. & Johnson, A.C. (2005). Critical review. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental Science and Technology*, 39, 4321-4332. <http://dx.doi.org/10.1021/es048504a>.
- Sun, S. X., Wu, J. L., Lv, H. B., Zhang, H. Y., Zhang, J., & Zhao, Y. (2020). *Environmental estrogen exposure converts lipid metabolism in male fish to a female pattern mediated by AMPK and mTOR signaling pathways*. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122927. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122927>
- Sun, S. X., Zhang, Y. N., Lu, D. L., Wang, W. L., Limbu, S. M., & Zhang, M. L. (2019). Concentration-dependent effects of 17 β -estradiol and bisphenol A on lipid deposition, inflammation and antioxidant response in male zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 237, 124478. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519316431>
- Swenberg, J. A., Fryar-Tita, E., Jeong, Y.C., Boysen, G., Starr, T., Walker, V. E., Albertini, R. J (2008). Biomarkers in toxicology and risk assesement : informing cristal dose-reponse relationships. *Chem Res Toxicol* ; 21 : 253-65 ;

T

- Tahmasbpour, E., Ghanei, M., Panahi, Y., Rad, F. R., Qazvini, A., & Khaledi, A. (2016). Gene expression profile of oxidative stress and antioxidant defense in lung tissue of patients exposed to sulfur mustard. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 800–801, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.03.002>

- Tavakkoli, A., Abnous, K., Vahdati Hassani, F., Hosseinzadeh, H., Birner-Gruenberger, R., & Mehri, S. (2020). Alteration of protein profile in cerebral cortex of rats exposed to bisphenol A: A proteomics study. *Neurotoxicology*, 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.02.002>
- Teimori, A., Esmaeili, H. R., & Reichenbacher, B. (2017). Sexual dimorphism and reproductive adaptations in Poeciliidae: Case study of *Gambusia* spp. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 179(4), 917–930. <https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlx041>
- Teskey, G., Abraham, R., Cao, R., Gyurjian, K., Islamoglu, H., Lucero, M., Martinez, A., Paredes, E., Salaiz, O., Robinson, B., & Venketaraman, V. (2018). Glutathione as a marker for human disease. *Advances in Clinical Chemistry*, 87, 141–159. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.06.004>
- Thomas, P., & Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 102(1-5), 175-179.
- Tomza-Marciniak, A.; Stepkowska, P.; Kuba, J.; Pilarczyk, B. Effect of bisphenol A on reproductive processes: A review of in vitro, in vivo and epidemiological studies. *J. Appl. Toxicol.* 2018, 38, 51–80.
- Ducros, L., Touaibia, M., & Pichaud, N. (2023). Resilience and phenotypic plasticity of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) facing cyclic hypoxia: Insights into growth, energy stores and hepatic metabolism. *Conservation Physiology*, 11(1), coad099. <https://doi.org/10.1093/conphys/coad099>
- Touaylia, S., Labiadh, H., 2019. Effect of the exposure to Mn-doped ZnS nanoparticles on biomarkers in the freshwater western mosquitofish *Gambusia affinis*. *Int. J. Environ. Health Res.* 29, 60–70.
- Tözüm MS, Alay Aksoy S, Alkan C, (2021). Manufacturing surface active shell and bisphenol A free thermochromic acrylic microcapsules for textile applications. *Int J Energy Res.* 45:7018–37. doi: 10.1002/er.6287
- Tu W., Wang H., Li S., Liu Q. & Sha H. (2019). The anti-Inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases. *Aging Disease.* 10(3): 637-648.
- Tyler, C.R. & Jobling, S. (2008). Roach, sex, and gender-bending chemicals : The feminization of wild fish in english rivers. *BioScience*, 58(11), 1051-1059. DOI: 10.1641/B581108.

U

- Uedeme-Naa, B., & George, A. D. I. (2019). The influence of *Moringa oleifera* leaf powder on organosomatic index, condition factor, and glucose profile of *Clarias gariepinus*. *Pharmaceutical Chemistry Journal*
<https://www.researchgate.net/publication/334260830>
- Uribe, M. C., De la Rosa Cruz, G., García Alarcón, A., Patiño-Martínez, A., & Grier, H. J. (2019). Structures associated with oogenesis and embryonic development during intraovarian gestation in viviparous teleosts (Poeciliidae). *Fishes*, 4(2), 35.
<https://doi.org/10.3390/fishes4020035>

V

- Vaksmas, A., Guerrero-Cruz, S., Ghosh, P. (2023). Role of fungi in bioremediation of emerging pollutants. *Frontiers in Marine Science*. DOI: [10.3389/fmars.2023.1070905](https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1070905)
- Van der Most, M., Rietjens, I. M. C. M., & van den Brink, N. W. (2024). *Evaluating non-monotonic dose-response relationships in ecotoxicological risk assessment: A case study based on a systematic review of data on fluoxetine*. *Chemosphere*, 264, 128420. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.128420](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128420)
- Van Dine, D.L. (1907). The introduction of top-minnows into the Hawaiian Islands. *Press Bulletin*, 20, 1-10.
- Vandenberg L. N., Hunt P. A., Gore A. C. (2019). Endocrine disruptors and the future of toxicology testing—lessons from CLARITY-BPA. *Nature Reviews. Endocrinology*, 15(6), 366–374. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0173-y>
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, 30(1), 75–95.
<https://doi.org/10.1210/er.2008-0021>
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2), 139–177.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>
- Vasiljevic, T., & Harner, T. (2021). Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Science of the Total Environment*, 789, 148013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148013>.

- Vecchioni, L., Liuzzo, M., Sciberras, A., Sciberras, J., & Arculeo, M. (2025). *Molecular Data Confirm the Occurrence of the Allochthonous *Gambusia holbrooki* (Pisces: Poeciliidae) in Sicily and the Maltese Archipelago*. *Diversity*, 17(1), 48. <https://doi.org/10.3390/d17010048>
- Vega-López, A., Lara-Vega, I., Atonal-Brioso, G., & Rodríguez-Flores, M. (2024). Neurotoxicant effects of bisphenol A, nonylphenol, and tert-butyl phenol in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquatic Toxicology*, 270, 106635. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106635>.
- Viala, A., & Botta, A. (2005). *Toxicologie* (2^e éd.). Paris, France: Lavoisier.
- Vidal, O., García-Berthou, E., Tedesco, P. A., & García-Marín, J. L. (2010). Origin and genetic diversity of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) introduced to Europe. *Biological Invasions*, 12(4), 841–851. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9505-5>
- Viñas, R., Jeng, Y.-J., & Watson, C. S. (2012). Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8), 2694–2714. <https://doi.org/10.3390/ijerph9082694>
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1361–1371. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.05.018>
- Vom Saal, F. S., Akingbemi, B. T., Belcher, S. M., Birnbaum, L. S., Crain, D. A., Eriksen, M., Farabollini, F., Guillette, L. J., Hassold, T., Ho, S. M., Hunt, P. A., Iguchi, T., Prins, G. S., Soto, A. M., Suvorov, A., Swan, S. H., vom Saal, F. S., & Zoeller, R. T. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals, and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.005>
- Vom Saal, F. S., & Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 113(8), 926–933. <https://doi.org/10.1289/ehp.7713>
- Vračko, M., & Lagares, L. M. (2024). *Clustering of bisphenols based on toxicity predictions for key aquatic species: *Daphnia magna*, *Pimephales promelas*, and *Oryzias latipes**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 261, 115313. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40215690/>

W

- Wahab, P. J., Peters, W. H. M., Roelofs, H. M. J., & Jansen, J. B. M. J. (2001). Glutathione S-transferases in small intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *Cancer Science*, 92(3), 279–284.
- Walker, I., Montaña, M. D., Lankone, R. S., Masson, L., Zygourakis, K., & Fairbrother, D. H. (2021). Influence of CNT loading and environmental stressors on leaching of polymer-associated chemicals from epoxy and polycarbonate nanocomposites. *Environmental Chemistry*, 18(2), 85–97. <https://doi.org/10.1071/EN21043>
- Walsh, D. E., Dockery, P., & Doolan, C. M. (2005). Estrogen receptor-independent rapid non-genomic effects of environmental estrogens on $[Ca^{2+}]_i$ in human breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 230(1–2), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.12.002>
- Walton, S.E., Ahmad, A.B., Gan, H.M., & Bolland, J.D. (2016). *A newly identified population of Gambusia affinis (Baird and Girard, 1853), a non-native invasive species, in Lake Kenyir, Malaysia.* Deakin University. <http://dx.doi.org/10.3391/bir.2016.5.2.08>
- Walton, S.E., Ahmad, A.B., Gan, H.M., & Bolland, J.D. (2016). *A newly identified population of Gambusia affinis (Baird and Girard, 1853), a non-native invasive species, in Lake Kenyir, Malaysia.* Deakin University. <http://dx.doi.org/10.3391/bir.2016.5.2.08>
- Wan, M. L. Y., El-Nezami, H., & Co, V. A. (2022). Estrogenic activity of bisphenol A and its analogs in the environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(13), 3580-3594. DOI: 10.1080/10408398.2022.1903382
- Wang, H., Liu, Z.-H., Zhang, J., Huang, R.-P., Yin, H., Dang, Z., & Lin, Z. (2019). Insights into removal mechanisms of bisphenol A and its analogues in municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 692, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.134>
- Wang, K., Liu, W., Zhang, J., & Liu, H. (2020). BPA impairs testicular metabolism in *Carassius auratus*. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122834. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122834>
- Wang, L., Zhao, X., & Chen, J. (2023). Latitudinal Migrations and “Matthew Effect” for Invasive Fish Under Dispersal Limitation in an Endemic Biodiversity Hotspot. *Biological Invasions*, 25(2), 345–362. <https://doi.org/10.1007/s10530-023-02831-7>

- Wang, K., Zhao, Z., & Ji, W. (2019). Bisphenol A induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *117*, 109182. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109182>
- Wang, Q., Chen, M., Shan, G., Chen, P., Cui, S., Yi, S., & Zhu, L. (2017). Bioaccumulation and biomagnification of emerging bisphenol analogues in aquatic organisms from Taihu Lake, China. *Science of the Total Environment*, *598*, 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.095>
- Wang, Q., Yang, H., Yang, M., Yu, Y., Yan, M., Zhou, L., & Liu, X. (2019). Toxic effects of bisphenol A on goldfish gonad development and the possible pathway of BPA disturbance in female and male fish reproduction. *Chemosphere*, *221*, 221–228. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519300335>
- Wang, Q., Zhang, J., Liu, M., & Jin, Y. (2019). Effects of bisphenol A on gonadal development and sex hormone levels in goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, *218*, 879–886. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.170>
- Wang, S., Huang, J., Liang, L., Guo, X., Wang, G., Zhao, J., Zhang, T., Xu, J., & Zhang, H. (2022). Distinctive metabolite profiles in migrating Amur ide reveal changes in osmotic pressure, gonadal development, and energy allocation strategies. *Frontiers in Environmental Science*, *10*, 997827. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.997827>
- Wang, X., Li, Y., Zhang, W. (2019). Bisphenol A: A review of the endocrine-disrupting effects and its action via nuclear and membrane-bound estrogen receptors. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *69*, 103245. DOI: 10.1016/j.etap.2019.103245
- Wang, Y., Zhao, T., Yang, X., & Liu, H. (2024). Aquatic toxicity and ecological risk of bisphenol B, and comparison with those of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *30*(3), 890–905. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10807039.2024.2420095>
- Wang, Z., Zhu, R., Li, X., Qian, J., & Sui, X. (2023). First record of the non-native western mosquitofish, *Gambusia affinis*, in the Eastern Himalayas, China. *BioInvasions Records*. [Lien](https://doi.org/10.1016/j.bior.2023.100000)
- Wark, P. A., Grubben, M. J. A. L., Peters, W. H. M., Nagengast, F. M., Kampman, E., Kok, F. J., & van 't Veer, P. (2004). Habitual consumption of fruits and vegetables: Associations with human rectal glutathione S-transferase. *Carcinogenesis*, *25*(11), 2135–2142. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh238>
- Watson, C. S., Bulayeva, N. N., Wozniak, A. L., & Alyea, R. A. (2007). Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids*, *72*(2), 124–134.

- Wee, S. Y., & Grinang, J. (2024). Endocrine disrupting compounds in the tropical climate of Malaysia: Pollution, effects, and management strategies. *Exposure and Health*. <https://doi.org/10.1007/s12403-024-00641-9>
- Welshons, W. V., Nagel, S. C., & vom Saal, F. S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, *147*(6), S56–S69. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1497>
- Wen, R., Xie, Y., Wan, C., & Fang, Z. (2013). Estrogenic and androgenic effects in mosquitofish (*Gambusia affinis*) from streams contaminated by municipal effluent in Guangzhou, China. *Aquatic Toxicology*, *132*, 165–172.
- Wingspread Conference. (1991). *Wingspread Statement on Endocrine Disruptors*. World Wildlife Fund, Racine, Wisconsin.
- Wood, Z. T., Fryxell, D. C., Robinson, R. R., Belk, M. C., & Berven, K. A. (2019). Phenotypic and community consequences of captive propagation in mosquitofish. *Journal of Applied Ecology*, *56*(8), 1843–1854. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13391>
- Wood, Z.T., Shepard, I.D., & Hurley, S.T. (2020). *Sex-Dependent Cold Tolerance at the Northern Invasive Range Limit of Gambusia affinis on Cape Cod, Massachusetts*. Copeia. DOI: 10.1643/CI-19-251
- Wood, Z.T., Shepard, I.D., & Hurley, S.T. (2020). *Sex-Dependent Cold Tolerance at the Northern Invasive Range Limit of Gambusia affinis on Cape Cod, Massachusetts*. Copeia. DOI: 10.1643/CI-19-251
- Wu, Z., Khodade, V. S., Chauvin, J.-P. R., Yu, S. B., Chen, C., Capdevila, D. A., Zhang, W., Lopez, N. I., & Pratt, D. A. (2022). Hydropersulfides inhibit lipid peroxidation and protect cells from ferroptosis. *Journal of the American Chemical Society*, *144*(36), 15825–15837. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c06804>

X

- Xiang, T., Dong, X., Shi, L., & Grenouillet, G. (2023). *Species range shifts of notorious invasive fish species in China under global changes: Insights and implications for management*. *Journal of Environmental Management*. [Lien](#)
- Xie, L., Wang, C. S., Fang, G. Z., Li, X. P., & Huang, G. Y. (2024). *Combined effects of binary mixtures of 17 β -estradiol and testosterone in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) after full life-cycle exposure**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. DOI:10.1016/j.cbpc.2024.109577

- Xie, Y.P., Fang, Z.Q., Hou, L.P., Ying, G.G., (2010). Altered development and reproduction in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) found in the Hanxi River, southern China. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2607–2615.
- Xing, J., Zhang, S., Zhang, M., & Hou, J. (2022). Biodegradation of bisphenol A by yeasts and their potential for bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 422, 126724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126724>
- Xing, J., Zhang, S., Zhang, M., & Hou, J. (2022). A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 254, 109275. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109275>
- Xu, X., Ding, K., Jin, X., Jia, J., Li, W., & Wang, J. (2025). *Effects of acute Bisphenol A exposure on feeding and reproduction in sea urchin (Heliocidaris crassispina)*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 272, 109657. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045625000444>
- Xue, M., Jia, M., Qin, Y., Li, J., Yao, T., Francis, F., Gu, X. (2024). "Determination of Bisphenol Compounds and the Bioaccumulation after Co-Exposure with Polyethylene Microplastics in Zebrafish." *Toxics*, 12(10), 702. DOI: [10.3390/toxics12100702](https://doi.org/10.3390/toxics12100702)

Y

- Yang, O., Kim, H. L., Weon, J. I. (2023). Exploring novel insights into the molecular mechanisms underlying bisphenol A-induced toxicity: A persistent threat to human health. *Environmental Biotechnology*, 15(4), 745-758. DOI: [10.1016/j.envtox.2023.03.015](https://doi.org/10.1016/j.envtox.2023.03.015)
- Yeo M, Berglund K, Hanna M, Guo JU, Kittur J, Torres MD, et al. Bisphenol A delays the perinatal chloride shift in cortical neurons by epigenetic effects on the Kcc2 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:4315–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300959110>.
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yu, W., Zhang, Q., Chen, S., Sun, Y., Wu, L., Xu, D., & Wang, Y. (2022). Single-cell sequencing analysis reveals gastric cancer microenvironment cells respond vastly different to oxidative stress. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 250. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03407-2>

Yu, Y.; Chanson, Z.; Zhu, Z.; Yin, D.; Qiu, Y. (2023). Occurrence, efficacité d'élimination et évaluation de l'exposition des bisphénols dans les usines de traitement de l'eau potable. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 9, 806–817.

Yuan, L., Liu, J., Huang, Y., Shen, G., Pang, S. (2024). *Long-term effects of bisphenol A on aquatic life: Growth, behavior, and histopathology in freshwater ecosystems. Environmental Science and Pollution Research*. DOI: [10.1007/s11356-024-33168-2](https://doi.org/10.1007/s11356-024-33168-2)

Z

Z. Cui, F. He, X. Li, Y. Li, C. Huo, H. Wang, Y. Qi, G. Tian, W. Zong, R. Liu. (2023). Response pathways of superoxide dismutase and catalase under the regulation of triclocarban-triggered oxidative stress in *Eisenia foetida*: Comprehensive mechanism analysis based on cytotoxicity and binding model, *Sci. Total Environ.* 854, 158821.

Zahran, E., Elmetwally, M., Awadin, W., & El-Matbouli, M. (2020). *Multiple xenosteroid pollutants biomarker changes in cultured Nile tilapia using wastewater effluents. Animals*, 10(9), 1475. <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/9/1475>

Zaidi, M., Athmouni, K., Metais, I., Ayadi, H., Leignel, V., (2022). The Mediterranean limpet *Patella caerulea* (Gastropoda, Mollusca) to assess marine ecotoxicological risk: a case study of Tunisian coasts contaminated by metals. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18490-3>

Zee, E.C. (2012). “ Les perturbateurs endocriniens de notre environnement quotidien et leurs conséquences sur les principaux marqueurs de la périnatalité”, *Revue de littérature sur l'état actuel des Connaissances RLEAC*.

Zepeda, E. A., Marks, E. J., & Johnson, J. C. (2018). Does sexual conflict increase juvenile survival by reducing cannibalism. *Behavioural Processes*, 149, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.12.002>

Zhang, J., Zhu, Z., Huang, J., Yang, H., Wang, Q., Wang, Y., Chen, Q., & Wang, C. (2023). Analyzing the impact and mechanism of bisphenol A on testicular lipid metabolism in *Gobiocypris rarus* through integrated lipidomics and transcriptomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 254, 114683. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114683>

- Zhang, L., Xu, J., Gao, S., & Zheng, X. (2023). The chronic toxicity of bisphenol A and its analogues in marine ecosystems: Evidence from long-term exposure studies. *Marine Pollution Bulletin*, 177, 113522. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.113522>
- Zhang, Q., Gu, S., Yu, C., Zhao, X., Wang, Q., & Liu, J. (2022). Integrated assessment of endocrine disrupting potential of four novel brominated flame retardants. *Science of the Total Environment*, 829, 154511. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154511>
- Zhao, Q., Ma, Z., & Yang, X. (2019). Bisphenol A induces rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *PLOS ONE*, 14(5), e0216469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216469>
- Zhao, Y., & Fent, K. (2024). Endogenous hormones matter in evaluation of endocrine disruptive effects mediated by nuclear receptors. *Eco-Environment & Health*, 17(1), 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.eeh.2024.04.003>
- Zhou, L., Ouyang, X., Zhao, Y., Gomes-Silva, G., Segura-Munoz, S.I., Jourdan, J., Riesch, R., Plath, M., (2022). Invasive fish retain plasticity of naturally selected, but diverge in sexually selected traits. *Sci. Total Environ.* 811.
- Zhu, Y., Zhang, X., Liu, Z., & Chen, W. (2025). Environmental BPA disrupts gut-blood-testis barrier and lipid metabolism in male rats. *Science of the Total Environment*, 891, 164390. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.164390>
- Zoeller, R. T., Bansal, R., & Parris, C. (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*, 146(2), 607-612.
- Zoeller, R. T., Vandenberg, L. N., & Ivell, R. (2022). Thresholds and endocrine disruptors: an endocrine society policy perspective. *Journal of the Endocrine Society*, 4(10), bvaa085. DOI: 10.1210/jendso/bvaa085.
- Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Woodruff, T.J., Vom Saal, F.S., (2012). Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153, 4097–4110. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>
- Zughaibi, T. A., Sheikh, I. A., & Beg, M. A. (2022). Insights into the endocrine disrupting activity of emerging non-phthalate alternate plasticizers. *Toxics*, 10(4), 159. <https://doi.org/10.3390/toxics10040159>
- Zúñiga-Vega, J. J., Olivera-Tlahuel, C., & Johnson, D. W. (2024). Life histories of poeciliid fishes: Searching for a size-dependent trade-off between number and size of offspring. *Ichthyological Research*. <https://doi.org/10.1007/s10228-023-00918-0>

Annexes

Annexes

*Tampons d'homogénéisation***Tampon Tris à 20 mM (pH = 7,6)****Produits utilisés**

- Hydroxyméthyl aminométhane (Tris)..... 20 mM
- Acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 1 mM
- Saccharose0,5 M
- Chlorure de potassium (KCl) 0,15 M
- Dithiothréitol (DTT) 1 mM
- Fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF)0,1mM
 - o Solubiliser le PMSF dans de l'isopropanol à raison 200 mM ;
 - o Aliquoter dans des tubes Eppendorf à raison 50 µl ;
 - o Solution stable pendant 6 mois à - 20 °C.

Préparation

- Pour la préparation de 100 ml de tampon Tris, dissoudre dans 80 ml d'eau distillée 24 g de Tris ; 0,029 g d'EDTA ; 17,11 g de saccharose ; 1,11 g KCl ; 0,015 g DTT et le contenu d'un tube Eppendorf de PMSF ;
- Mélanger puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Tampon à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Tampon phosphate de sodium à 0,1% de Triton**Produits utilisés**

- Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4).
- Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4).
- Triton X100.

Préparation

Pour la préparation du tampon phosphate de sodium à 0,02 M (pH = 7) :

- o Dissoudre 2,83 g de Na_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution A).
- o Dissoudre 2,39 g de NaH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution B).
- o Ajuster le pH de la solution A à l'aide de la solution B.

Pour la préparation du tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton :

- o Ajouter 0,1 ml de Triton X100 à 99,9 ml tampon phosphate 0,02 M (pH = 7).
- o Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Tampon chlorure de potassium à 1,15 %**Produits utilisés**

- Chlorure de potassium (KCl).

Préparation

- Dissoudre 1,15 g de KCl dans 80 ml d'eau distillée ;
- Mélanger puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Acétylcholinestérase

Tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton

Produits utilisés

- Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).
- Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4).
- Triton X100.

Préparation

Pour la préparation du tampon phosphate de sodium à 0,02 M (pH = 7).

- Dissoudre 2,83 g de Na_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution A) ;
- Dissoudre 2,39 g de NaH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution B) ;
- Ajuster le pH de la solution A à l'aide de la solution B.
- Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Pour la préparation du tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton.

- Ajouter 0,1 ml de Triton X 100 à 99,9 ml tampon phosphate 0,02 M (pH = 7).
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Réactif d'Ellman à 0,01 M

Produits à utiliser

- Acide 5, 5'- dithiobis - 2 - nitrobenzoïque (DTNB).
- Tampon phosphate (pH = 7)..... 0,02 M

Préparation

- Dissoudre 0,0396 g de DTNB dans 10 ml de tampon phosphate à 0,02 M.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Solution d'acétylthiocoline à 0,1 M

Produits à utiliser

- Acétylthiocoline iodide.
- Eau distillée.

Préparation

- Dissoudre 0,144 g d'acétylthiocoline dans 10 ml d'eau distillée.
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Glutathion - S transférase (GST)

Tampon phosphate à 0,1 M (pH = 6,5)

Produits utilisés

- Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).
- Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4).

Préparation

- Dissoudre 13,6 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution A) ;
- Dissoudre 17,4 g de K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution B) ;
- Ajuster le pH de la solution (A) à l'aide de la solution (B).
- Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Solution 1-chloro -2,4 - dinitrobenzene à 20 mM

Produits utilisés

- 1- Chloro - 2,4 - dinitrobenzene (CDNB).
- Éthanol absolu.

Préparation

- Dissoudre 0,04 g de CDNB dans 10 ml d'éthanol absolu.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Solution de glutathion réduit à 20 mM

Produits utilisés

- Glutathion réduit (GSH).

Préparation

- Dissoudre 0,06 g de GSH dans 10 ml d'eau distillée.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Catalase (CAT)**Tampon phosphate à 0,1 M (pH = 7,5)****Produits utilisés**

- Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).
- Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4).

Préparation

- Dissoudre 13,60 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (solution A) ;
- Dissoudre 17,40 g de K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (solution B) ;
- Ajuster le pH de la solution (B) à l'aide de la solution (A).
- Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Peroxyde d'hydrogène à 5 %**Produits utilisés**

- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)..... 30 %
- Tampon phosphate (pH = 7,5)..... 0,1 M

Préparation

- Pour la préparation de 100 ml de peroxyde d'hydrogène à 5 %, ajouter 16,66 ml d' H_2O_2 à 83,34 ml de tampon phosphate.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Glutathion réduit (GSH)

Solution d'acide sulfosalicylique à 4 %

Produit utilisé

- Acide sulfosalicylique.

Préparation

- Dissoudre 4 g de l'acide sulfosalicylique dans 80 ml d'eau distillée ;
- Mélanger puis ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Réactif d'Ellman à 10 mM

Produits utilisés

- Acide 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB).
- Méthanol absolu.

Préparation

- Dissoudre 0,0396 g de DTNB dans 10 ml de méthanol absolu.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Tampon Tris-HCl à l'EDTA (pH = 9,6)

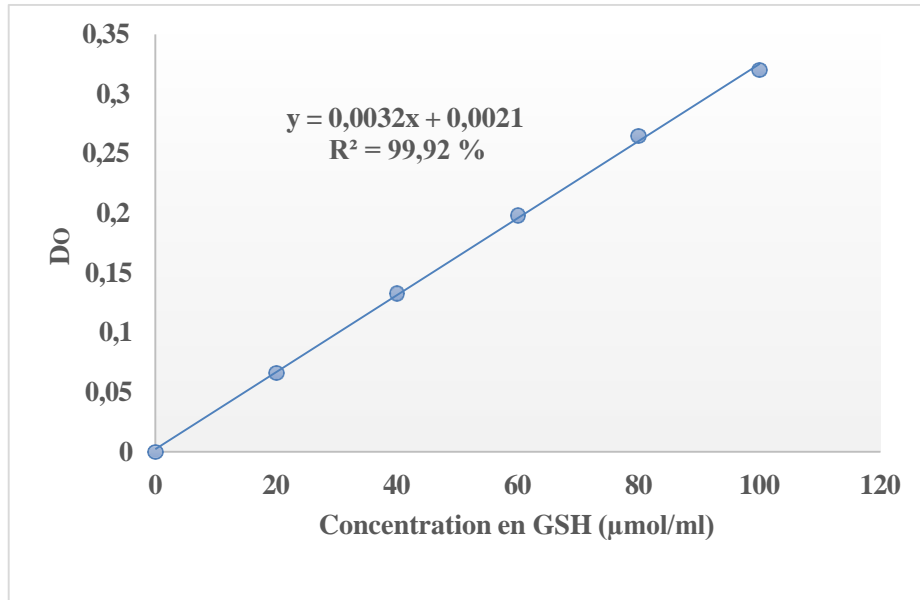
Produits utilisés

- Tris..... 0,4 M
- EDTA 20 mM
- Acide chlorhydrique (HCl)37 %

Préparation

- Pour la préparation de 500 ml de tampon, dissoudre 24,22 g de Tris dans 400 ml d'eau distillée ;
- Ajouter 2,92 g d'EDTA ;
- Mélanger puis compléter à 500 ml avec de l'eau distillée ;
- Ajuster le pH à 9,6 avec quelques gouttes d'HCl.
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Représentations graphiques de la courbe d'étalonnage du GSH



Malondialdéhyde (MDA)

Solution d'acide phosphorique à 1 %

Produits utilisés

- Acide phosphorique (H_3PO_4).....98 %

Mode opératoire

- Ajouter 1,02 ml de l'acide phosphorique à 98,98 ml d'eau distillée.
- Solution stable à température ambiante.

Solution d'acide thiobarbiturique à 0,6 %

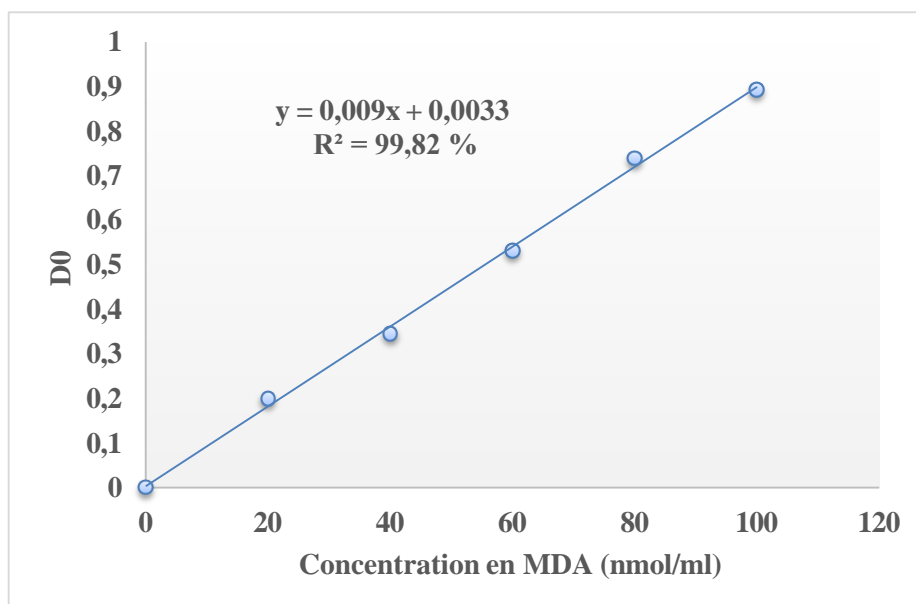
Produits utilisés

- Acide thiobarbiturique (TBA).

Mode opératoire

- Dissoudre 0,6 g du TBA dans 80 ml d'eau distillée ;
- Mélanger puis titrer avec une solution de NaOH (2N) jusqu'à la dissolution complète du TBA ;
- Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Représentation graphique de la courbe d'étalonnage du MDA



Dosage des vitellines

Tampon Tris-HCl

Produits utilisés

- Tris0,5 M
- Acide chlorhydrique (HCl).....37 %

Préparation

- Dissoudre 3,02 g de Tris dans 300 ml d'eau distillée. Cela permettra d'obtenir une solution de Tris à environ 0,5 M.
- Ajuster le pH de la solution à 7,4 en utilisant de l'HCl concentré (37 %). Cela peut être fait lentement en ajoutant de l'HCl goutte à goutte tout en vérifiant régulièrement le pH à l'aide d'un pH-mètre ou de bandes de pH.
- Compléter la solution avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml.

Tampon complet Tris-NaCl

Produits utilisés

- **Solution mère de Tris-HCl** (préparée ci-dessus)
- **NaCl** : 2,9 g pour 10 ml de solution
- **Eau distillée** : pour compléter le volume final

Préparation

- Dissoudre 2,9 g de NaCl dans 10 ml de la solution mère de Tris-HCl (obtenue ci-dessus). Cette solution doit être à une concentration de 0,5 M en NaCl.
- Compléter à **100 ml** le volume avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml. Cela donnera une solution de tampon Tris-NaCl prête à l'emploi à pH 7,4.

Protéines

Réactif protéique

Produits utilisés

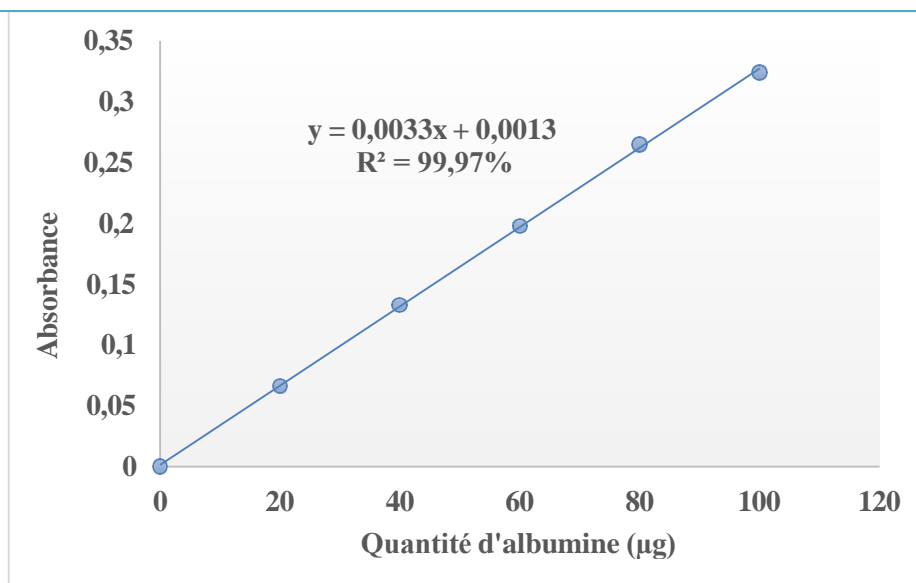
- Bleu brillant de Coomassie (G250).
- Éthanol..... 95 %
- Acide phosphorique 85 %

Préparation

- Dissoudre 100 mg du bleu brillant de Coomassie dans 50 ml d'éthanol ;
- Agiter 2 heures puis ajouter 100 ml d'acide phosphorique ;
- Mélanger puis ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml ;
- Agiter puis filtrer sur papier filtre Whatman N°1.
- Solution stable pendant plusieurs semaines à l'obscurité et à 4 °C.

Dosage des protéines, réalisation de la gamme d'étalonnage:

Tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de (BSA µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4



Dosage des protéines : droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg) (R^2 : coefficient de détermination)

Communications scientifiques

64th International Symposium on Crop Protection Ghent, Belgium, May 22, 2012. L'intitulée de la communication : «CHRONIC TOXIC EFFECTS OF ACTARA ON A NON-TARGET FISH SPECIES GAMBUSIA AFFINIS: NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS».

XIVèmes Journées Tunisiennes des Sciences de la Mer, Tabarka, Tunisie, 15-18 Décembre 2012. «TOXICITE AIGÛE DE L'ACTARA SUR GAMBUSIA AFFINIS : PARAMETRES DE LETALITE ET ACTIVITES ENZYMATIQUES».

6èmes Journées Scientifiques de l'ATT « Processus Toxiques – Bioactivité - Biosurveillance » Tabarka, Tunisie, 21 - 23 Janvier 2017. TOXICIE AIGUE D'UN PERTURBATEUR ENDOCRINIEN « BISPHENOL A » SUR GAMBUSIA AFFINIS. PARAMETRE DE LETALITE ET ACTIVITE ENZYMATIQUE.

Vème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources 22 – 25 Mars 2017, Tabarka – TUNISIE. TOXICITÉ AIGÛE D'UN PERTURBATEUR ENDOCRINIEN « BISPHENOL A» SUR GAMBUSIA AFFINIS : (CYPRINODONTIFORME, POECILIIDAE) PARAMÈTRES DE LÉTALITÉ, IMPACT SUR LA CROISSANCE ET INDICES METRIQUE.

4ème congrès international de la Biodiversité Végétale et de la Biotechnologie 5 - 8 octobre 2017, Marrakech – Maroc. ÉVALUATION DE L'IMPACT DU BISPHENOL A SUR LES ADULTES MALES DE GAMBUSIA AFFINIS (CYPRINODONTIFORME, POECILIIDAE).

3ème colloque international francophone en environnement et santé. 23 et 24 octobre 2017 ULCO - 59375 Dunkerque – France. EFFET D'UN PERTURBATEUR ENDOCRINIEN « BISPHENOL A» SUR UN ORGANISME SENTINELLE D'EAU DOUCE : GAMBUSIA AFFINIS (CYPRINODONTIFORME, POECILIIDAE) : TOXICITE AIGÛE ET CHRONIQUE, IMPACT SUR LA CROISSANCE ET INDICES METRIQUE, STRESS OXYDATIF.

VIIème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources 20-23 Mars 2018, THABRACA-Tabarka, TUNISIE. EFFET DU BISPHENOL A SUR LA DESCENDANCE D'UN ORGANISME SENTINELLE D'EAU DOUCE GAMBUSIA AFFINIS (CYPRINODONTIFORME, POECILIIDAE).

International Seminar on Valorization of Agronomic, Ecological and Food Resources (ISVAEFR 2022) 18 – 20 Octobre 2022, University August 20, 1955 Skikda. IMPACT DE LA TOXICITÉ CHRONIQUE DU BISPHENOL A SUR UN ORGANISME SENTINELLE D'EAU DOUCE : MALONDIALDEHYDE, CATALASE ET ACETYLCHOLINESTERASE.

Effect of subacute treatment with bisphenol A on oxidative stress biomarkers and lipid peroxidation in *Gambusia affinis* mosquitofish

Original Article | Published: 06 December 2022
Volume 15, pages 61–72, (2023) [Cite this article](#)



Toxicology and Environmental Health
Sciences

[Aims and scope](#) →

[Submit manuscript](#) →

Toxicology and Environmental Health Sciences
<https://doi.org/10.1007/s13530-022-00161-6>

ORIGINAL ARTICLE



Effect of subacute treatment with bisphenol A on oxidative stress biomarkers and lipid peroxidation in *Gambusia affinis* mosquitofish

Rahma Belhamra¹ · Lazhari Tichati² · Fouzia Trea¹ · Kheireddine Ouali¹

Accepted: 23 November 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Korean Society of Environmental Risk Assessment and Health Science 2022

Abstract

Objective Considerable environmental pollution is commonly caused by plastics in marine ecosystems, and as plastics breakdown, many toxic chemicals, including polycarbonate and bisphenol-A, are released, adversely affecting the health of marine organisms. In this regard, the present work was devoted to study the toxic effect of bisphenol A (BPA), an endocrine disruptor, in the freshwater crucian fish *Gambusia affinis*.

Methods The acute toxicity of BPA was examined in adult male *G. affinis* with two lethal concentrations, LC₂₅ and LC₅₀, in which the confidence intervals were determined after 24, 48, 72, and 96 h of the exposure period. The oxidative stress markers, including the enzymatic activity of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and acetylcholinesterase (AChE), and the contents of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) in the hepatopancreas of control and treated fish were determined for 60 days. In addition, the study was included histopathological examinations of testes.

Result The toxic effect of BPA exposure increased with exposure time and concentration. Chronic exposure to BPA markedly decreased the levels of reduced glutathione (GSH) and the enzymatic activity of brain acetylcholinesterase (AChE), and in contrast, CAT and GST activity and MDA levels were significantly increased.

Conclusions BPA-exposed fish exhibited severe concentration-dependent acute toxicity, as evidenced by the induction of oxidative injuries, disruption of the neurotransmission process, and subsequently decreased motor activity and alterations in spermatogenesis.

Keywords Bisphenol A · *Gambusia affinis* · Acute toxicity · Chronic toxicity · Oxidative stress markers

Introduction

Disposing wastes that contain endocrine disruptors (ED), including alkylphenols, bisphenols, pesticides, or hormone-derived molecules, in the aquatic environment introduce increased risks to marine organisms [1, 2]. Bisphenol A (BPA), 4,4'-isopropylidenediphenol, is a synthetic oestrogenic chemical compound that has been widely applied for more than 50 years as a monomer for the synthesis of polycarbonate and epoxy resins [3]. The amount of disposed wastes that contain BPA, in environment, in environment was estimated at 450 tons/year [4], and the compound can be introduced into aquatic systems via several sources, including soil leaching and leaching of discharge from the domestic and petrochemical industry [5, 6]. Additionally, BPA was found in water surfaces from nondetectable concentrations of 56 µg/L and 0.2 to 13,000 ng/g [7] in fauna, especially in fishes. Animals and humans become exposed to bisphenol A (BPA) by consuming contaminated drinking water and food,

✉ Kheireddine Ouali
kheireddine.ouali@univ-annaba.dz

Rahma Belhamra
belhamrahma23@gmail.com

Lazhari Tichati
lazherbio@hotmail.fr

Fouzia Trea
fouzia.trea@univ-annaba.dz

¹ Present Address: Laboratory of Environmental Biosurveillance (LBSE), Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji-Mokhtar University, BP 12 El Hadjar, 23000 Annaba, Algeria

² Environmental Research Center, Sidi Amar Campus, 23000 Annaba, Algeria



Effect of subacute treatment with bisphenol A on oxidative stress biomarkers and lipid peroxidation in *Gambusia affinis* mosquitofish

Rahma Belhamra¹ · Lazhari Tichati² · Fouzia Trea¹ · Kheireddine Ouali¹

Accepted: 23 November 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Korean Society of Environmental Risk Assessment and Health Science 2022

Abstract

Objective Considerable environmental pollution is commonly caused by plastics in marine ecosystems, and as plastics breakdown, many toxic chemicals, including polycarbonate and bisphenol-A, are released, adversely affecting the health of marine organisms. In this regard, the present work was devoted to study the toxic effect of bisphenol A (BPA), an endocrine disruptor, in the freshwater crucian fish *Gambusia affinis*.

Methods The acute toxicity of BPA was examined in adult male *G. affinis* with two lethal concentrations, LC₂₅ and LC₅₀, in which the confidence intervals were determined after 24, 48, 72, and 96 h of the exposure period. The oxidative stress markers, including the enzymatic activity of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and acetylcholinesterase (AChE), and the contents of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) in the hepatopancreas of control and treated fish were determined for 60 days. In addition, the study was included histopathological examinations of testes.

Result The toxic effect of BPA exposure increased with exposure time and concentration. Chronic exposure to BPA markedly decreased the levels of reduced glutathione (GSH) and the enzymatic activity of brain acetylcholinesterase (AChE), and in contrast, CAT and GST activity and MDA levels were significantly increased.

Conclusions BPA-exposed fish exhibited severe concentration-dependent acute toxicity, as evidenced by the induction of oxidative injuries, disruption of the neurotransmission process, and subsequently decreased motor activity and alterations in spermatogenesis.

Keywords Bisphenol A · *Gambusia affinis* · Acute toxicity · Chronic toxicity · Oxidative stress markers

Introduction

Disposing wastes that contain endocrine disruptors (ED), including alkylphenols, bisphenols, pesticides, or hormone-derived molecules, in the aquatic environment introduce increased risks to marine organisms [1, 2]. Bisphenol A (BPA), 4,4'-isopropylidenediphenol, is a synthetic oestrogenic chemical compound that has been widely applied for more than 50 years as a monomer for the synthesis of polycarbonate and epoxy resins [3]. The amount of disposed wastes that contain BPA, in environment, in environment was estimated at 450 tons/year [4], and the compound can be introduced into aquatic systems via several sources, including soil leaching and leaching of discharge from the domestic and petrochemical industry [5, 6]. Additionally, BPA was found in water surfaces from nondetectable concentrations of 56 µg/L and 0.2 to 13,000 ng/g [7] in fauna, especially in fishes. Animals and humans become exposed to bisphenol A (BPA) by consuming contaminated drinking water and food,

✉ Kheireddine Ouali
kheireddine.ouali@univ-annaba.dz

Rahma Belhamra
belhamrahma23@gmail.com

Lazhari Tichati
lazherbio@hotmail.fr

Fouzia Trea
fouzia.trea@univ-annaba.dz

¹ Present Address: Laboratory of Environmental Biosurveillance (LBSE), Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji-Mokhtar University, BP 12 El Hadjar, 23000 Annaba, Algeria

² Environmental Research Center, Sidi Amar Campus, 23000 Annaba, Algeria

as well as through skin contact; consequently, the compound poses adverse effects in both animal and human health [8, 9]. Additionally, bisphenol A (BPA) is classified as category 3 reproductive toxicants, affecting developmental processes endocrine, immune, and nervous system functions [10, 11].

The hepatopancreas, brain, and testis tissues are the organs involved in reproduction and the main indices for the evaluation of fish reproductive health. The liver is the major organ responsible for metabolism, detoxification, biliation, immunization, and preventing epidemics and thereby regulates diverse metabolic functions in mammalian systems [12, 13]. Furthermore, oxidative damage in the brain may lead to impairment in hepatopancreas function, and subsequently, testis injury resulting in synthesis inhibition of sexual hormones in the testis [14].

BPA was reported to induce liver dysfunction through the generation of reactive oxygen species (ROS), causing liver oxidative damage [12–15]. In this context, Mukherjee et al. [16] showed that BPA exposure in *Labeo bata* increased lipid peroxidation and oxidative stress. In addition, the sensitivity of endogenous antioxidants in fish might be an effective indicator of exposure to aquatic pollutants such as BPA [17–20]. As reported, low concentrations of BPA can induce alterations in antioxidant enzymatic activity in the brain, liver, gills, and kidneys in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [15]. BPA has significant adverse effects on different trophic level and nutrient cycling in marine environment, fishes are naturally vulnerable to BPA induce toxicity [18, 20, 21]. Moreover, toxicity assessments offer valuable tools in monitoring environments to protect human and environmental health against chronic or acute exposure to toxic pollutants [22, 23]. The average concentration that affects organisms after a given exposure period can be assessed through chronic assays [17, 24], since additional assays are needed to complete these studies and to record changes in specified biochemical markers during exposure to various pollutants. Importantly, assessing the health status of fish exposed to xenobiotics by determining oxidative stress

markers, such as catalase, glutathione-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE), and glutathione peroxidase (GPx), can help to determine the toxic profile of emerging pollutants [25–27]. *Gambusia affinis* [28], a mosquitofish, is a small freshwater ovoviviparous fish that originated in Central America and Florida and was introduced into Algeria to biologically fight mosquito larvae due to its aptitude in biological control and strong adaptability; in addition, the fish can be used as an indicator organism for toxicological assays that test pollutants [29, 30]. Therefore, this study was undertaken to determine the acute toxicity (LC_{25} and LC_{50}) of BPA after 24, 48, 72 and 96 h and to examine the sensitivity of the hepatopancreas pro/antioxidative parameters and histopathological observations of the male reproductive system after chronic exposure to BPA.

Results

Acute toxicity of bisphenol A

Toxicity static non-renewable tests were performed with different concentrations (5, 10, 15, 20 and 25 mg/L) to assess the lethal concentrations 25 (LC_{25}) and 50 (LC_{50}) (the concentration of the test substance that is lethal to 50 and 25% of the organism) for 24, 48, 72 and 96 h of exposure. As shown in Fig. 1, all the male mosquitofish in the control group survived, whereas all fishes died after being exposed to 25 mg/L BPA for 96 h. The $LC_{25}/96$ h and $LC_{50}/96$ h values were 4.74 mg/L and 7.74 mg/L, respectively (Table 1). The observed mortality rate started from $33.33 \pm 2.58\%$ in the treated individuals with a low concentration (10 mg/L) at 24 h to 96. $67 \pm 2.58\%$ for the treated individuals with the highest concentration (20 mg/L) at 96 h. The mortality rate indicates a very significant concentration effect ($p < 0.001$).

BPA exposure at 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h at different concentrations caused fish mortality with a dose–response relationship.

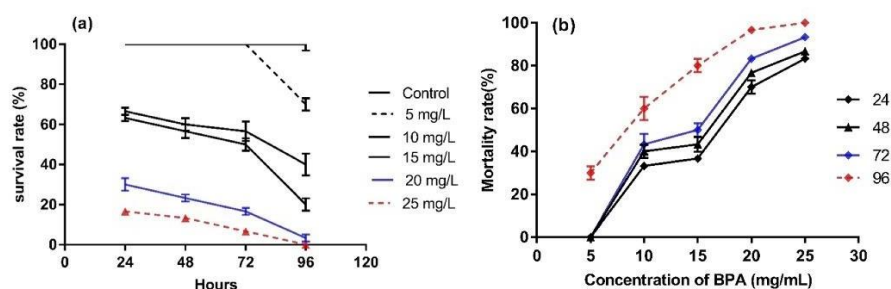


Fig. 1 The survival rate (a) and mortality rate (b) of fish during the acute BPA exposure Concentrations are given in Mean \pm SEM

Table 1 Acute toxicity and confidence intervals (CI) of adult male *G. affinis* exposed to BPA after 24, 48, 72, and 96 h

Exposure time (hours)	Regression line	Slope	LC ₂₅ IC (95%)	LC ₅₀ IC (95%)
24 h	$y = 3,6543x + 0,7209$	1,87	9,99 (7,57–2,64)	14,82 (12,67–17,34)
48 h	$y = 4,5391x - 0,7123$	1,89	8,52 (6,44–11,87)	13,49 (10,52–16,71)
72 h	$y = 3,8047x + 0,7875$	1,70	8,07 (5,23–10,98)	12,27 (10,16–14,81)
96 h	$y = 3,663x + 1,770$	1,87	4,74 (2,74–7,89)	7,74 (4,46–10,8)

Effect of BPA exposure on oxidative stress in mosquitofish

Effects of BPA on reduced glutathione (GSH) contents

As shown in Fig. 2a, the exposure of male *G. affinis* to BPA caused significant adverse effects on the hepatopancreas redox state, as evidenced by a very significant decrease ($P < 0.01$) in GSH content from the 15th day to the 45th day for the two tested concentrations of BPA (LC₂₅ (4.74 mg/L) and LC₅₀ (7.74 mg/L) compared to that of the control group. However, the GSH level recorded on the 60th day was significantly recovered ($P < 0.05$) compared to that observed on the 45th day of treatment with the two concentrations of BPA.

Effects of BPA on lipid peroxidation levels

Figure 2B shows that the two tested concentrations (4.74 and 7.74 mg/L) caused a marked concentration-dependent increase in the level of lipid peroxidation from the 15th day to the 60th day and a very significant increase ($P < 0.001$) in the MDA level compared to that of the control group.

Effects of BPA on antioxidant enzyme activities

As shown in Fig. 3, BPA at the two tested concentrations caused a significant increase in the enzymatic activity of CAT ($P < 0.05$) in the male fish hepatopancreas (4.74 and 7.74 mg/L) from the 15th day to the 45th day but was re-established at the 60th day ($P < 0.01$) compared to that

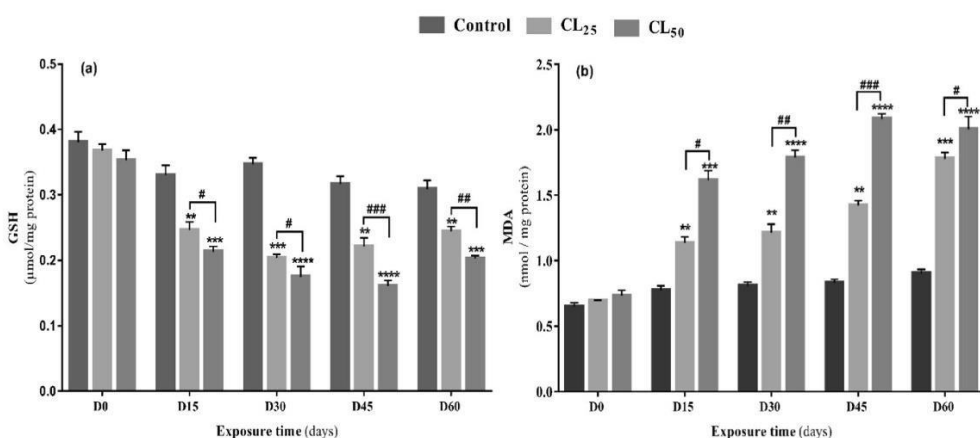


Fig. 2 Levels of reduced glutathione (GSH) **a** and malondialdehyde (MDA) **b** in the hepatopancreas of control and experimental groups (C: controls group; BPA: Bisphenol A; LC₂₅ and LC₅₀ BPA treated groups after 0, 15, 30, 45 and 60 days of exposure) Data are

expressed as mean ± SM ($n = 5$ per group). Significant differences: LC₂₅ group and LC₅₀ group versus control group (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$); LC₅₀ group versus LC₂₅ group (### $p < .001$; ## $p < 0.01$; # $p < 0.05$).

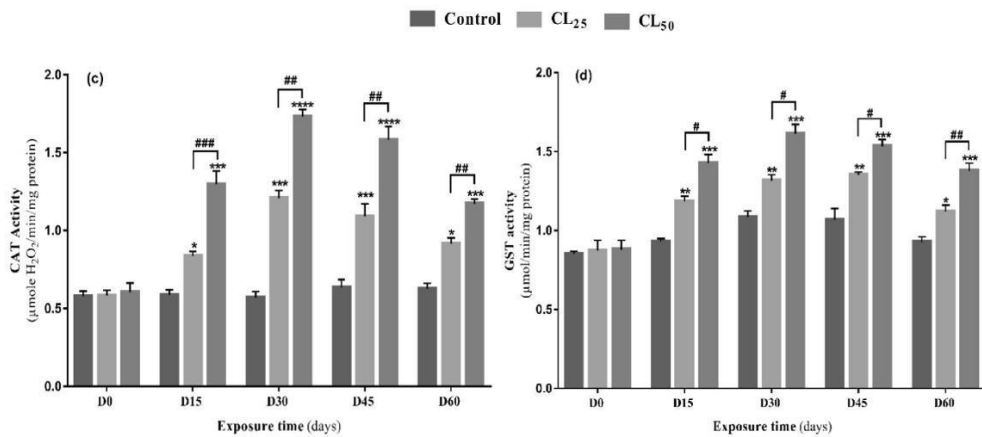


Fig. 3 Hepatopancreatic antioxidant enzyme activity: Catalase (CAT) **c** and glutathione S-transferase (GST) **d** in control and experimental groups; C: controls group; BPA: Bisphenol A; LC₂₅ and LC₅₀ BPA treated groups after 0, 15, 30, 45 and 60 days of exposure. Data are

expressed as mean ± SM ($n=5$ per group). Significant differences: LC₂₅ group and LC₅₀ group versus control group (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.05$); LC₅₀ group versus LC₂₅ group (### $p < 0.001$; ## $p < 0.01$; # $p < 0.05$).

observed on the 45th day (Fig. 3c). While the enzymatic activity of GST was significantly increased ($P < 0.05$) at both BPA concentrations (4.74 and 7.74 m) from the 15th day to the 45th day, the enzymatic activity showed two distinct trends in response to BPA at the 60th day of exposure.

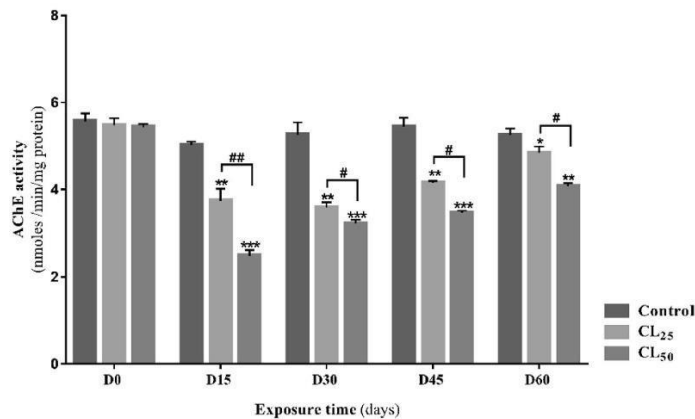
The GST activity of mosquitofish exposed to 7.74 mg/L of BPA was not differ compared to that observed on the 45th day, while the GST activity of mosquitofish exposed to 4.74 mg of BPA was re-established at the 60th day ($P < 0.01$) compared to that observed on the 45th day (Fig. 3d).

Neurotoxicity biomarkers

Effects of BPA exposure on brain acetylcholinesterase activity

Figure 4 reveals that the specific activity of AChE was very significantly inhibited from the 15th percentile in the LC₂₅ and LC₅₀ BPA in the treated groups compared to the control group (LC₂₅: 3.06 ± 0.3 and LC₅₀: 2.17 ± 0.06 vs. control 5.49 ± 0.29). These differences were highly significant ($p < 0.001$) on the 45th day of treatment, and lower

Fig. 4 Brain acetylcholinesterase (AChE) activity in control and treated *G. affinis* groups; C: controls group; BPA: Bisphenol A; LC₂₅ and LC₅₀ BPA treated groups after 0, 15, 30, 45 and 60 days of exposure. Data are expressed as mean ± SM ($n=5$ per group). Significant differences: LC₂₅ group and LC₅₀ group versus control group (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$); LC₅₀ group versus LC₂₅ group (## $p < 0.01$; # $p < 0.05$).



enzymatic activity of AChE (LC_{25} : 2.19 ± 0.20 and LC_{50} : 1.78 ± 0.05) was observed in BPA-treated fish compared to controls (Fig. 4). The analysis of variance with two tested variables (treatment, time) showed a highly significant ($P < 0.001$) treatment, time, and interaction effect (from the 15th day to the 45th day). However, the AChE activity of male mosquitofish was significantly increased ($P < 0.05$) in fish exposed to both concentrations of BPA on the 60th day compared to that observed on the 45th day.

Principal component analysis (PCA)

Figure 5 shows the projection of the five variables, namely, the enzymatic and nonenzymatic antioxidant markers measured in the control and treated groups on the PCA plan defined by principal components 1 and 2, which describe X: 91.09% and Y: 5.16% of the total variance, respectively. The first gradient is associated with a strong influence of BPA exposure on the enzymatic activity of CAT and GST and the content of MDA. The first axis describes a correlation of 96.25% of the variance of these parameters. The second gradient is related to GSH level and AChE activity (Fig. 5a). The PCA biplot shows two clear pairs of components and highlights the effect of BPA exposure on the measured variables. The first component is associated with CAT, GST, and MDA, while the second is associated with GSH and AChE (Fig. 5b).

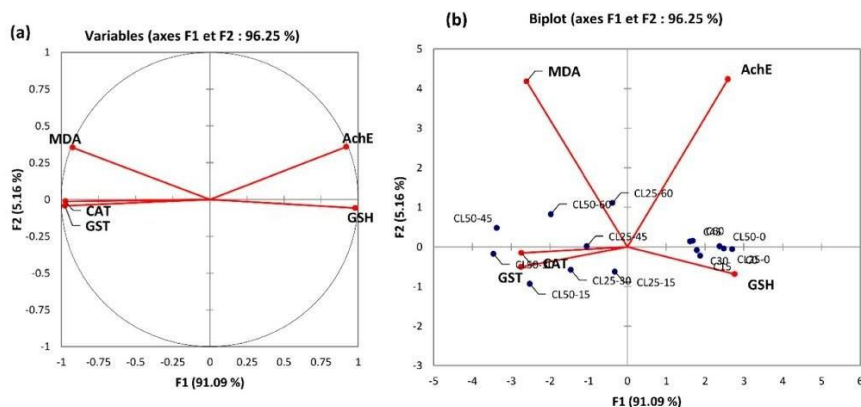


Fig. 5 Principal component analysis performed on 05 variables of oxidative stress biomarkers. Factorial plan: F1: 91.09%, F2: 5.16% **a**. Biplot results, projection of stress, oxidative variable, and markers in control and treated groups on the first two principal axes C: controls group; BPA: Bisphenol A; LC_{25} and LC_{50} BPA treated groups

Effect of BPA treatment on the histological structure of testes

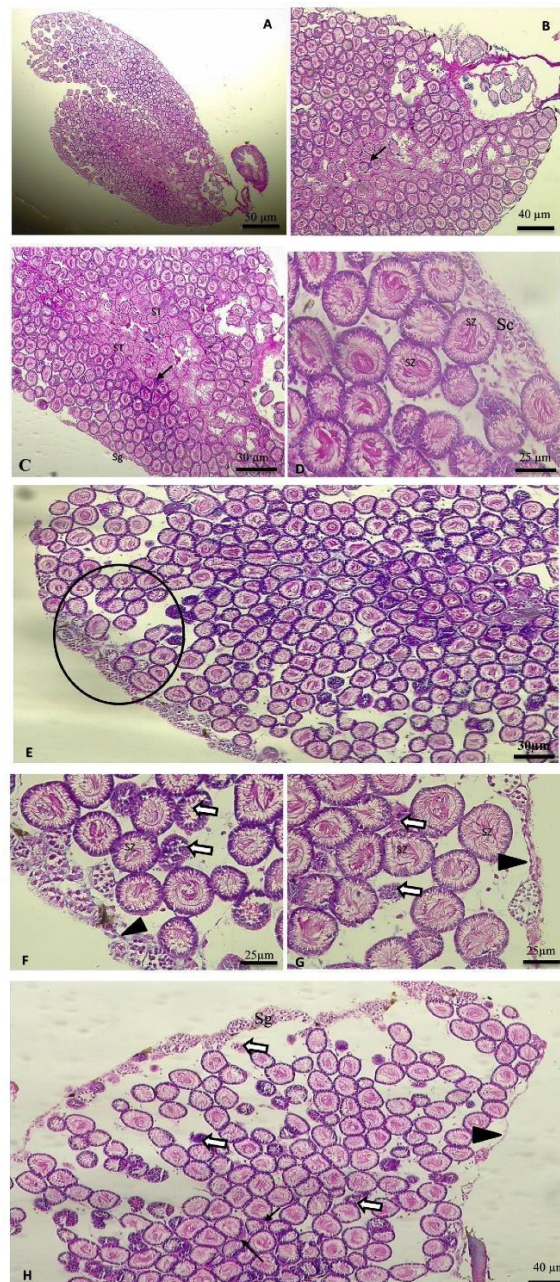
Testes from the control group showed an intact cyst structure and exhibited all stages of spermatogenesis (Fig. 6 A, B and C). However, the testes of fish chronically exposed to BPA showed cyst degradation, which was associated with the germinal epithelium thinning and interstitial cells not being bound to the Sertoli cell, but no signs of intersex were observed (Fig. 6 D, E and F).

Discussion

Bisphenol A (BPA) is widely used in different forms (e.g., polycarbonates and epoxy phenolic resins) in the plastics industry [31] and is introduced into aquatic ecosystems via industrial and domestic discharges, thus affecting the health and performance of aquatic species [32, 33]. Therefore, BPA was chosen in the present study to test its possible toxic effects on the nontarget organism *Gambusia affinis*. Herein, the acute toxicity of different concentrations (5, 10, 15, 20, and 25 mg/L) of BPA was investigated in male adults of *Gambusia affinis* to estimate the lethal concentrations 25 (LC_{25}) and 50 (LC_{50}) and their 95% confidence intervals at different exposure periods (24, 48, 72 and 96 h). The toxicological results revealed that BPA toxicity in adult males of *Gambusia affinis* was affected by the concentration and exposure time. The lethal concentrations expressed in mg/

after 0, 15, 30, 45, and 60 days of exposure. Reduced glutathione (GSH) **a** and malondialdehyde (MDA) content, and Catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and acetylcholinesterase activity (AChE).

Fig. 6 *Gambusia affinis* testis histology of control (A, B, C, and D) and BPA-treated fish (E, F, G, and H) showed different states of spermatogenesis. (A, B, and C) Spermatogonia (Sg) on the testis periphery, Germ cells in cysts are in several stages of spermatogenesis: spermatocyte (SC), spermatid (ST), and spermatozoa (SZ). The nuclei of spermatozoa are associated with Sertoli cell (black arrow). E, F, and G histological sections of BPA-treated fish with LC₂₀ and H treated with LC₅₀ showed a significant reduction of cyst number, and the arrangement was clearly disrupted with thinning of the germinal epithelium (black-heads) resulting in congestion of sperm cells (whiteheads) (Scale bar = 25–50 μ m)



were approximately 9.99, 8.52, 8.07 and 4.74 for the LC₂₅ and 14.82, 13.49, 12.27, and 7.74 for the LC₅₀ at 24, 48, 72, and 96 h of the exposure period, respectively. Furthermore, toxicity assessment is an essential step in environmental monitoring to preserve aquatic life. Organisms can respond to stress through adapting their biological responses, which is a predictive indicator of the state of these organisms [34].

Oxidative stress is the first biological response to environmental stressors [22]. In this regard, the antioxidants activities and lipid peroxidation in aquatic organisms are instrumental in aquatic environment monitoring programs and may be used as reliable biomarkers for an assessment of exposure to toxic chemicals [20, 35]. In addition, the effect of 4.74 mg/L and 7.74 mg/L (LC₂₅ and LC₅₀) BPA exposure in adult males of *Gambusia affinis* for 60 days was concentration and time-dependent, and accordingly, the results showed a significant increase in the level of MDA along with a significant decrease in the hepatopancreatic GSH content in LC₂₅ and LC₅₀-BPA-exposed individuals from the 15th day to the 45th day. This response profile favours an imbalance between antioxidants and oxidants that can oxidize lipids and mainly generate MDA, a toxic compound produced by lipid peroxidation that can alter the fluidity and function of membranes [22, 26, 36]. Interestingly, the toxic effect of BPA was shown to involve its pro-oxidant effect by generating free radicals that are responsible for the oxidation of cell molecules and disruption of cellular metabolism [37, 38]. In this context, Kankaya et al. [36] reported a significant decrease in GSH and an increase in MDA levels in *Chalcalburnus tarichi* larvae exposed to BPA. Similarly, Sharma and Chadha [20] reported increased lipid oxidation levels and decreased enzymatic antioxidant activity in *Channa punctatus* freshwater fish that were exposed to BPA at concentrations of 1.81 mg/l (1/4 of LC₅₀) and 3.81 mg/l (1/2 of LC₅₀). Additionally, Qiu et al. [39] reported an increase in lipid peroxidation, which was associated with an inhibition in CAT activity in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) that were exposed to different concentrations (0, 1, 1, 10, 100, and 1000 µg/L) of BPA for 30 days. The results also showed decreased levels of hepatopancreatic reduced glutathione (GSH) in the groups exposed to the two tested concentrations of BPA (4.47 and 7.74 mg/L) compared to the control group. This result confirms the potential effect of BPA-induced oxidative stress in hepatopancreatic tissues [40]. The reduced GSH exerts its role in synergy with antioxidant enzymes, such as glutathione-S-transferase, to prevent damage to cellular components by scavenging free radicals [19]. Recently, several studies have reported reduced levels of GSH in fish exposed to BPA, which is in accordance with our findings [20, 35, 40]. Hence, the enzymatic activity of CAT and GST increased from the 15th day to the 45th day in the BPA treatment [26]. Catalase is an antioxidant enzyme that catalyses the metabolism of hydrogen peroxide (H₂O₂) into H₂O and O₂ in aerobic organisms in response to various pollutants [41].

In this study, CAT activity was significantly increased in a concentration-dependent manner following 15, 30 and 45 days of exposure to BPA. The increase in CAT activity indicates that the enzyme was able to remove H₂O₂ and other organic peroxides, which are generated as a by-product of oxygen metabolism [42]. This result is in-line with the results reported following exposure to BPA and its analogues [38, 42, 43]. Nevertheless, the CAT activity was decreased from the 60th day of treatment, suggesting that the fish adapted to a state of oxidative stress, which was induced by BPA. In the same way, the GST activity was significantly increased in a time- and concentration-dependent manner and then recovered from the 45th day of BPA treatment. GST, a specific phase II biotransformation enzyme, is used as a biomarker for exposure to chemicals in aquatic environments [18, 44]. The marked change in this enzyme activity is likely due to the increase in the production of ROS that affect the pro-oxidant/antioxidant balance [40]. Likewise, previous studies [45, 46] have reported an increase in GST activity in hepatocytes of pearl mullet and *Astacus leptodactylus* exposed to BPA. However, the GST activity of fish exposed to 4.74 mg of BPA was re-established on the 60th day, which can be explained by the presence of an inhibiting antioxidant system that may reflect adaptations by fish.

Consequently, CAT and GST were found to be sensitive indicators of enhanced oxidative stress in *G. affinis* that were exposed to BPA. Moreover, acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme involved in regulating neurotransmission, in which the neurotransmitter acetylcholine undergoes hydrolysis, and is commonly used as a biomarker of neurotoxic contamination [47]. The inhibition of AChE enzymatic activity leads to an accumulation of the neurotransmitter and a specific overstimulation of neurons in the neuromuscular junction; thus, the inhibition causes disturbances in the transmission of nerve impulses. The activity of acetylcholinesterase in the brain of *G. affinis* exposed to BPA revealed a significant concentration and time-response inhibition of this enzyme. This result is similar to that reported in the study by Hamed and Abdel-Tawwab [21], who investigated the effects of BPA on tilapia, in which the enzymatic activity of AChE was significantly decreased. In addition, AChE activity can be inhibited by various pollutants, mainly pesticides [47, 48], which consequently may affect the locomotor activity and life cycle (reproduction and nutrition) of the exposed species.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Bisphenol A (C₁₅H₁₆O₂; purity > 99%), as well as the other chemical products used in this study, were supplied by Sigma Chemical Co. (St Louis, France) (Fig. 7).

Sampling site

The sample specimens were collected in April from a freshwater reservoir in Ain El Berda (36°44'50" N and 7°40'14" E) that is fed by rainwater and is located 38 km southwest of Annaba (Eastern Algeria) (Fig. 8). The sampling site is far from any human activities, contains shallow aquatic vegetation and densely carpets the bottom of the pond. The water in the sampling site is characterized by a temperature of 21.0 ± 0.3 °C, salinity of 318.4 ± 43.4 mg/L, pH of 7.4 ± 0.1 , and dissolved oxygen rate of 3.5 ± 0.4 mg/L.

Biological materials

The collected specimens were stored in a cooler container and then transported to the laboratory for analysis. Fish breeding was performed in aquariums (capacity of 50 to 80 L) filled with tap water that was previously exposed to the open air for 24 h to evaporate the sodium hypochlorite. The fish were acclimatized for two weeks and received a prepared food daily that was based on shrimp and dehydrated fish and marketed under the name Tetramin® (Tetra-werk, Germany). The aquarium water was changed every two days since all debris were removed daily. Similar-sized healthy and active adult male fish were used for the toxicological evaluations (enzymatic activities evaluation).

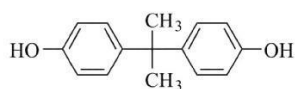


Fig.7 Chemical structure of bisphenol A

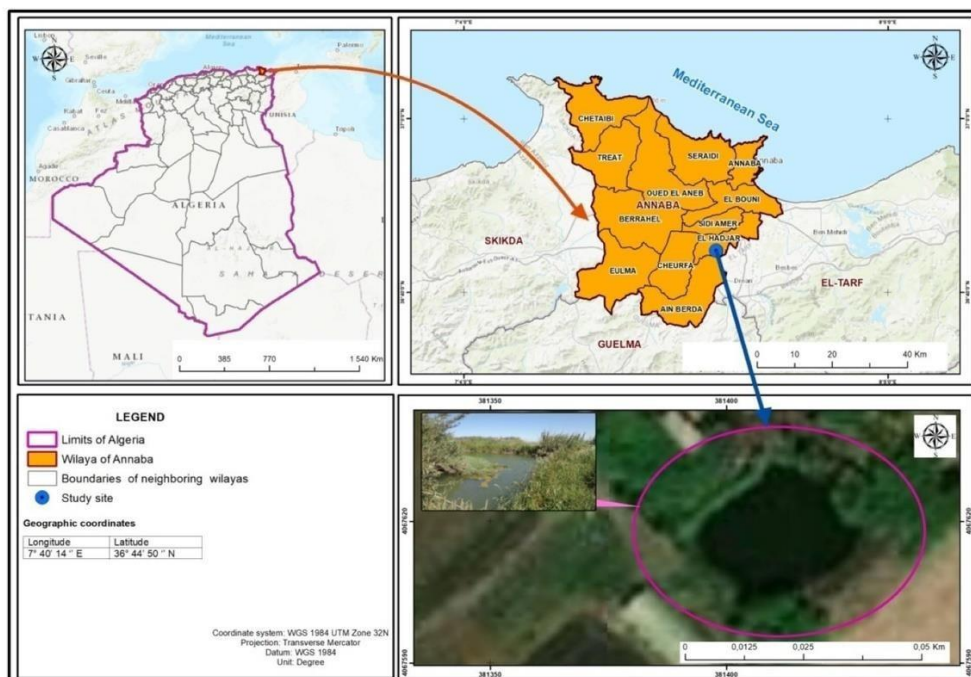


Fig. 8 The geographical location of the sampling site (Ain El Berda, Annaba, Algeria)

Experimental design

Toxicity test

A static non-renewable acute toxicity bioassay was conducted according to a standard method [49] to determine the lethal concentration (25 LC₂₅ and 50 LC₅₀) of BPA for *G. affinis* following exposure for 96 h. A stock solution of BPA was prepared by dissolving 1 g in an appropriate amount of dimethyl sulfoxide (DMSO Merck, Germany) and tap water was added to obtain a final volume of 1000 ml. To determine the lethal concentrations of BPA during 96 h of exposure, different concentrations of BPA (5, 10, 15, 20, and 25 mg/L) were prepared from the stock solution and added to glass tanks filled with 10 L of water. Ten fish were introduced into each tank 1 day before the experiment. Three replicates were maintained for each concentration. The percentage of mortality for fish exposed to different concentrations of bisphenol after 24, 48, 72, and 96 h was determined; then, the LC₂₅ and LC₅₀ values were calculated.

Chronic toxicity study of BPA

Chronic exposure to BPA was studied over 60 days. Here, male *G. affinis* samples were placed in glass jars fitted with an air pump and filters. Each jar contained ten similar-sized specimens in 1 L of water that was previously acclimatized before contamination, and the specimen was divided into the following experimental groups:

- Group I: Control untreated group.
- Group II: LC₂₅ (4,74 mg/L) BPA-treated group.
- Group III: LC₅₀ (7,74 mg/L) BPA-treated group.

Samples were taken from the control and treated groups at every 15 days interval from time 0 to the 60th day. At the end of the experimentation, the specimens were placed on ice at 4 °C to reduce (stop) their vital functions and to avoid the risk of protein denaturation. The hepatopancreas and heads of sampled fish were removed and placed separately in spittoons to be used for grinding.

Preparation of the homogenate

The fish organ samples were excised and ground with a homogenizer in Tris-buffered saline (TBS) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) based on a weight/volume ratio of 1/3. The obtained crushed material was centrifuged at 9000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatant containing the postmitochondrial fraction (S9) was aliquoted into

Eppendorf tubes and stored at –80 °C for the biochemical assays.

Oxidative stress markers

Determination of lipid peroxidation

The thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels in the hepatopancreatic homogenates were determined as a marker of lipid peroxidation according to the method of Buege and Aust [50]. Briefly, 375 µL of the supernatant was added to 150 µL of TBS (pH 7.4) and 375 µL of the TCA-BHT solution (trichloroacetic acid (TCA) 20%, butylated hydroxytoluene (BHT) 1%). After stirring and centrifugation (1000 g, 10 min at 4 °C), 400 µL of the supernatant was added to 80 µL of HCl (0.6 M) and 320 µL of Tris-TBA solution (26 mM Tris, 120 mM TBA (thiobarbituric acid)), and then the mixture was incubated in a water bath at a temperature of 80 °C for 10 min. The optical densities were measured at 530 nm, and the levels of TBARS were calculated using a molar extinction coefficient of 1.56 10⁵ M/cm.

Determination of reduced glutathione levels

The level of reduced glutathione (GSH) was determined according to the method by Ellman (1959), which was modified by a previous source [51]. In brief, 0.8 mL of the tissue homogenate was mixed with 0.3 ml of sulfosalicylic acid solution (0.25%), maintained for 15 min in an ice bath, and then centrifuged at 2500 × g for 15 min at 4 °C. After that 0.5 ml of the resulting supernatant was mixed with 1 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.025 mL of DTNB (0.01 M), stirred, and incubated for 5 min at room temperature. The optical density of the mixtures was measured at 412 nm, and the total GSH content was expressed in µmole of GSH per milligram of protein.

Determination of catalase activity

Catalase activity (CAT) was determined as previously described [52]. The enzyme catalyses the decomposition of hydrogen peroxide (H₂O₂) to water and oxygen in a mixture containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), 200 µL of H₂O₂ (500 mM), and 20 µL of homogenate. After incubation for 1 min at 25 °C, the absorbance was measured consecutively at 240 nm by the variation in optical density during the enzymatic reaction. Catalase activity was expressed in µmol of H₂O₂/min/mg of protein.

Determination of glutathione S-transferase activity

Glutathione S-transferase (GST) activity was determined as described previously [53]. In brief, 1 ml of the reaction mixture was prepared by mixing 0.830 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 6.5), 0.05 mL of C-DNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene) (0.02 M), 0.1 mL of glutathione (GSH) (0.1 M), and 0.02 mL of homogenate. The absorbance of the prepared mixtures was measured spectrophotometrically at 340 nm at 30 s intervals for 3 min. The protein levels were quantified by the Bradford method [54] using bovine albumin as a standard.

Determination of cholinesterase (AChE) activity

The enzymatic activity of AChE was determined as described by Ellman et al. [55]. In this method, the acetylcholinesterase contained in the supernatant of the brain reacts with acetylthiocholine (Asch) by releasing acetic acid and thiocholine (Sch). The latter in turn reacts with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) and results in the yellow product TNB, which absorbs at 412 nm and exhibits a concentration proportional to the number of enzymes present in the mixture. The reaction mixture was incubated for two minutes at 25 °C, and the hydrolysis of the substrate was assessed at a 412 nm wavelength and time interval of 25 min. The enzymatic activity was expressed in nmol/min/mg of protein.

Histopathological analysis

The testes from control and treated fish were fixed in formalin for 48, and after paraffin embedding, the larvae were cut into 5-micron thick sections. The sections were stained with haematoxylin eosin [56], examined under a microscope (Leica DM710) and photographed by a Leica microsystem camera (image processing software, LAZ EZ version 3).

Statistical analysis

Mean values of every assessment were recorded for five male fishes individually with three repetitions for each and then mean values were used for further statistical analyses. Data are displayed as the mean \pm SEM. Comparisons between different groups were tested by variance analysis (ANOVA) with Tukey's post hoc test. Statistical tests were conducted

by GraphPad Prism (Prism 7, version 7.00, GraphPad Software, California, USA), where $p < 0.05$ was considered significant. In addition, a principal component analysis (PCA) coupled with a correlation circle and Ward dendrogram was performed using XL stat to characterize the response of oxidative stress biomarkers by a multivariate approach.

Conclusions

The results obtained regarding the acute and chronic toxicity of BPA on a nontarget aquatic organism, *G. affinis*, are very useful for assessing early risks of environmental contamination by endocrine disruptors, mainly mimetic hormones. In addition, determining the effects of BPA pollution level on the biochemical responses of fish serves as a valuable tool for effectively monitoring aquatic ecosystems. Conclusively, the parameters assessed during the present study could be used as an appropriate indicator of BPA-induced stress in edible aquatic organisms.

Acknowledgements This research was supported by the National Fund for Scientific Research of Algeria DGSRTD and by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria.

Declarations

Conflict of interest Rahma BELHAMRA, Lazhari TICHATI, Fouzia TREA, Kheireddine OUALI declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants. Animal care was carried out in accordance with Badji Mokhtar-Annaba University animal care protocols.

References

1. Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J, Freeman J (2016) Toxicogenomics to evaluate endocrine disrupting effects of environmental chemicals using the zebrafish model. *Curr Genomics* 17(6):515–527
2. Pironti C, Ricciardi M, Proto BPM, Montano L, Motta O (2021) Endocrine-disrupting compounds: an overview on their occurrence in the aquatic environment and human exposure. *Water* 13(10):1347
3. Martínez R, Navarro-Martín L, Van Antro M, Fuertes I, Casado M, Barata C, Piña B (2020) Changes in lipid profiles induced by bisphenol A (BPA) in zebrafish eleutheroembryos during the yolk sac absorption stage. *Chemosphere* 246:125704
4. United States Environmental Protection Agency (2010). Decontamination research and development conference. U.S. environmental protection agency, Washington, DC, EPA/600/R-11/052, 2011
5. Schwarzenbach RP, Egli T, Hofstetter Von Gunten U, Wehrli B (2010) Global water pollution and human health. *Annu Rev Environ Resour* 35(1):109–136

6. Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E (2012) Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage* 104:19–34
7. Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, Williams ES, Brooks BW (2015) Global assessment of bisphenol A in the environment: review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose-Response* 13(3):1559325815598308
8. Rochester JR (2013) Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 42:132–155
9. Faheem M, Bhandari RK (2021) Detrimental effects of bisphenol compounds on physiology and reproduction in fish: a literature review. *Environ Toxicol Pharmacol* 81:103497
10. Preethi S, Sandhya K, Lebonah DE, Prasad CV, Sreedevi B, Chandrasekhar K, Kumari JP (2014) Toxicity of bisphenol a on humans: a review. *Int Lett Nat Sci* 27(2014):32–46
11. Tohmé M, Prud'homme SM, Boulahtouf A, Samarut E, Brunet F, Bernard L, Laudet V (2014) Estrogen-related receptor γ is an in vivo receptor of bisphenol A. *The FASEB J* 28(7):3124–3133
12. Faheem M, Jahan N, Lone KP (2016) Histopathological effects of bisphenol-A on liver, kidneys and gills of Indian major carp *Catla catla* (Hamilton 1822). *J Anim Plant Sci* 26(2):514–522
13. Barboza LGA, Cunha SC, Monteiro C, Fernandes JO, Guilhermino L (2020) Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the North East Atlantic Ocean in relation to microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers. *J Hazard Mater* 393:122419
14. Zhang Q-F, Li Y-W, Liu Z-H, Chen Q-L (2016) Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: Histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Aquat Toxicol* 177:417–424
15. Akram R, Iqbal R, Hussain R, Jabeen F, Ali M (2021) Evaluation of Oxidative stress, antioxidant enzymes and genotoxic potential of bisphenol A in fresh water bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fish at low concentrations. *Environ Pollut* 268:115896
16. Mukherjee U, Samanta A, Biswas S, Das S, Ghosh S, Mandal DK, Maitra S (2020) Bisphenol A-induced oxidative stress, hepatotoxicity and altered estrogen receptor expression in *Labeo bata*: impact on metabolic homeostasis and inflammatory response. *Ecotoxicol Environ Saf* 202:110944
17. Bustos-Obregon E, Vargas Á (2010) Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. *Biol Res* 43(3):357–362
18. Stara A, Pagano M, Capillo G, Fabrello J, Sandova M, Vazzana I (2020) Faggio C (2020a) Assessing the effects of neonicotinoid insecticide on the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Sci Total Environ* 700:134914
19. Faheem M, Lone KP (2017) Oxidative stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish *Ctenopharyngodon idella*. *Braz J Pharm Sci*. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000317003>
20. Sharma P, Chadha P (2021) Bisphenol A induced toxicity in blood cells of freshwater fish *Channa punctatus* after acute exposure. *Saudi J Biol Sci* 28(8):4738–4750
21. Hamed HS, Abdel-Tawwab M (2017) Ameliorative effect of propolis supplementation on alleviating bisphenol-A toxicity: growth performance, biochemical variables, and oxidative stress biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* 202:63–69
22. 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. *Aquat Toxicol* 196:132–145
23. EPA US (2002) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms; epa-821-r-02-012; us environmental protection agency: washington, DC, USA
24. Diaz-Sosa VR, Tapia-Salazar M, Wanner J, Cardenas-Chavez DL (2020) Monitoring and ecotoxicity assessment of emerging contaminants in wastewater discharge in the City of Prague (Czech Republic). *Water* 12(4):1079
25. Bartoskova M, Dobsikova R, Stancova V et al (2013) Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuro Endocrinol Lett* 34(2):102–108
26. Abdel-Tawwab M, Hamed HS (2018) Effect of bisphenol A toxicity on growth performance, biochemical variables, and oxidative stress biomarkers of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *J Appl Ichthyol* 34(5):1117–1125
27. Fiorino E, Sehonova P, Phalova L, Blahova J, Svobodova Z, Faggio C (2018) Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. *Environ Sci Pollut Res* 25(9):8542–8549
28. Baird SF and Girard CH (1853) Descriptions of new species of fishes collected by Mr. John H. Clark, on the US and Mexican Boundary Survey, under Lt. Col. Jas. D. Graham. In: Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.
29. Bao S, He C, Ku P, Xie M, Lin J, Lu S (2021) Nia X (2021) Effects of triclosan on the RedoximiR/Sirtuin/Nrf2/ARE signaling pathway in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Aquat Toxicol* 230:105679
30. Song X, Wang X, Li X, Yan X, Liang Y, Huang Y, Huang L (2021) Zeng H (2021) Histopathology and transcriptome reveals the tissue-specific hepatotoxicity and gills injury in mosquitofish (*Gambusia affinis*) induced by sublethal concentration of triclosan. *Ecotoxicol Environ Saf* 220:112325
31. Yazdani M, Andresen AMS, Gjøen T (2016) Short-term effect of bisphenol-a on oxidative stress responses in Atlantic salmon kidney cell line: a transcriptional study. *Toxicol Mech Methods* 26(4):295–300
32. Faheem M, Khaliq S, Lone KP (2019) Effect of bisphenol-A on serum biochemistry and liver function in the freshwater fish. *Cat-lacatla Pak Vet J* 39(1):1–5
33. Wu NC, Seebacher F (2020) Effect of the plastic pollutant bisphenol A on the biology of aquatic organisms: a meta-analysis. *Glob Change Biol* 26(7):3821–3833
34. Huang GY, Liu YS, Liang YQ, Shi WJ, Hu LX, Tian F, Chen J, Ying GG (2016) Multi-biomarker responses as indication of contaminant effects in *Gambusia affinis* from impacted rivers by municipal effluents. *Sci Total Environ* 563:273–281
35. Afzal G, Ahmad HI, Hussain R, Saeed S, Jamal A, Kiran S, Hussain T, Saeed S, Nisa M (2022) Bisphenol A induces histopathological, hematobiochemical alterations oxidative stress and genotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Oxid Med Cell Longev*. <https://doi.org/10.1155/2022/5450421>
36. Kankaya E, Kaptaner B, Dogan A, Çelik İ (2015) Toxicity of bisphenol a during the early life stages of *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811). *Fresenius Environ Bull* 24:977–985
37. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullas M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64(2):178–189
38. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Med Cell Longev* 2014:360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
39. Qiu W, Chen J, Li Y, Chen Z, Jiang L, Yang M, Wu M (2016) Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 130:93–102

40. Seoane M, Cid Á, Herrero C, Esperanza M (2021) Comparative acute toxicity of benzophenone derivatives and bisphenol analogues in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology* 30(1):142–153
41. Zhang J, Shen H, Wang X et al (2004) Effects of chronic exposure of 2, 4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 55(2):167–174
42. Aykut H, Kaptaner B (2021) In vitro effects of bisphenol F on antioxidant system indicators in the isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Biol Rep* 48(3):2591–2599
43. Ali I, Liu B, Farooq MA, Islam F, Azizullah A, Yu SuW, C, Gan, Y, (2016) Toxicological effects of bisphenol A on growth and antioxidant defense system in *Oryza sativa* as revealed by ultrastructure analysis. *Ecotoxicol Environ Saf* 124:277–284
44. Hamed HS, Ali RM, Shaheen AA, Hussein NM (2021) Chitosan nanoparticles alleviated endocrine disruption, oxidative damage, and genotoxicity of Bisphenol-A-intoxicated female African catfish. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol* 248:109104
45. Kaya Ö, Kaptaner B (2016) Antioxidant defense system parameters in isolated fish hepatocytes exposed to bisphenol A- effect of vitamin C. *Acta Biologica Hungarica* 67(3):225–235
46. Uçkun M (2022) Assessing the toxic effects of bisphenol, A in consumed crayfish *Astacus leptodactylus* using multi biochemical markers. *Environ Sci Pollut Res* 29(17):25194–25208
47. Golombieski JI, Marchesan E, Camargo ER, Salbego J, Baumart JS, Loro VL, de Oliveira Machado SL, Zanella R, Baldisserotto B (2008) Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. *Scientia Agricola* 65:340–345
48. Liu H, Yi M, Shi X, Liang P, Gao X (2007) Substrate specificity of brain acetylcholinesterase and its sensitivity to carbamate insecticides in *Carassius auratus*. *Fish Physiol Biochem* 33(1):29–34
49. APHA-AWWA-WEF (1998) In: Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD (eds) Standard methods for the estimation of water and waste water, 20th edn. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC.
50. Buege JA, Aust SD (1984) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 105:302–310
51. Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione N, Gillette JR (1974) Bromobenzene-induced liver necrosis protective role of glutathione and evidence for 3, 4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* 11(3):151–169
52. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
53. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol Chem* 249(22):7130–7139
54. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem* 72:248–254
55. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
56. Hould R (1984) *Methode de Fontana : Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. Maloine, Paris

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.