



**HAL**  
open science

# Écotoxicité, cytotoxicité et potentiel androgène des résidus pharmaceutiques sur les deux modèles biologiques : *Hydra attenuata* et les cellules MDA-Kb2

Amira Benchouala

► **To cite this version:**

Amira Benchouala. Écotoxicité, cytotoxicité et potentiel androgène des résidus pharmaceutiques sur les deux modèles biologiques : *Hydra attenuata* et les cellules MDA-Kb2. Ecosystèmes. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0101 . tel-01558534

**HAL Id: tel-01558534**

**<https://theses.hal.science/tel-01558534>**

Submitted on 8 Jul 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITE DE LORRAINE-METZ  
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées  
Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) UMR 7360  
CNRS  
Ecole doctorale RP2E Sciences et Ingénieries  
« Ressources, Procédés, Produits, Environnement »

# THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
**Docteur de l'Université de Lorraine**  
Spécialités «Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes»

Le 07 Juillet 2016

Par

**Amira BENCHOUALA**

**Ecotoxicité, cytotoxicité et potentiel androgène des résidus  
pharmaceutiques sur les deux modèles biologiques :  
*Hydra attenuata* et les cellules MDA-Kb2.**

Devant le jury composé de :

Pr. COSSU-LEGUILLE, C.  
Dr. POUPIN, P.  
Dr. BENNASROUNE, A.  
Pr. BETOULLE, S.

Université de Lorraine-Metz  
Université de Lorraine-Metz  
Université de Reims  
Université de Reims

Directrice de thèse  
Co-Directeur de thèse  
Rapporteur  
Rapporteur

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Pascale Bauda, ancienne directrice du laboratoire LIEC (ex LIEBE) de m'avoir accueilli au sein de son établissement de recherche. Par la même, je remercie également Fabien Thomas qui a depuis, repris le flambeau en tant que directeur de cette unité de recherche.

Toute ma reconnaissance, ma gratitude, et mes remerciements les plus sincères s'adressent à Carole Cossu-Leguille, directrice de thèse et Pascal Poupin, co-directeur de thèse. Merci de m'avoir accordé toute votre confiance durant ces années.

Mme Cossu, merci pour votre disponibilité, vos conseils, votre soutien, votre aide durant ma thèse. Merci de m'avoir permis de faire mes premiers pas dans la recherche en m'acceptant dans le laboratoire autant que thésarde, en m'ouvrant toute les portes commençant par votre aide pour tous mes documents administratifs et de m'avoir former.

Je remercie les membres du jury Mr Amar BENNASROUNE et Mr Stéphane BETOULLE pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

Un grand merci à mes deux collaborateurs Clément BOJIC et Danièle PAULY de m'avoir aidé et soutenu au cours de ma thèse et pour tous les services rendus. Nelly JAQUET, je te remercie énormément pour ton aide et ta disponibilité, merci de m'avoir initié aux tests de génotoxicités et de culture cellulaire. Je voudrais remercier Bénédicte SOHM de m'avoir introduit aux techniques de biologie moléculaire.

Merci à Paul VASSEUR, Davide VIGNATTI et Elisabeth GROSS, qui m'ont soutenus et encouragé dans les moments de détresse.

Merci à Oualida RACHED-MOSBAH et Alima BENTELLIS pour leurs précieuses aides et pour m'avoir encouragé et aidé à accéder aux travaux de recherche.

Merci à tous mes enseignants tout au long de mes études et spécialement Mr et Mme BEGHYANI ainsi qu'à leur fille Asma.

Je remercie les responsables du projet ANR pharm@ecotox pour leurs participations financières.

Je remercie le ministère de l'enseignement supérieur d'Algérie de m'avoir octroyé ma bourse d'étude.

Un grand merci à la famille ANDREY et HIADRI qui m'ont hébergé et soutenu durant ma dernière année et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à mes parents qui m'ont toujours donné la possibilité de continuer au-delà de mes envies.

Je terminerai par te remercier toi, Fouad, mon cher époux, pour la confiance que tu m'accordes, pour ton soutien de tous les jours. Merci de partager mes joies et d'avoir supporté mes changements d'humeur,... Merci de m'avoir aimé, réconforté mes angoisses et donné la force pendant ma thèse. Merci d'être là... Toujours présent pour moi...

---

<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	05
<b>LISTE DES FIGURES</b>	06
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	08
<b>LISTE DES DEFINITIONS</b>	09
<b>INTRODUCTION</b>	10
<b>I. PRODUITS PHARMACEUTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT</b>	13
I.1. Historique des produits pharmaceutiques dans l'environnement	13
I.2. Origine des produits pharmaceutiques dans l'environnement	13
I.3. Produits pharmaceutiques prioritaires	14
<b>II. GRANDES CLASSES DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES TROUVÉES DANS LE MILIEU AQUATIQUE</b>	16
II.1. Les antidépresseurs	16
II.1.1. Utilisation des antidépresseurs	16
II.1.2. Mécanisme d'action des antidépresseurs	17
II.1.3. Concentration des antidépresseurs dans l'environnement	17
II.1.4. Caractéristiques physico-chimiques	18
II.1.5. Bioaccumulation des antidépresseurs sérotoninergiques	19
II.2. Les antifongiques	20
II.2.1. Historique des antifongiques	21
II.2.2. Utilisation des antifongiques	21
II.2.3. Mécanismes d'action des antifongiques	22
• Les polyènes	22
• Les azolés	22
• Les échinocandines	22
• Les flucytosines	23
• Les Allylamines : Terbinafine	24
II.2.4. Caractéristiques physico-chimiques de quelques molécules d'antifongiques azolés	24
II.2.5. Concentration des antifongiques azolés dans l'environnement	25
II.3. Les antibiotiques	26
II.3.1. Utilisation des antibiotiques	26
II.3.2. Mode d'action des macrolides	27
II.3.3. Caractéristiques physico-chimiques	27
II.3.4. Concentration des antibiotiques dans l'environnement	27
II.3.5. Elimination des macrolides par les stations d'épurations	28
II.4. Les bêta-bloquants	28
II.4.1. Utilisation des bêta-bloquants	28
II.4.2. Mécanisme d'action des bêta-bloquants	28
II.4.3. Caractéristiques physico-chimiques	28
II.4.4. Elimination des bêta-bloquants par les stations d'épurations	29
II.5. Les antihistaminiques	30
II.5.1. Utilisation des antihistaminiques	31
II.5.2. Mécanisme d'action des antihistaminiques	31
II.5.3. Concentration de la cétirizine dans l'environnement	31
II.6. Les antiépileptiques	32

---

II.6.1. Utilisation des antiépileptiques	32
II.6.2. Mécanisme d'action des antiépileptiques	32
II.6.3. Caractéristiques physico-chimiques de la gabapentine	32
II.6.4. Concentration des antiépileptiques dans l'environnement	32
II. 6.5. Dégradation, demi-vie et élimination de quelques molécules d'antiépileptiques	33
<b>III. TOXICITE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES TROUVÉS DANS L'ENVIRONNEMENT</b>	
III.1. Toxicité des antidépresseurs sérotoninergiques sur les organismes aquatiques	33
III.1.1 Toxicité sur les algues	34
III.1.2. Toxicité sur les invertébrés	34
III.1.3. Toxicité sur les poissons	35
III.2. Toxicité des antifongiques sur les organismes aquatiques	36
III.3. Toxicité des antibiotiques sur les organismes aquatiques	37
III.4. Toxicité de quelques bêta-bloquants sur les organismes aquatiques	38
<b>IV. ASPECTS GENERAUX DE LA BIOLOGIE DE L'HYDRE</b>	39
IV.1. Morphologie	40
IV.2. Histologie	41
IV.3. Alimentation	42
IV.4. Locomotion et mouvement	42
IV.5. Respiration	42
IV.6. Reproduction	43
• Reproduction sexuée	43
• Reproduction asexuée	43
IV.6. Régénération	45
IV.6.1. Aspect génétique de la régénération	46
IV.7 Génétique de l'hydre	47
IV.7.1. Taille du génome et nombre du chromosome	47
IV.8. Neurologie	48
IV.8.1. La neurogenèse chez les hydres	48
IV.8.2. Neurotransmetteurs et neuromodulateurs chez l'hydre	49
IV.9. Immunologie	50
IV.10. Intérêt et utilisation de l'hydre en écotoxicologie	50
IV.11. Effets toxiques de quelques produits pharmaceutiques testés sur l'hydre	51
<b>V. MODELE D'ETUDE IN VITRO: LES CELLULES MDA-KB2</b>	53
V.1. Principe du test MDA-Kb2	53
V.2. Intérêt et utilisation de la lignée cellulaire MDA-Kb2	54
V.3. Effet anti-androgène des antifongiques azolés sur les cellules MDA-Kb2	54

---

<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	55
<b>PARTIE I : ETUDE IN VIVO</b>	55
<b>I. PROTOCOLE D'ELEVAGE DES HYDRES</b>	55
I.1. Conditions de culture des hydres utilisées au laboratoire LIEC	55
I.2. Protocole d'alimentation et de nettoyage des hydres	55
<b>II. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX DES TESTS HYDRE SUR ADULTES ET EMBRYONS</b>	57
II.1. Organisme d'essai	57
II.2. Produits pharmaceutiques étudiés	57
II.3. Toxicité aiguë	58
II.3.1. Effet sur la survie d'hydres adultes	58
II.3.2. Effets sur la survie des embryons	59
II.3.3. Ratio A/D	60
II.4. Toxicité chronique	60
II.4.1. Toxicité chronique des substances testées seules	60
a) Effets sur la morphologie, le nombre d'hydrantes et la capacité de nutrition	60
b) Effets sur la régénération des embryons, le nombre d'hydrantes et la capacité de nutrition	61
II.4.2. Toxicité chronique des substances testées en mélange	61
II.4.3. Toxicité chronique des antidépresseurs sur plusieurs générations d'hydres	62
• Effet de la sertraline et du mélange d'antidépresseurs sur les hydres adultes F0	63
• Effet des antidépresseurs sur les trois générations d'hydre	63
➤ Effet de la sertraline sur deux générations d'hydres F1 et F2	63
➤ Effet du mélange d'antidépresseurs sur les deux générations d'hydres F1 et F2	63
II.4. Analyse statistiques	63
<b>PARTIE II : ETUDE IN VITRO</b>	65
<b>I. CULTURE DE CELLULES MDA-kb2</b>	65
<b>II. PRODUITS PHARMACEUTIQUES ETUDIÉS</b>	65
<b>III. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX DES TESTS MDA-Kb2 et MTT</b>	65
III.1. Essai anti-androgénique MDA-kb2	65
III.2. Essai de cytotoxicité MMT	67
<b>IV. ANALYSES STATISTIQUES</b>	67

<b>RESULTATS</b>	69
<b>1<sup>ère</sup> PARTIE. TOXICITE DE SUBSTANCES MEDICAMENTEUSES SUR LE MODELE HYDRE</b>	69
I. Essais de toxicité aiguë	69
I.1. Toxicité sur les hydres adultes	70
I.2. Toxicité sur les embryons	70
I.3. Ratio A/D	70
II. Essai de toxicité chronique des produits pharmaceutiques testés individuellement	71
II.1. Les antidépresseurs testés individuellement	71
a. Toxicité sur les hydres adultes	71
b. Toxicité sur les embryons	72
II.2. Le mélange d'antidépresseurs	74
II.3. Les antifongiques testés individuellement	75
a. Toxicité sur les hydres adultes	75
b. Toxicité sur les embryons	77
II.4 Mélange d'antifongiques	77
III. Essai de toxicité chronique pour autres résidus pharmaceutiques trouvés dans l'environnement	79
IV. Malformations	80
IV.1. Pour les antidépresseurs	80
IV.2. Pour les antifongiques	81
VI. Effet des produits pharmaceutiques sur plusieurs générations d'hydres	82
VI.1. Effet de la sertraline	82
VI.2. Effet du mélange d'antidépresseurs	84
<b>2<sup>ème</sup> PARTIE. POTENTIEL ANDROGENIQUE ET CYTOTOXICITE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES</b>	85
I. Effets androgéniques des composés testés	85
I.1. Réponse du modèle MDA-Kb2 à la testostéron.	85
I.2. Réponse du modèle MDA-Kb2 à un antagoniste connu : le flutamide	86
II. Effet androgénique des produits pharmaceutiques testés utilisant le modèle MDA-Kb2	86
II.1. Effets androgéniques des antidépresseurs testés	86
II.2. Effets androgéniques des antifongiques testés	89
II.3. Effets androgéniques des autres classes de médicament	91
III. Cytotoxicité des composés testés	92
III.1. Cytotoxicité des témoins positifs « testostérone et flutamide »	92
III.2. Cytotoxicité des antidépresseurs	93
<b>DISCUSSION</b>	95
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	110
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	113

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Concentrations en antidépresseurs sérotoninergiques dans l'environnement aquatique de différents pays	16
<b>Tableau 2.</b> Caractéristiques physico-chimiques des substances pharmaceutiques étudiées	18
<b>Tableau 3.</b> Mesures de composés pharmaceutiques dans les différents organes des poissons <i>Lepomus macrochirus</i> , <i>Ictalurus punctatus</i> et <i>Pomoxis nigromaculatus</i>	19
<b>Tableau 4.</b> Classification des antifongiques selon leurs modes d'actions	20
<b>Tableau 5.</b> Caractéristiques physico-chimiques de quelques antifongiques azolés	24
<b>Tableau 6.</b> Concentrations des antifongiques azolés dans l'environnement	24
<b>Tableau 7.</b> Concentrations des antibiotiques dans les milieux aquatiques	25
<b>Tableau 8.</b> Caractéristiques physico-chimiques de certaines molécules de bêta-bloquants	29
<b>Tableau 9.</b> Toxicité aiguë des molécules d'antidépresseurs sur quelques organismes aquatiques	33
<b>Tableau 10 :</b> Valeurs des concentrations d'antidépresseurs (LOEC, NOEC) induisant des effets toxiques chroniques chez quelques organismes aquatiques	35
<b>Tableau 11 :</b> Données de toxicité aiguë et chronique de quelques antibiotiques sur les milieux aquatiques	36
<b>Tableau 12 :</b> Toxicité de quelques molécules de bêta-bloquants sur les organismes aquatiques	38
<b>Tableau 13.</b> Présentation de quelques valeurs de CL50 sur des organismes aquatiques	51
<b>Tableau 14.</b> Caractéristiques générales des substances qui composent le milieu hydre	55
<b>Tableau 15.</b> Concentrations des substances pharmaceutiques utilisées dans des tests aigus sur les hydres adultes et embryons	58
<b>Tableau 16.</b> Classification de la toxicité des composés basée sur l'analyse de leur impact sur la morphologie de l'hydre	58
<b>Tableau 17.</b> Classification de la toxicité des composés sur la base de la régénération des embryons d'hydre	59
<b>Tableau 18.</b> Concentrations des substances pharmaceutiques utilisées dans les essais de toxicité chronique de l'hydre	60
<b>Tableau 19.</b> Les concentrations maximales du mélange d'antidépresseurs testées sur des adultes (A) et les embryons (D) et les différentes molécules qui le composent	61
<b>Tableau 20.</b> Les concentrations maximales du mélange d'antifongiques testées sur des adultes (A) et les embryons (D) et les différentes molécules qui le composent	62
<b>Tableau 21.</b> Concentrations des substances pharmaceutiques utilisées dans l'étude <i>in vitro</i> sur les cellules MDA Kb2	65
<b>Tableau 22.</b> Valeurs de CE <sub>50</sub> des antidépresseurs et antifongiques testés sur la survie et le développement des hydres (A: adultes ; D: embryons)	69
<b>Tableau 23.</b> Effet chronique de la sertraline sur la morphologie et la reproduction des hydres au cours des trois générations successives	83
<b>Tableau 24.</b> Valeurs des différentes LOECs basées sur le score, la reproduction et la nutrition des hydres exposées à la sertraline et au mélange d'antidépresseurs au cours des trois générations	84

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Sources et devenir de produits pharmaceutiques dans l'environnement	13
<b>Figure 2.</b> Les différents constituants de la paroi fongique	20
<b>Figure 3.</b> Cibles des différents antifongiques	20
<b>Figure 4 :</b> Mécanisme d'action de l'Amphotéricine B	21
<b>Figure 5.</b> Mécanisme d'action des azolés	21
<b>Figure 6.</b> Cascade métabolique de la synthèse de l'ergostérol à partir de l'acétylCoA, et lieu d'action des allylamines, des azolés et des morpholines	23
<b>Figure 7.</b> Position et diversification du phylum des cnidaires	40
<b>Figure 8.</b> Morphologie d'une hydre d'eau douce	41
<b>Figure 9.</b> Coupe longitudinale d'une paroi d'hydre d'eau douce	41
<b>Figure 10.</b> Locomotion de l'hydre d'eau douce	41
<b>Figure 11.</b> Cycle de vie d'hydre d'eau douce	42
<b>Figure 12.</b> Schéma de développement des bourgeons d'hydre	42
<b>Figure 13.</b> Différents types de régénération chez <i>Hydra attenuata</i>	44
<b>Figure 14.</b> Vues schématiques de la neurogenèse chez les hydres	48
<b>Figure 15.</b> Principe des tests cellulaires <i>in vitro</i> basés sur l'interaction ligand/récepteur au sein d'une cellule	53
<b>Figure 16.</b> Maintien d'élevage des hydres dans l'enceinte thermostatée	55
<b>Figure 17.</b> Dispositif utilisé pour faire éclore les artémies	56
<b>Figure 18.</b> Schéma de la réalisation d'un test aigu	57
<b>Figure 19.</b> Morphologie successives d'une hydre adulte placée dans un milieu toxique	58
<b>Figure 20.</b> Vue de quelques hydres de taille similaires sélectionnées pour effectuer des sections gastriques	59
<b>Figure 21.</b> Schéma démonstratif de test aigu conduit sur les embryons	59
<b>Figure 22.</b> Développement d'un embryon de la cicatrisation jusqu'à la régénération d'une hydre adulte	59
<b>Figure 23.</b> Toxicité chronique de la sertraline sur plusieurs générations d'hydres	62
<b>Figure 24.</b> Schéma démonstratif de tests anti-androgénique conduit sur les cellules MDA-Kb2	66
<b>Figure 25.</b> Principe du test MTT	65
<b>Figure 26.</b> Essai de cytotoxicité MTT	65
<b>Figure 27.</b> Effets des antidépresseurs sur différents paramètres biologiques testés sur des adultes	72
<b>Figure 28.</b> Effets des antidépresseurs sur différents paramètres biologiques testés sur des embryons	73
<b>Figure 29.</b> Effets du mélange d'antidépresseurs sur les différents paramètres biologiques testés sur l'hydre adulte (A) et l'embryons (D)	74
<b>Figure 30.</b> Effets des antifongiques sur différents paramètres biologiques testés sur des hydres adultes	76
<b>Figure 31.</b> Effets des antifongiques sur différents paramètres biologiques testés sur des embryons	77
<b>Figure 32.</b> Effets du mélange d'antifongique sur les différents paramètres biologiques testés sur l'hydre adulte (A) et l'embryons (D)	78

<b>Figure 33.</b> Effets du mélange de plusieurs classes médicamenteuses sur les différents paramètres biologiques testés sur l'hydre adulte (A) et l'embryons (D)	80
<b>Figure 34.</b> Anomalies observées chez les embryons exposés aux antidépresseurs	80
<b>Figure 35.</b> Malformations observées chez les adultes exposés à de fortes concentrations d'éconazole et de miconazole	82
<b>Figure 36.</b> Effet du mélange d'antidépresseurs sur les différents paramètres biologiques testés sur la deuxième génération d'hydre F1	84
<b>Figure 37.</b> Essai agoniste et antagoniste du récepteur aux androgènes.	85
<b>Figure 38.</b> Evaluation du potentiel androgénique des différentes molécules d'antidépresseurs testées	88
<b>Figure 39.</b> Evaluation du potentiel androgénique du mélange d'antidépresseurs	89
<b>Figure 40.</b> Evaluation du potentiel androgénique des différentes molécules d'antifongiques testées	91
<b>Figure 41.</b> Evaluation du potentiel androgénique du mélange d'antifongique	91
<b>Figure 42.</b> Evaluation du potentiel androgénique des différents produits pharmaceutiques testés seuls et en mélange	92
<b>Figure 43.</b> Cytotoxicité des différentes molécules testées d'antidépresseurs	93
<b>Figure 43.</b> Cytotoxicité du mélange d'antidépresseurs	94

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ACE** : Acébutolol  
**AD** : Antidépresseurs  
**AF** : Antifongiques  
**CET** : Cétirizine  
**CE<sub>x</sub>** : Concentration effective pour x% (généralement 50%) des organismes tests considérés  
**CLA** : Clarythromicine.  
**CL<sub>x</sub>** : Concentration létale pour x% des organismes tests considérés  
**CYP 450** : Cytochrome P450  
**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**E2** : 17 β-œstradiol  
**ECM** : Matrice extra cellulaire  
**ECZ** : Econazole nitrate  
**EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique  
**EE2** : Ethinylestradiol  
**FDA** : Food and Drug Administration.  
**GAB** : Gabapentine.  
**GABA** : Acide γ-aminobutyrique  
**NOEC** : No Observed Effect Concentration  
**ISRS** : Antidépresseur inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine.  
**IT** : Indice de toxicité  
**K<sub>ow</sub>** : Coefficient de partage octanol/eau, mesure l'hydrophobie d'une molécule.  
**LC50** : Concentration Létale pour 50 % des individus de l'espèce testée  
**LOEC** : Lowest Observed Effect Concentration, plus petite concentration pour laquelle un effet (généralement toxique) est observé.  
**MCZ** : Miconazole nitrate  
**NOEL** : No Observed Effect Level : plus petite concentration pour laquelle aucun effet (généralement un effet thérapeutique pour un médicament) n'est observé.  
**PE** : Perturbateurs endocriniens  
**PEC** : Concentration prédite dans l'environnement  
**PK<sub>a</sub>** : Constante de dissociation d'une molécule.  
**PP** : Produits pharmaceutiques  
**OCDE** : L'Organisation de coopération et de développement économique.  
**STEP** : Station de traitement et d'épuration des eaux usées.  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**TES** : N-Tris (hydroxyméthyle) méthyl 1-2 acide aminoéthanesulfonique  
**TS** : Testostérone  
**USEPA** : United States Environmental Protection Agency.  
**VEN** : Venlafaxine.

## LISTE DES DEFINITIONS

**Bioaccumulation** : processus par lequel un composé chimique s'accumule dans un organisme vivant par diffusion passive, adsorption, transport actif, ou via la chaîne alimentaire.

**Biodégradation** : capacité d'une molécule à être dégradée dans l'environnement sous l'influence de processus biologiques.

**Bioessai** : évaluation de la toxicité d'une substance par l'observation en laboratoire de ses effets sur un organisme vivant.

La **bronchectasie** ou **bronchiectasie** ou **dilatation des bronches (DDB)** est une affection chronique, le plus souvent acquise à la suite d'une maladie des bronches, du poumon ou de la plèvre. Elle est caractérisée par une dilatation des bronches de petit et moyen calibre et s'accompagne souvent d'une expectoration mucopurulente abondante, qui traduit l'infection surajoutée. Elles peuvent être localisées ou diffuses.

**Diploblastique** : les cellules sont disposées en deux feuillets superposés.

**Effet (évaluation de)** : estimation de la relation entre une dose ou un niveau d'exposition à une substance et le type, l'incidence et la sévérité de l'effet sur un organisme ou un ensemble d'organismes.

**Médicament** : d'après le code de la santé publique (1967), un médicament est défini comme « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques ».

**Milieu récepteur** : lieu où sont déversées les eaux usées, épurées ou non épurées. Peut-être une rivière, un lac, un étang, une nappe phréatique, la mer... Dans ce document, on entend principalement par milieu récepteur des eaux de surfaces (rivières).

**Persistance** : résistance aux conditions de dégradation biotique et abiotique dans l'environnement.

La persistance d'une substance reflète non seulement son potentiel à atteindre les organismes sur une longue durée mais également sa capacité à atteindre le milieu aquatique et à être transportée sur de longues distances.

**Risque** : probabilité d'atteinte de l'intégrité d'un organisme, ou d'un groupe d'organismes, résultant de l'exposition à une substance ou à un groupe de substances chimiques données. Le risque environnemental lié à une substance chimique est généralement déterminé par le rapport d'une concentration d'exposition à une concentration sans effet.

# INTRODUCTION

## **INTRODUCTION**

L'existence des produits pharmaceutiques et leurs métabolites actifs dans l'environnement a été considérée comme l'une des préoccupations en science de l'environnement (Halling-Sorensen et al., 1998; Daughton et Ternes, 1999; Heberer, 2002; Carlsson et al., 2006). Ils sont présents en mélange de plusieurs classes de médicament (Gros et al., 2007), à des concentrations faibles de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  au  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Fent et al., 2006) et avec d'autres catégories de polluants tels que les insecticides, herbicides, désinfectants hydrocarbures aromatiques polycycliques, métaux lourds, nanoparticules,... (Kolpin et al., 2002). Ils sont continuellement introduits dans l'environnement aquatique du fait de leur utilisation croissante en médecine humaine et/ou vétérinaires dans de nombreux pays au cours de la dernière décennie et ont été qualifiés de polluants émergents et persistants.

Il est impossible d'évaluer les risques environnementaux de tous les produits pharmaceutiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire en France. Au vu de leur nombre élevé il est nécessaire de se concentrer sur certaines molécules. Nous avons étudié dans le cadre du programme du projet ANR CES « Pharm@Ecotox », quatorze substances médicamenteuses choisies, qui appartiennent à de différentes classes thérapeutiques : la clomipramine, la fluoxétine, la fluvoxamine, la paroxétine, la sertraline et la venlafaxine (antidépresseurs), l'amphotéricine B, l'éconazole, le kétoconazole et le miconazole (antifongiques), la clarithromycine (antibiotique), l'acébutolol ( $\beta$ -bloquants), la gabapentine (antiépileptiques) et la cétirizine (antihistaminiques). Ces molécules sont couramment prescrites pour le traitement de l'homme. Elles sont présentes dans des différents milieux aquatiques mêmes dans les eaux continentaux et marins et certaines entre elles s'accumulent dans les tissus d'organismes aquatiques (Brooks et al., 2005). Ce travail porte uniquement sur le risque environnemental pour les écosystèmes aquatiques et ne s'intéresse donc pas au risque sanitaire lié à la présence de traces de médicaments dans les eaux potables.

Des effets délétères induits par la plupart de ces produits pharmaceutiques, ont été observés sur plusieurs paramètres biologiques, entre autres le développement et la reproduction. Les antidépresseurs sérotoninergiques et notamment la fluoxétine et la sertraline, les antifongiques et notamment le kétoconazole ont un potentiel perturbateur endocrinien (Brooks et al., 2003a ; Zarn et al., 2003 ; Ankley et al., 2005). Ils sont connus pour avoir un effet œstrogène chez le poisson (Monteiro et al, 2000; Villeneuve et al, 2007 ; Hasselberg et al., 2008), ce qui les classe dans la catégorie des substances préoccupantes pour la santé humaine et la santé environnementale. Ils ont la capacité d'accumulation dans le

substrat et dans les tissus des organismes aquatiques (Peschka et al., 2007) et spécialement chez le poisson (Brooks et al., 2005).

Parmi ces molécules, la cécitizine, la gabapentine, la paroxétine et la sertraline sont suspectées d'être cancérogènes chez les souris et/ou les rats, mais elles ne sont ni mutagènes, ni génotoxiques *in vitro* et *in vivo*. D'autres molécules telles que l'acébutolol, l'amphotéricine B, la clarithromycin, l'éconazole, le kétoconazole, la fluoxétine, la fluvoxamine, et la venlafaxine (Snyder et Green, 2001 ; Brambilla et Martilli, 2009) n'ont pas un pouvoir mutagène.

Le but de ce travail est d'évaluer la toxicité aiguë et chronique de ces produits pharmaceutiques testés seuls et en mélange, sur deux modèles biologiques très répandus: le cnidaire d'eau douce *Hydra attenuata* et les cellules MDA-Kb2.

L'hydre est l'organisme modèle qui a été le support de notre travail pour l'étude *in vivo*. Cette espèce joue un rôle important dans la structuration de la composition planctonique des étangs et autres plans d'eau où elle est commune (Schwartz et al., 1983). Elle maintient la diversité du zooplancton. Elle a été largement utilisée dans les études de toxicité sur le développement en raison de sa capacité remarquable de régénération (Johnson et al., 1982) et elle a également été utilisée pour examiner le potentiel tératogène de plusieurs produits pharmaceutiques (Pascoe et al., 2003; Blaise et al., 2006; Quinn et al., 2009). *H. attenuata* est considérée comme un bio-indicateur de pollution. Elle réagit à un stress environnemental en contractant ses tentacules et son corps et en présentant des changements morphologiques qui ont été classés par Wilby (1988). Cette classification nous a permis de mesurer la survie des hydres, les modifications morphologiques, et le développement des tronçons gastriques lors des expériences. D'autres paramètres biologiques aussi ont été mesurés et suivis tels que la reproduction asexuée (nombre des hydrantes produites) et la capacité de nutrition.

Les cellules MDA-Kb2 ont été choisies comme modèle d'étude *in vitro* afin d'examiner le potentiel androgénique et la cytotoxicité des produits pharmaceutiques sélectionnés. Cette étude est menée en parallèle avec le test hydre, dans la même gamme de concentrations que celles utilisées pour l'étude de la toxicité chronique chez l'hydre.

Cette recherche comprend deux grandes parties :

1<sup>ère</sup> PARTIE. Toxicité de substances médicamenteuses sur le modèle hydre.

2<sup>ème</sup> PARTIE. Potentiel androgénique et cytotoxicité des produits pharmaceutiques.

Ce manuscrit comporte :

(i) une analyse bibliographique fractionnée en 7 grandes parties :

- Produits pharmaceutiques dans l'environnement.
- Grandes classes des produits pharmaceutiques trouvées dans le milieu aquatique.
- Toxicité des résidus pharmaceutiques trouvés dans l'environnement.
- Aspects généraux de la biologie de l'hydre.
- Modèle d'étude *in vitro*: cellules MDA-Kb2.

(ii) Les matériels et méthodes mis en œuvre pour cette recherche.

(iii) Les résultats regroupés dans deux parties consacrées pour l'une, à l'étude *in vivo* afin d'évaluer la toxicité des substances médicamenteuses seules et/ou en mélange sur une ou plusieurs générations d'hydres, la deuxième partie axée sur l'effet ou le potentiel androgénique et cytotoxique des mêmes substances médicamenteuses testées seules et en mélange sur l'hydre.

Enfin nous concluons en reprenant les points majeurs de ce travail. Un certain nombre de perspectives qu'ouvre ce travail seront présentées.

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

## **I. PRODUITS PHARMACEUTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT.**

Les produits pharmaceutiques sont des composés biologiquement actifs, qui se retrouvent dans l'environnement en mélanges composés de différentes classes chimiques avec de multiples modes d'action pharmacologique (Brain et al., 2004).

La France se place, en termes de chiffre d'affaires généré, comme le 4<sup>ème</sup> consommateur mondial, après les Etats-Unis, l'Allemagne et le Japon. Les statistiques relatives à l'utilisation de médicaments à usage vétérinaire montrent qu'elle serait, dans l'Union Européenne, le premier pays consommateur d'antibiotiques et d'hormones et le second pour les antiparasitaires (Académie Nationale de Pharmacie, 2008).

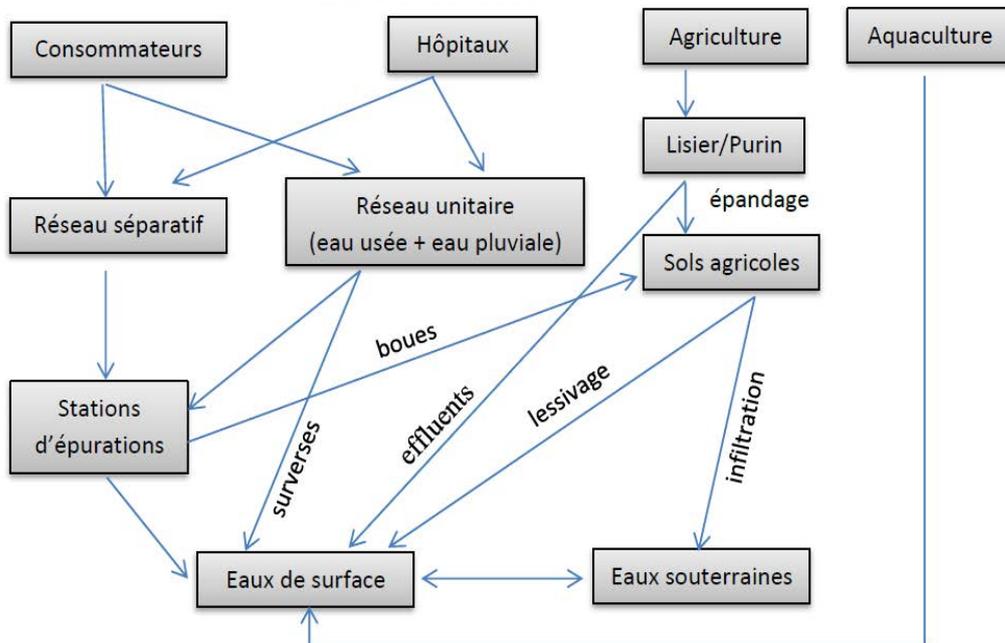
### **I.1. Historique des produits pharmaceutiques dans l'environnement.**

La présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement aquatique a été mise en évidence dans le milieu des années 1960 et 1970. Les premiers rapports publiés par Stumm-Zollinger et Fair (1965) et Hignite et Azarnoff (1977), ont démontré une élimination incomplète de certains produits pharmaceutiques par le traitement des eaux usées ainsi que leur introduction dans l'environnement via les stations d'épurations des eaux usées (STEP). Malgré cette découverte, cette problématique n'a attiré l'attention des chercheurs qu'après les années 1990 (Purdom et al., 1994; Desbrow et al., 1998; Routledge et al., 1998 ; Halling-Sorensen et al., 1998). Les progrès des méthodes d'analyse, particulièrement le couplage de la chromatographie en phase gazeuse ou de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse, permettent d'évaluer des quantités de plus en plus faibles de toutes sortes de molécules, de mieux les séparer et de mieux les identifier. Ainsi, la présence de médicaments et de leurs métabolites a pu être mise en évidence à des concentrations de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$ . Depuis, plusieurs études publiées ont signalé la présence de ces composés dans l'environnement (Ternes, 1998; Ternes et al., 2001; Kolpin et al., 2002; Al-Rifai et al., 2007; Conley et al., 2008), à des différentes concentrations allant jusqu'au  $\mu\text{g L}^{-1}$ , en raison de leur utilisation croissante et de leur diversité (Bound et Voulvoulis, 2004).

### **I.2. Origine des produits pharmaceutiques dans l'environnement.**

Les produits pharmaceutiques, identifiés en tant que polluants dans les eaux usées urbaines et les boues résiduaires, sont introduit dans l'environnement par différentes voies (figure 1):

Les effluents des stations d'épuration sont une source importante et continue d'entrée de médicaments dans le milieu aquatique (Brun et al., 2006 ; Hernando et al., 2006). Ces



**Figure 1.** Sources et devenir de produits pharmaceutiques dans l'environnement

molécules sont présentes en mélange complexe (Kolpin et al., 2002). La lixiviation de décharges et le ruissellement agricole entraînent leur remobilisation (Pedersen et al., 2003; Pedersen et al., 2005) vers les milieux aquatiques, notamment les eaux de surface, mais aussi, indirectement dans les eaux souterraines (Ternes et al., 2002).

Les boues produites par les STEP, les fumiers, les lisiers et les purines issus de l'élevage peuvent être stockés ou épandus sur les terres agricoles (Hektoen et al., 1995; Pfeifer et al., 2002 ; Tolls, 2001), il peut se produire un transfert des résidus médicamenteux dans les sols et être assimilés par les plantes (Carter et al., 2014) ou par les animaux. Ces résidus pourraient entrer dans la chaîne alimentaire et dans l'écosystème via les eaux de ruissellement. Les produits pharmaceutiques vétérinaires utilisés dans l'aquaculture pénètrent directement dans les eaux de surface.

Les hôpitaux sont également reconnus pour être une source de relargage de ces polluants dans les milieux aquatiques (Jolibois et al., 2003; Jilibois et Guerbet, 2005). En effet, certains traitement n'étant prescrits qu'à l'hôpital, ces effluents peuvent contenir des molécules spécifiques : antibiotiques, anti-infectieux, produits de contraste iodés et anticancéreux, etc. Les effluents hospitaliers n'étant pas traités sur place (exceptées les substances radioactives), les substances pharmaceutiques se retrouvent dans les eaux usées de l'agglomération et gagnent les STEP urbaines, puis finalement les eaux de surface.

Enfin, les rejets des usines de fabrication ou de conditionnement des médicaments sont également une voie possible de contamination des eaux et peuvent conduire à des pics de contamination localisés (Larsson et al. 2007) en cas de pollution accidentelle ou de mauvais traitement des effluents, notamment dans les pays en voie de développement (Besse, 2010) et affecter des organismes exposés (Carlsson et al. 2009 ; Gunnarsson et al. 2009).

### **I.3. Produits pharmaceutiques prioritaires.**

Il est impossible d'évaluer les risques environnementaux de tous les produits pharmaceutiques utilisés en médecine dans le monde, au vu de leur nombre élevé. Pour cette raison, il faut sélectionner certaines molécules à rechercher. Besse et Garric (2008) ont décrit une méthodologie pour définir cette sélection et ils l'ont appliqué sur 120 molécules mères et 30 métabolites les plus utilisés en France. Au final, ils ont défini une liste prioritaire de médicament contenant 40 molécules mères et 14 métabolites.

Parmi les molécules retenues, sept composés sélectionnés sur la base de leur concentration prédite dans l'environnement  $PEC > 100 \text{ ng L}^{-1}$  (allopurinol, aténolol, metformine, oxazépam,

métronidazole, tramadol et ranitidine) tandis que les 33 autres ont été sélectionnées selon la méthodologie basée sur trois étapes :

1- une classification en classes d'exposition de 120 molécules et 30 métabolites basée sur l'utilisation des PEC avec et sans fraction excrétée ;

2- une classification cas par cas basée sur l'utilisation de toutes les données biologiques disponibles, données écotoxicologiques, pharmacologiques, physico-chimiques, et sur les mécanismes d'action ;

3- une priorisation parmi les molécules ayant des structures chimiques et des mécanismes d'action semblables.

Parmi ces derniers, figurent :

- 12 antibiotiques : amoxicilline, pipéracilline (pénicillines), doxycycline (tétracyclines), ceftriaxone (céphalosporines), ofloxacin et ciprofloxacine (fluoroquinolones), clarithromycine (macrolides), fosfomycine (phosphonide), pristina mycine, sulfaméthoxazole, triméthoprime (sulfonamides), vancomycine (glycopeptide).
- 4 AINS : diclofénac, ibuprofène, ketoprofène, naproxène
- 2 anti-ischémiques : buflomédil, naftidrofuryl
- 2 régulateurs lipidiques : bézafibrate, pravastatine
- 2 antidépresseurs : fluoxétine, sertraline
- 1 antipyrétique : paracétamol
- 1 antifongique : amphotéricine B
- 1 corticoïde : prednisolone
- 1 anti-arythmique : amiodarone
- 1 bêtabloquant : propanolol
- 1 antagoniste angiotensine 2 : losartan
- 1 anti-convulsivant : carbamazépine
- 1 anti-psychotique : cyamémazine
- 1 veinotonique : diosmine
- 1 diurétique : furosemide
- 1 anti-convulsivant : acide valproïque

Cette approche est intéressante pour sélectionner les molécules à étudier en priorité mais elle ne porte que sur la présence de ces molécules dans les eaux sans tenir compte de la contamination des autres milieux comme les sols.

Parmi ces molécules choisies nous citons quatre molécules d'intérêt sur lesquelles nous allons travailler ; l'amphotéricine B, la clarithromycine, la fluoxétine et la sertraline.

## **II. GRANDES CLASSES DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES TROUVÉES DANS LE MILIEU AQUATIQUE.**

Cette partie sera spécifiquement axée sur les médicaments psychiatriques (comprenant les antidépresseurs sérotoninergiques et noradrénergiques), les antifongiques mais également les antibiotiques, les antiépileptiques, les  $\beta$ -bloquants et les antihistaminiques.

### **II.1. Les antidépresseurs.**

De nos jours, en Europe, il existe plus de 3000 substances actives sur le marché (Redshaw et al., 2008). La France est classée parmi les pays grands consommateurs des médicaments psychotropes (Pélissolo et al., 1996), et notamment d'antidépresseurs. Il existe environ 5,5 millions de Français souffrant d'épisodes dépressifs majeurs, soit 8 % de la population française (Davide, 2012). La consommation d'antidépresseurs a fortement augmenté dans de nombreux pays tels que l'Islande, suivie par Australie, le Danemark et la Suède, au cours de la dernière décennie (OCDE, 2011).

#### II.1.1. Utilisation des antidépresseurs.

Les antidépresseurs sont des produits pharmaceutiques largement prescrits (Jjemba, 2002; Kwon et Armbrust, 2008; Paterson et Metcalfe, 2008; Schultz et Furlong, 2008) pour traiter la dépression clinique, les troubles compulsifs obsessionnels, la panique, ainsi que d'autres cas dans lesquels l'inhibition sélective de recapture de la sérotonine (ISRSs) est souhaitable (Brooks et al., 2003a; Schultz et Furlong, 2008; Unceta et al., 2008), comme par exemple la phobie sociale et le trouble déficitaire de l'attention (Schultz et Furlong, 2008).

Les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine ont été largement commercialisés depuis le milieu des années 1980. Actuellement, il existe cinq ISRSs disponibles sur le marché: le citaloprame, la fluoxétine, la fluvoxamine, la paroxétine et la sertraline (Johnson et al, 2007) auxquels s'ajoutent les antidépresseurs tricycliques et tétracycliques tels que l'amitriptyline et la miansérine. Certains d'entre eux, et en particulier l'amitriptyline, sont également administrés aux animaux (Halling-Sorensen et al., 1998). L'utilisation d'antidépresseurs chez les animaux est recommandée pour traiter des pathologies telles que l'anxiété de séparation, certains troubles obsessionnels compulsifs et des problèmes de comportement, comme la peur (Mills, 2003).

**Tableau 1.** Concentrations en antidépresseurs sérotoninergiques dans l'environnement aquatiques de différents pays.

<b>Environnements aquatiques</b>	<b>Pays</b>	<b>Concentrations (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Références</b>
<b>Fluoxétine – N° CAS - 54910-89-3</b>			
Eau de surface	USA	12	Kolpin et al. (2002)
Eau souterraine	USA	56	Barnes et al. (2008)
Eau potable	USA	0,64	Benotti et al. (2009)
Effluent STP	Corée du Sud	1,7	Kim et al. (2007a)
Effluent (STEP)	Norvège	0,4–2,4	Vasskog et al. (2006)
Affluent (STEP)		<0,12–1,3	
Affluent (STEP)	Norvège	1,1 –18,7	Vasskog et al. (2008)
Effluent (STEP)		0,6–8,4	
Affluent (STEP)	Canada	3,1–3,5	Lajeunesse et al. (2008)
Effluent (STEP)		2,0–3,7	
Rivière de St. Lawrence		0,42–1,3	
Affluent (STEP)	Canada	50–99	Metcalfé et al. (2003)
Affluent (STEP)	Canada	18	MacLeod et al. (2007)
Effluent (STEP)		14	
Affluent (STEP)	Canada	20–91	Metcalfé et al. (2010)
River de Grand		4–141	
Affluent (STEP)	Portugal	<17–3645	Salgado et al. (2011)
Affluent (STEP)	Portugal	<5	Sousa et al. (2011)
Effluent (STEP)		<4	
Effluent d'hôpital	Espagne	4–100	Gomez et al. (2007)
Affluent (STEP)	Espagne	26	Gros et al. (2009)
Effluent (STEP)		16	
Rivière de Ebro		3	
Effluent (STEP)	USA	40–73	Batt et al. (2008)
<b>Fluvoxamine - N° CAS - 54739-18-3</b>			
Affluent (STEP)	Norvège	0,4–3,9	Vasskog et al. (2006)
Effluent (STEP)		<0,15–0,8	
Affluent (STEP)	Norvège	0,8–1,7	Vasskog et al. (2008)
Effluent (STEP)		<0,379–0,8	
Eau de mer		0,5–0,8	
Rivière de Jarama		13–16	Alonso et al. (2010)
Rivière de Manzanares		22	
Rivière de Guadarrama		8–44	
Rivière de Henares		11	
Rivière de Tajo		12	
Eau de surface	USA	12–20	Schultz et Furlong (2008)
Eau souterraine	USA	56	Barnes et al. (2008)
Eau de surface	USA	<0,5–4,6	Schultz et al. (2010)

### II.1.2. Mécanisme d'action des antidépresseurs.

Différentes grandes classes chimiques d'antidépresseurs ont des propriétés thérapeutiques afférentes aux perturbations psychiques dont le but pharmacologique est d'augmenter la concentration cérébrale en monoamines. On distingue trois mécanismes d'actions principaux (David et al., 2012).

- 1) Un mécanisme d'inhibition enzymatique de la dégradation des monoamines pour les Inhibiteurs de la Monoamine Oxydase de type A.
- 2) Un mécanisme de blocage du transporteur chargé de la recapture des monoamines pour les inhibiteurs de la recapture de l'imipramine, de la sérotonine et de la noradrénaline. Ces neurotransmetteurs interviennent dans de nombreux mécanismes hormonaux et neuronaux.
- 3) Un mécanisme de blocage direct des récepteurs des monoamines pour certaines molécules surtout noradrénergiques.

Ces modes d'actions peuvent non seulement affecter le système nerveux de certaines espèces aquatiques (bivalves, mollusques, poissons, ...) mais aussi détruire le signal neuroendocrinien en causant une perturbation dans le comportement de la reproduction (Foran et al., 2004; Van der Ven et al., 2006; Henry et Black, 2008; Péry et al., 2008; Gust et al., 2009; Sanchez-Arguello et al., 2009) tel que la ponte, la maturation des oocytes, la réactivation du sperme chez les bivalves, la rupture de la vésicule germinale et la parturition chez les mollusques (Hirai et al., 1988; Krantic et al., 1991 ; Ram et al., 1993 ; Fong et al., 1994 ; Gobet et al., 1994 ; Fong et Warner , 1995 ; Fong et al., 1996 ) et régulent la croissance de l'ovaire chez les crustacés (Fong et al., 1998; Fong, 2001). Liang et al. (2006) ont élucidé la voie neuroendocrinienne à travers laquelle la sérotonine module la réponse aux stressés physiologiques et environnementaux de *Caenorhabditis elegans*. Ce mécanisme sérotoninergique à un rôle régulateur du processus somatique des invertébrés.

### II.1.3. Concentration des antidépresseurs dans l'environnement.

Des études scientifiques ont démontré que l'élimination incomplète des antidépresseurs par les stations d'épuration, conduit à l'exposition environnementale continue à de faibles concentrations (Schultz et Furlong, 2008 ; Lajeunesse et al., 2008 ; Mompelat et al., 2009).

**Tableau 1.** Concentrations en antidépresseurs sérotoninergiques dans l'environnement aquatiques de différents pays (suite).

<b>Environnements aquatiques</b>	<b>Pays</b>	<b>Concentrations (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Références</b>
<b>Paroxétine – N° CAS- 61869-08-7</b>			
Affluent (STEP)	Norvège	0,6–12,3	Vasskog et al. (2008)
Effluent (STEP)		0,5–1,6	
Eau de surface	USA	2,1–3	Schultz et Furlong (2008)
Affluent (STEP)	Norvège	2,9 –12,9	Vasskog et al. (2008)
Effluent (STEP)		1,0–11,7	
Eau de mer		0,6–1,4	
Affluent (STEP)	Canada	4,6–53	Lajeunesse et al. (2008)
Effluent (STEP)		4,3–5,2	
Rivière St. Lawrence		1,3–3,0	
Affluent (STEP)	Portugal	<14–32,228	Salgado et al. (2011)
Affluent (STEP)	Portugal	45–105	Sousa et al. (2011)
Effluent (STEP)		60–240	
Effluent (STEP)	Espagne	1141	Bueno et al. (2007)
Effluent (STEP)	USA	13	Batt et al. (2008)
Eau de surface	USA	90	Wu et al. (2009)
<b>Sertraline – N° CAS- 79617-96-2</b>			
Affluent (STEP)	Norvège	1,8–2,5	Vasskog et al. (2006)
Effluent (STEP)		0,9–2,0	
Affluent (STEP)	Norvège	8,4 –19,8	Vasskog et al. (2008)
Effluent (STEP)		3,7 –14,6	
Eau de mer		<0,16	
Affluent (STEP)	Canada	6,0 –6,1	Lajeunesse et al. (2008)
Effluent (STEP)		5,1 –5,8	
Rivière St. Lawrence		0,84 –2,4	
Affluent (STEP)	Canada	14–34	Metcalfe et al. (2010)
Rivière de Grand		6–17	
WWTP effluent	USA	57–87	Batt et al. (2008)
Rivière de Llobregat	Espagne	11	Huerta-Fontela et al. (2011)
Eau de surface	USA	33–49	Schultz et Furlong(2008)
Eau de surface	USA	<0,5–37,5	Schultz et al. (2010)
<b>Venflaxine</b>			
Affluent (STEP)	Canada	195,7-213,0	Lajeunesse et al. (2008)
Effluent (STEP)		175,9–214,6	Lajeunesse et al. (2008)
Rivière St. Lawrence		12,9-45,9	Lajeunesse et al. (2008)
Rivière Rivière d'Avon	UK	0,40-0,65	Kasprzyk-Hordern et Baker (2012)
	UK	0,58	Bagnall et al. (2012)

Le Tableau 1 présente quelques-unes des données obtenues lors des principales études à travers le monde. La présence des antidépresseurs a été confirmée à de faibles concentrations allant du  $\text{ng L}^{-1}$  au quelques centaines de  $\text{ng L}^{-1}$  dans différents milieux aquatiques, tels que les affluents et les effluents des stations d'épuration des eaux usées (STEP), les eaux de surface, les eaux marines les eaux souterraines et de l'eau potable en Europe (Kreke et Dietrich, 2008; Bueno et al., 2007; Hordern et al., 2007 ; Himmelsbach et al., 2006 ; Alonso et al., 2010; Gros et al., 2009), en Amérique du Nord (Benotti et al., 2009) et au Canada (Metcalf et al., 2010).

Dans quelques pays de l'Europe, la concentration de différents ISRSs peut atteindre quelques  $\mu\text{g L}^{-1}$  dans certains affluent et effluent de STP, comme c'est le cas pour la fluoxétine et la paroxétine en Portugal et en Espagne (Salgado et al., 2011 ; Bueno et al., 2007, tableau 1). Cette concentration peut changer d'un endroit à l'autre dans le même pays, au Portugal par exemple (tableau 1), dans certains affluents de STEP la concentration de la fluoxétine peut être inférieure à  $5 \text{ ng L}^{-1}$  (Sousa et al., 2011) comme elle peut atteindre  $3,645 \mu\text{g L}^{-1}$  (Salgado et al., 2011). Cela est peut être dû à la quantité de la molécule d'antidépresseur déversée et de la taille de la population.

Le tableau 1 démontre aussi que la concentration des ISRSs dans les affluents de STEP est beaucoup plus élevée que celle des effluents. L'efficacité incomplète des traitements (Heberer, 2002) varie selon les composés, les saisons et les techniques et entraîne une contamination importante et variable des effluents, qui sont rejetés et ensuite dilués dans les eaux de surface. Une différence considérable entre la concentration de la fluoxétine dans l'eau de surface, l'eau souterraine et de l'eau potable peut dépendre aussi de degré de traitement des eaux usées ou de l'atténuation naturelle qui rassemble l'ensemble de plusieurs mécanismes conduisant sans intervention humaine, à une diminution de la toxicité, la mobilité, le volume, la masse et le flux ou la concentration de cette molécule dans les sols ou les eaux souterraines.

#### II.1.4. Caractéristiques physico-chimiques.

Les caractéristiques physico-chimiques des molécules sont présentées dans le tableau 2. Elles permettent de comprendre la stabilité, la persistance et le devenir des ISRSs dans l'environnement.

Le tableau indique que les ISRSs ont une solubilité dans l'eau relativement élevée et un faible coefficient de partage octanol-water  $K_{ow}$  qui varie entre 1,12 à 1,37. Ce qui signifie

**Tableau 2.** Caractéristiques physico-chimiques des substances pharmaceutiques étudiées.

ISRSs	CAS	Poids moléculaire	Formules chimiques	Solubilité dans l'eau <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>	Log K <sub>oc</sub> <sup>b</sup>	Photolyse t <sub>1/2</sub> <sup>c</sup> jrs
<b>Clomipramine</b>	303-49-1	314,85	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub>				
<b>Fluoxétine</b>	56296-78-7	345,79	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO · HCl	10,762	1,22	4,65	122
<b>Fluvoxamine</b>	61718-82-9	434,41	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> · C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	14,869	1,21	3,82	0,57
<b>Paroxétine</b>	110429-35-	374,83342,6	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FNO <sub>3</sub> · HCl. 5 H <sub>2</sub> O	6,213	1,37	4,47	0,67
<b>Sertraline</b>	179559-97-	9277,40	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NCl <sub>2</sub> · HCl	3,022	1,37	4,17	23
<b>Venlafaxine</b>	093413-69-5		C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub>				

<sup>a</sup> Mesurée sur la forme (HCl) de chaque ISRS.

<sup>b</sup> Moyenne calculée à partir des expériences avec cinq sols et sédiments différents.

<sup>c</sup> Moyenne calculée à partir d'expériences avec deux échantillons d'eau de lac différents (à l'exception de la fluvoxamine).

que ces composés sont peu persistants dans l'environnement aquatique. Il indique aussi que les valeurs de Log  $K_{oc}$  sont très élevées, elles varient entre de 3,82 à 4,65, ce qui suggère que tous les composés présentent une grande affinité d'adsorption sur les sols et les sédiments, et leur degré d'adsorption varie d'une substance à l'autre. Selon Kwon et Armbrust (2008) tous les ISRSs ont une capacité d'adsorption (>91%) à l'exception de la fluvoxamine, dont la capacité d'adsorption est de l'ordre de 73%. La fluoxétine s'adsorbe très rapidement (Kwon et Armbrust 2006; Redshaw et al. 2008), la préoccupation majeure sur le devenir de cette molécule doit être centrée sur sa persistance dans les sédiments et sols plutôt que dans l'eau.

La photolyse des ISRS dans une eau lacustre (tableau 2) indique que la fluoxétine est beaucoup plus résistante à la photolyse que les autres ISRS, avec une demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de 122 jours. Cependant, la paroxétine et la fluvoxamine ont été rapidement dégradées (demi-vie était de moins d'une journée) dans l'eau de la rivière (Kwon et Armbrust, 2004).

#### II.1.5. Bioaccumulation des antidépresseurs sérotoninergiques.

Plusieurs études ont confirmé que les ISRSs ont un potentiel de bioaccumulation dans les organismes aquatiques (Chu and Metcalfe, 2007), mais la plupart des études se sont focalisées sur le poisson. Brook et al. (2005) ont trouvé la fluoxétine, la sertraline et leurs métabolites, la norfluoxétine et le desméthylsertraline dans les tissus de poisson, *Lepomis macrochirus*, *Ictalurus punctatus* et *Pomoxis nigromaculatus* à différentes concentrations comme le montre le tableau suivant (tableau 3).

**Tableau 3.** Mesures de composés pharmaceutiques dans les différents organes des poissons *Lepomis macrochirus*, *Ictalurus punctatus* et *Pomoxis nigromaculatus*, d'après Brooks et al. (2005).

Composés	Tissus cérébraux ng g <sup>-1</sup> poids sec	Foie ng g <sup>-1</sup> poids sec	Muscle ng g <sup>-1</sup> poids sec
Fluoxétine	1,58 ± 0,70	1,34 ± 0,65	0,11 ± 0,03
Norfluoxétine	8,86 ± 5,90	10,27 ± 5,73	1,07 ± 0,41
Sertraline	4,27 ± 1,40	3,59 ± 1,67	0,34 ± 0,09
Desméthylsertraline	15,60 ± 14,30	12,94 ± 10,45	0,69 ± 0,59

Le tableau montrant que les antidépresseurs sérotoninergiques, et notamment la fluoxétine, la sertraline et leurs métabolites ont une capacité de bioaccumulation dans les différents organes des trois espèces étudiées. L'accumulation de ces composés semble se faire préférentiellement dans les tissus cérébraux (des effets sur le système nerveux des poissons)

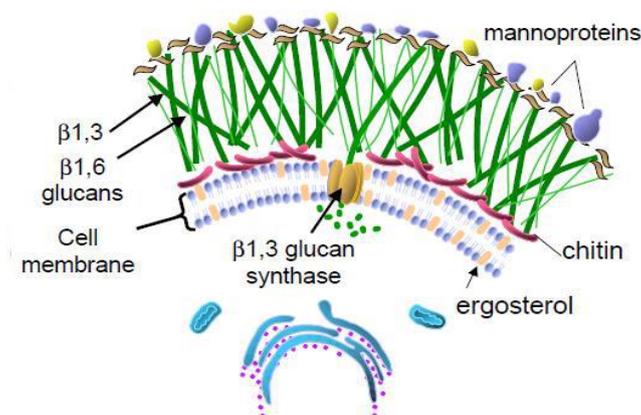
et le foie. Ces résultats concordent avec ceux de Lajeunesse et al. (2011) sur le poisson *Salvelinus fontinalis*.

Les travaux de Chu et Metcalfe (2007) rapportent des taux de fluoxétine, de norfluoxétine, et de paroxétine de 0,07 ; 0,1 et 0,24 ng g<sup>-1</sup> dans les muscles de poissons *Ameiurus nebulosus*, *Dorosoma cepedianum* et *Morone americana* exposés dans l'environnement.

En 2008, la persistance et la bioaccumulation de la fluoxétine et son métabolite (norfluoxétine) dans le tissu du poisson sont confirmées par l'étude de Paterson et Metcalfe sur *Oryzias latipes*. Ces chercheurs ont déterminé que la demi-vie de la fluoxétine dans les tissus de cette espèce est de 9,9 ± 1,1 jour.

## II.2. Les antifongiques.

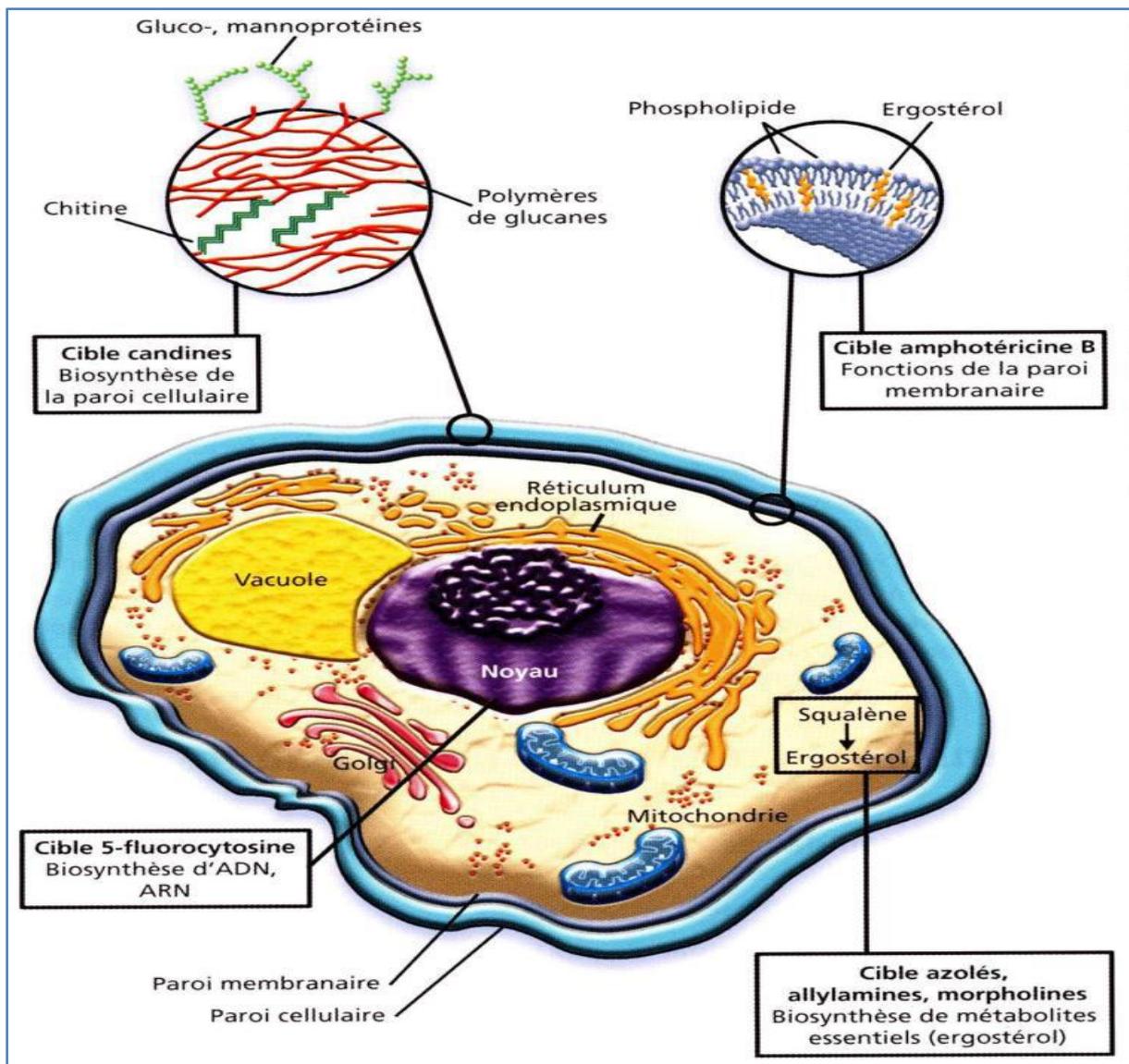
Les infections fongiques restent des affections graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés et d'interventions médicochirurgicales invasives. Elles sont traitées par des antifongiques qui sont des substances naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques, capables d'inhiber ou de stopper la croissance des champignons microscopiques. Ces derniers ont une composition spécifique, avec une membrane riche en lipides dont l'ergostérol, et une paroi composée de protéines, de phospholipide, de chitine, et de sucres dont les principaux sont les mannanes et les glucanes (figure 2). Cette composition joue un rôle considérable dans la perméabilité de la cellule par conséquent, toute substance susceptible d'agir sur les cellules fongiques doit d'abord traverser cette paroi (Helen Koenig, 1995 ; Lortholary et al., 1999).



**Figure 2.** Les différents constituants de la paroi fongique (Diamond, 1999).

**Tableau 4.** Classification des antifongiques selon leur mode d'action.

Cibles des antifongiques	Familles thérapeutiques
<b>Paroi de la cellule fongique</b>	Echinocandines
<b>Membrane cytoplasmique de la cellule fongique</b> Blocage de la synthèse de l'ergostérol Blocage de l'incorporation de l'ergostérol	Azolés Polyènes
<b>Noyau de la cellule fongique</b> Biosynthèse des acides nucléiques	Flucytosine



**Figure 3.** Cibles des différents antifongiques (Sanglard, 2003).

### II.2.1. Historique des antifongiques.

En 1939, le traitement des maladies fongiques a commencé avec la découverte de la griséofulvine, un métabolite de *Penicillium griseofulvum* (Oxford et al., 1939). Une décennie plus tard, le premier des médicaments polyènes, la nystatine, a été découvert, suivie en 1955 par l'amphotéricine. L'amphotéricine B est synthétisée par un actinomycète aérobie, *Streptomyces nodosus*. Le premier antifongique azolé a été synthétisé par Woolley en 1944, mais ce n'est qu'en 1958 que la communauté scientifique commence à s'intéresser aux composés azolés pour leurs propriétés antifongiques (Woolley, 1944). Vers la fin des années 1960, le clotrimazole, l'éconazole et le miconazole, trois imidazolés, ont été mis sur le marché (Fromtling, 1988).

Compte tenu de l'importance des mycoses graves en médecine clinique et la nécessité de thérapies alternatives pour leur utilisation chez les patients atteints d'infections fongiques, la recherche visant à identifier de nouveaux médicaments antifongiques s'est accélérée.

En 1981, la Food and Drug Administration (FDA) a approuvé un nouvel antifongique imidazolé, le kétoconazole, développé par Heeres et ses collaborateurs en 1979. Il est resté pendant près de 10 ans le seul antifongique disponible pour traiter les infections fongiques. Puis, le Fluconazole est devenu l'antifongique de référence au cours des années 1990 pour ses propriétés pharmacocinétiques ainsi que son spectre d'activité étendu. D'autres molécules triazolés telles que le voriconazole et le posaconazole ont été approuvés par la FDA en 2002 et en 2006.

### II.2.2. Utilisation des antifongiques.

Les médicaments antifongiques sont employés en phytothérapie et en médecine. Ils sont largement prescrits pour le traitement des infections fongiques systémiques (Venkatakrisnan et al., 2000), en particulier chez les patients immunodéprimés et cancéreux (Spanakis et al., 2006; Caillot et al., 2001 ; Altundag et Ibrahim, 2006), et pour le traitement de certaines maladies dépendantes des hormones stéroïdiennes sexuelles. Ils sont aussi utilisés comme des fongicides agricoles et biocides dans divers produits tels que le bitertanol, le cyproconazole, le difenoconazole, l'époxiconazole, le fluquinconazole, le flusilazole, le flutriafol, l'hexaconazole, l'imazalil, le myclobutanil, le penconazole, le prochloraz, le propiconazole, le tebuconazole, le triadimefon, le triadimenol, le triflumizole et le triticonazole (Zarn et al., 2003).

Il existe trois cibles principales d'antifongiques : la paroi, la membrane cytoplasmique et le noyau de la cellule fongique. Ces cibles ont permis le classement des antifongiques en

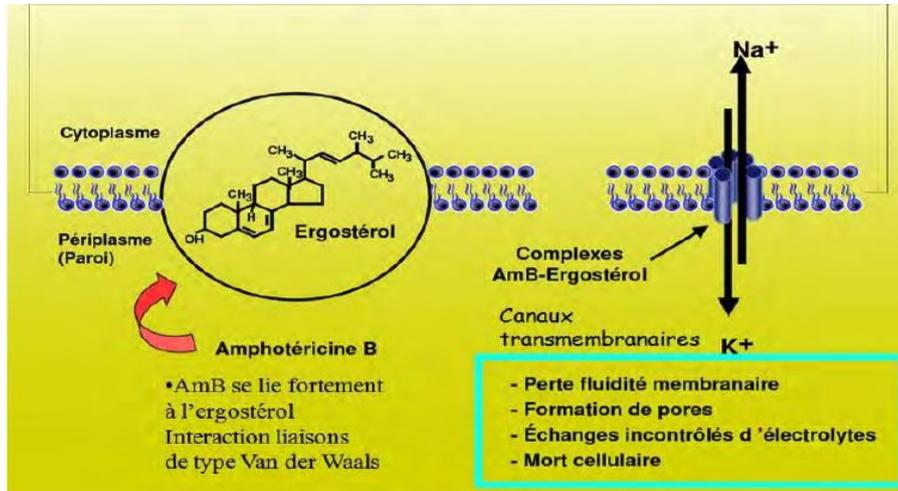


Figure 4. Mécanisme d'action de l'Amphotéricine B (Denis, 2010).

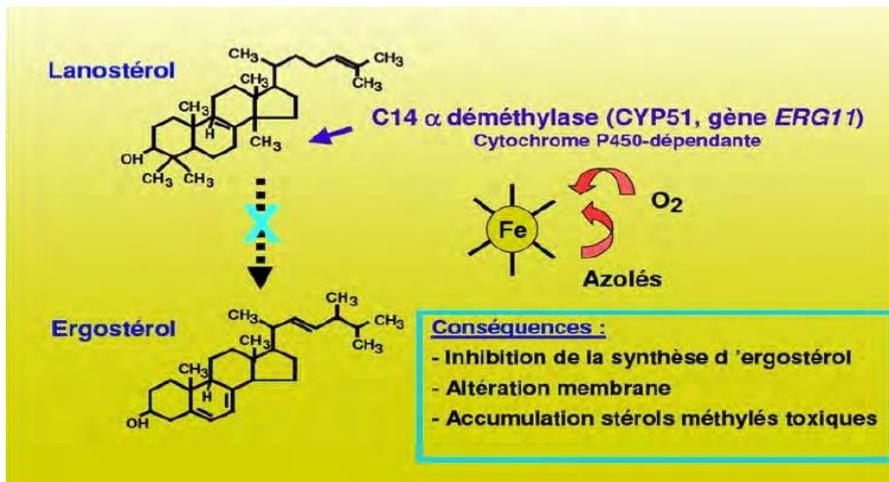


Figure 5. Mécanisme d'action des azolés (Denis, 2010).

plusieurs familles thérapeutiques, quatre classes principales sont décrites dans le tableau 4 ainsi que la figure 3.

### II.2.3. Mécanismes d'action des antifongiques.

- Les polyènes.

Les polyènes sont des macrolides comportant un cycle lactone et une chaîne carbonée avec des doubles liaisons conjuguées. Ils agissent au niveau de la membrane fongique en s'intercalant dans la couche phospholipidique par interaction avec l'ergostérol (figure 4). Il en résulte une formation des pores et les fuites de cations et d'anions cellulaires, conduisant à la mort cellulaire des champignons (Pfaller et al., 2010).

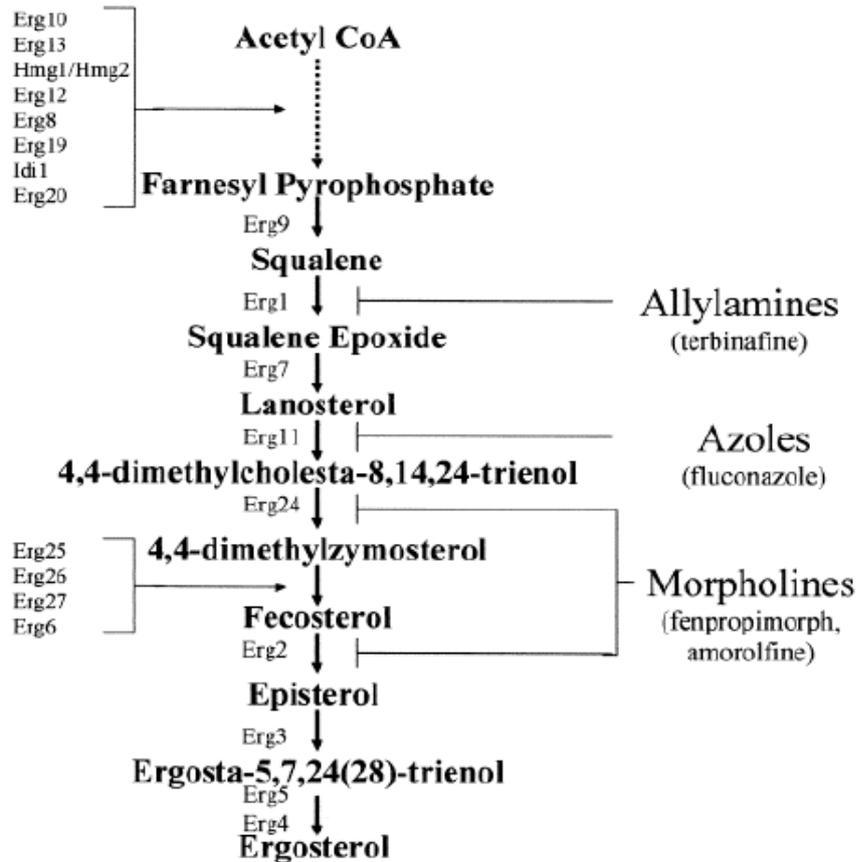
- Les azolés.

En fonction de leur structure chimique, les composés azolés antifongiques appartiennent à différentes classes, comme les triazoles ou encore les imidazoles. Cependant, leur activité antifongique passe par le même mécanisme d'action.

Les antifongiques azolés sont généralement considérés comme agents fongistatiques, ce sont des inhibiteurs enzymatiques qui bloquent certains isoenzymes des cytochromes P450 des mitochondries des cellules fongiques. Ils agissent sur la synthèse de l'ergostérol, composant indispensable de la membrane fongique, par inhibition de la 14 $\alpha$ -deméthylase (Jiang et al., 2013), lors de l'étape lanostérol et 14-deméthyl lanostérol. L'action fongistatique résulte de la baisse de concentration en ergostérol mais aussi de l'accumulation de composés précurseurs en amont de la chaîne de synthèse: Lanostérol et divers 14-methylsterols (figure 5 et 6).

- Les échinocandines.

Classe médicamenteuse la plus récente, les échinocandines inhibent de façon non compétitive la synthèse du  $\beta$  (1-3) D-glucane, composant structural essentiel de la paroi cellulaire des *Candida spp* et *Aspergillus spp*. (Denning, 2002). Les échinocandines sont devenues une option thérapeutique préférée pour la candidose invasive et sont souvent utilisées en combinaison avec des polyènes ou des triazoles pour lutter contre l'*Aspergillus spp*. Le *Cryptococcus* et les moisissures de mucoraceus qui ont moins de  $\beta$ -1-3-glucane dans leurs parois cellulaires (Johnson et Mohr, 2010 ; Wagner et al, 2006) sont moins sensibles à ce composé. Wagner et al., 2006 ont comparé l'activité de plusieurs espèces de *Candida* à l'*Aspergillus* telles que *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*,



**Figure 6.** Cascade métabolique de la synthèse de l'ergostérol à partir de l'acétylCoA, et lieux d'action des allylamine, des azolés et des morpholines

<http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Paroia3-5.php>

*C. lusitaniae*, *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. niger* vis-à-vis des échinocandines. Ils ont trouvé que ces antifongiques sont des fongicides pour les *Candida* et fongistatique pour les *Aspergillus*.

- Les flucytosines

La flucytosine est une pyrimidine fluorée qui a été développée à l'origine comme un agent pour traiter la leucémie. Elle dispose de deux modes d'action: inhibition de la synthèse des protéines et inhibition de la synthèse d'ADN. Cette dernière se faisant par conversion de 5-fluoro-uracile en l'acide 5-fluorodeoxyuridylique, un inhibiteur non compétitif de la thymidylate synthétase (Vermes et al., 2000). Cette molécule est un agent fongistatique.

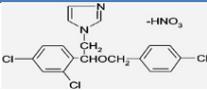
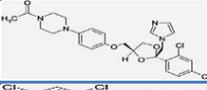
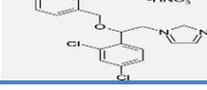
• Les Allylamines : Terbinafine

Il s'agit d'une molécule active sur les dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*), sur les levures (*Candida*, *Pityrosporum*), sur certains champignons filamenteux et sur certains dimorphiques. Ce produit fongicide agit sur le début de la chaîne de la synthèse des stérols (figures 3 et 6). Son action sur la squalène epoxidase entraîne une déficience en ergostérol et donc une altération du fonctionnement membranaire.

II.2.4. Caractéristiques physico-chimiques de quelques molécules d'antifongiques azolés.

Le tableau 5 montre les caractéristiques physico-chimiques de quelques molécules d'antifongiques azolés.

**Tableau 5.** Caractéristiques physicochimiques de quelques antifongiques azolés (Banque des médicaments, 2013).

Composés	CAS N°.	Structures chimiques	Solubilité dans l'eau (20–25 °C, mg L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub>	pKa
<b>Econazole nitrate (ECZ)</b>	24169-02-6		1,5	5,5	6,6
<b>Kétoconazole (KCZ)</b>	65277-42-1		0,0866	4,31	6,51/ 2,94
<b>Miconazole nitrate (MCZ)</b>	22916-47-8		0,01	6,1	6,7

Le tableau 5 présente la structure chimique de quelques dérivés azolés d'antifongiques de type imidazolés qui sont des molécules cycliques organiques, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azoté. Ces molécules sont très peu solubles dans l'eau surtout pour le kétoconazole, mais sont solubles dans des solvants organiques tels que le DMSO. Le potentiel de bioaccumulation de ces antifongiques est également une préoccupation tout en considérant le caractère lipophile indiqué par les valeurs élevées de Log K<sub>ow</sub> (Kahle et al, 2008) et qui sont supérieures à trois (Tomlin, 2002). Ce caractère joue un rôle sur l'adsorption des composés azolés dans les boues, la fixation sur les sédiments et la bioaccumulation dans les tissus adipeux des organismes aquatiques (Peschka et al., 2007).

**Tableau 6** : Concentrations des antifongiques azolés dans les eaux de surface et les boues de station d'épuration.

Substances	Lieux	Eaux de surface	Boues de STEP µg kg <sup>-1</sup>	Affluent ng L <sup>-1</sup>	Effluent ng L <sup>-1</sup>	Elimination %	References
Econazole	Suède		210 – 1000				Lindberg et al. (2010)
	Pear, Chine		54 – 140				Huang et al. (2010)
	Madrid, Espagne		2 - 30				Garcia-Valcarcel et Tadeo, (2011)
Fluquinconazole	Lyon, France	ND					Baugros et al. (2008)
Tebuconazole	Lyon, France	28,9-30					Baugros et al. (2008)
Tetraconazole	Lyon, France	ND					Baugros et al. (2008)
Ketoconazole	Pearl, Chine	1	194 - 437				Huang et al. (2010)
	Belgique	<LD		51,6 en janvier et	21,2 en janvier et	58,9	Van De Steene et al. (2010) Lindberg et al. (2010)
	Suède Madrid, Espagne		280 – 910 60 - 4500	19,5 en avril	34,8 en avril		Garcia-Valcarcel et Tadeo, (2011)
Miconazole	Pearl, Chine	2	238 - 1405				Huang et al. (2010)
	Belgique	<LD		337,9 en janvier et	35,7 en janvier et	89 en janvier et >87 en avril	Van De Steene et al. (2010) Lindberg et al., (2010)
	Suède		ND - 970	78,9 en avril	<LOD en avril		
Propiconazole	Madrid, Espagne		ND - 32				Garcia-Valcarcel et Tadeo, (2001) Van De Steene et al. (2010)
	Belgique (janvier)			54,7	41,6	24	
	Belgique (avril) Belgique			3889,3	3561,6	8,4	
		1,9-85,9, max 178,3					

ND : Non détecté, LD : Limite de détection.

D'autres études ont montré que le kétoconazole était plus facilement bio-transformé, tandis que pour l'éconazole et le miconazole, la biotransformation était moins importante.

La persistance des antifongiques azolés dans l'eau et dans le sol (Bromilow et al., 1999a; Bromilow et al., 1999b) est due à leur stabilité face à la dégradation hydrolytique, photolytique ou biologique.

#### II.2.5. Concentration des antifongiques azolés dans l'environnement.

La détection et la mesure des fongicides azolés dans l'environnement sont réalisées depuis environ 10 à 15 ans seulement, alors qu'ils sont produits, pour certains, depuis plus de 40 ans. Plusieurs études ont permis de rendre compte de la contamination environnementale par les azolés dans différents compartiments des écosystèmes. En Europe, ces antifongiques ont été détectés dans les eaux de surfaces et les eaux usées par plusieurs chercheurs (Berenzen et al., 2005; Gasperi et al., 2008; Kahle et al., 2008; Lindberg et al., 2010; Peschka et al., 2007; Roberts and Thomas, 2006; Stamatis et al., 2010; Thomas et Hilton, 2004; Van De Steene et Lambert, 2008). En Chine, les azolés ont été trouvés dans les eaux usées à des concentrations comprises entre 1 et 1834 ng L<sup>-1</sup> (Peng et al., 2012).

Le tableau 6 regroupe les concentrations de différents azolés mesurées dans les eaux de surface, dans les affluents et les effluents de stations d'épuration, ainsi que dans les boues de stations d'épuration.

Dans les eaux de surface, les concentrations en azolés sont comprises entre quelques ng L<sup>-1</sup> à plusieurs centaines de ng L<sup>-1</sup> (Tableau 6).

Par rapport aux eaux de surface, les concentrations en azolés sont globalement plus élevées aux niveaux des affluents des stations d'épurations et les molécules sont partiellement dégradées ou captées par des boues, d'où des concentrations souvent plus faibles au niveau des effluents. Cependant, les pourcentages de dégradation entre les entrées et les sorties de STEP sont différents en fonction de la molécule. Van de Steene *et al.* (2010) ont montré que la concentration de kétoconazole et de miconazole est fortement diminuée (58,5 et 89 %), alors que la concentration en propiconazole est moins diminuée (24 %) dans la même STEP après traitement en mois de janvier. Les antifongiques azolés atteignent des concentrations non négligeables dans les boues de STEP, allant du µg kg<sup>-1</sup> au mg kg<sup>-1</sup>, par captage ou par adsorption c'est-à-dire que les antifongiques ont une forte tendance à être adsorbés et persistent dans les solides (Peng et al., 2012). Ces résultats ont démontré que les antifongiques azolés peuvent atteindre l'environnement par les rejets des eaux usées et par

l'élimination des boues des stations d'épuration. D'autres recherches menées par Huang et al. (2010) ; Lindberg et al. (2010); Kahle et al. (2008); Thomas et Hilton (2004) ont montré que le clotrimazole et le kétoconazole, sont très persistantes et sont susceptibles de se répartir dans les matrices environnementales solides comme les sédiments et le sol.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés aux quatre molécules d'antifongiques ; l'amphotéricine B, l'éconazole, le kétoconazole et le miconazole.

### **II.3. Les antibiotiques.**

Un antibiotique est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique. Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée.

Un grand nombre d'antibiotiques sont des molécules naturelles, synthétisées par des micro-organismes, champignons ou bactéries. Ces dernières les produisent pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles ils sont en compétition dans leur biotope.

#### II.3.1. Utilisation des antibiotiques.

Les antibiotiques sont utilisés à la fois en médecine humaine et en médecine vétérinaire dans le traitement d'infections dues à des bactéries, des champignons ou des parasites. Ces traitements ont pour objectifs la maîtrise des maladies, la restauration ou le maintien de l'animal et la prévention de la transmission des agents pathogènes aux autres animaux et à l'homme. Ils ont aussi pendant longtemps été employés dans les élevages (agricoles et aquacoles) comme additifs alimentaires pour prévenir une infection et favoriser la croissance des animaux.

Les macrolides sont les deuxièmes agents antibactériens les plus importantes utilisés pour la thérapie humaine après la famille  $\beta$ -lactamine. L'utilisation de l'érythromycine est recommandée pour les patients atteints de BRANCHIECTASIE.

En raison des problèmes d'antibiorésistance, la consommation des antibiotiques en France et en Europe est particulièrement suivie.

### II.3.2. Mode d'action des macrolides.

Les macrolides sont constituées d'un noyau de lactone de 14 à 16 atomes de carbone, ainsi que de sucres neutres ou aminés (Pal, 2006). Leur activité biochimique est censée provenir de l'inhibition de la synthèse des protéines par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène spécifique dans la cavité de la peptidyl-transférase de l'ARNr S23 des bactéries (Schlünzen, 2001). L'activité biologique est essentiellement liée à la présence du sucre dans le ter-amino et les groupes hydroxyles qui se trouvent sur le noyau lactone. La présence du sucre neutre à la position C-3 du noyau n'est pas entièrement exigée (Pal, 2006). Les macrolides sont connus par leur capacité à inhiber la voie enzymatique du cytochrome P 450 (Yasuhiro et Toshiharu, 2007). L'effet peut être bactériostatique ou bactéricide, en fonction de la concentration et de la sensibilité des micro-organismes (Sanderson et al., 2002).

Sun et al. (2005); Zhang et al. (2002) ajoutent qu'il est possible que les mécanismes d'action de l'érythromycine comprennent une action anti-inflammatoire et antimucus.

### II.3.3. Caractéristiques physico-chimiques.

La clarithromycine est peu soluble dans l'eau. Dans la littérature, des valeurs de 0,07 mg L<sup>-1</sup> et 0,33 mg L<sup>-1</sup> sont rapportées par Nakagawa et al. (1992) et la banque des médicaments Banque drogues (2013). Vione et al. (2009) ont publié qu'aucune réduction significative de la photolyse de cette molécule n'était observée à des concentrations environnementales, et qu'elle n'est pas facilement biodégradable (Alexy et al., 2004).

Les concentrations des macrolides sont considérablement plus élevées dans les sédiments des rivières, ce qui indique une possible accumulation de ces macrolides dans ce compartiment (Kim et Carlson, 2007). Selon McArdell et al. (2003), ces antibiotiques peuvent persister dans les eaux de surface.

### 2.3.4. Concentrations des antibiotiques dans l'environnement.

Les antibiotiques ont été trouvés dans le monde entier dans les effluents des stations d'épuration, les effluents des hôpitaux, dans les eaux de surface et même dans l'eau potable à de faibles concentrations allant de ng L<sup>-1</sup> à quelque µg L<sup>-1</sup>, comme le montre le tableau 7. La plus forte concentration est enregistrée par Brown et al. (2006) pour la Sulfamethoxazole à une concentration de 2,1 µg L<sup>-1</sup>.

**Tableau 7.** Concentrations des antibiotiques dans les milieux aquatiques.

<b>Antibiotiques</b>	<b>pays</b>	<b>Environnements</b>	<b>Concentrations ng L<sup>-1</sup></b>	<b>References</b>
Clarithromycin CAS N° 81103-11-9	Italie	Rivière de Po	0,49–20,30	Calamari et al. (2003)
	Taiwan	Rivière de Lambro	8,31	Lin et al (2009)
		Affluent STEP	59–1433	
	Corée du sud	Effluent STEP	12–232	Bueno et al. (2009)
		Rivière de Mankyung	443	
Erythromycin CAS N° 114-07-8	Italie	Rivière de Po	1,40–15,90	Calamari et al. (2003)
	Corée du sud	Rivière de Lambro	4,50	Kim et al. (2007a)
		Effluent STEP	8,9–294	
	Corée du sud	Eau de surface	1,8–4,8	Bueno et al. (2009)
		Rivière	137	
Sulfamethoxazole CAS N° 723-46-6	USA	Eau de surface	150	Kolpin et al. (2002)
	USA	Eau souterraine	1110	Barnes et al. (2008)
	USA	Eau potable	0,32	Benotti et al. (2009)
	Taiwan	Effluent d'hôpital	1335	Lin et Tsai (2009)
	Taiwan	Affluent STEP	179–1760	Lin et al (2009)
	USA	Effluent d'hôpital	2100	Brown et al. (2006)
	Luxembourg	Affluent STEP	13–155	Pailler et al. (2009)
		Effluent STEP	4–39	
		Rivière d'Alzette	1–22	
		Rivière de Mess	0,3–5	
Sulfapyridine CAS N° 7238-91-7	Italie	Rivière de Tevere	<12–121	Perret et al. (2006)
		Rivière de Trigno	66	

ND : Non détecté.

En Europe et au Canada, le macrolide le plus utilisé est la clarithromycine (Miao et al., 2004; Göbel et al., 2005). Cette substance était présente le long de tous les sites d'échantillonnage dans les rivières Po, Lambro et Arno en Italie (Calamari et al., 2003; Zuccato et al., 2010 ; tableau 7) et dans des rivières allemandes à des concentrations de l'ordre de 5 à 360 ng L<sup>-1</sup> (LfU, 2009; UBA, 2010). En France, Feitosa-Felizzola et Chiron, (2009) ont détecté cette molécule dans une petite rivière au sud du pays, nommée rivière de l'Arc, à des concentrations de quelques µg L<sup>-1</sup>.

La clarithromycine est aussi détectée dans les affluents et des effluents de STEP du monde entier à des concentrations de 12 à 1433 ng L<sup>-1</sup> (Lin et al, 2009 ; tableau 7).

- Elimination des macrolides par les stations d'épurations.

Le taux d'élimination des macrolides diffère d'une station d'épuration à une autre, selon le type de traitement et la technique utilisée. Pour la clarithromycine par exemple, l'efficacité d'élimination est inférieure à 20% par la méthode de CAS-FBR (Göbel et al., 2007 ; Sponberg et Witter, 2008), de 69% les boues actives des STEP (Senta et al., 2013). En Suisse, l'ozonation des eaux usées a entraîné une élimination totale de la clarithromycine (Abegglen et al., 2010).

## **II.4. Les bêta-bloquants.**

### II.4.1. Utilisation des bêta-bloquants.

Les bêta-bloquants sont largement prescrits (Fraysse et Garric, 2005; Fent et al., 2006; Maurer et al., 2007) pour le traitement de divers troubles cardiovasculaires tels que l'hypertension artérielle, les cardiopathies ischémiques et les troubles du rythme cardiaque (Maurer et al., 2007). Ils sont également utilisés en médecine vétérinaire et illégalement en dopage dans de nombreux sports (Huggett et al., 2002; Barbieri et al, 2012).

### II.4.2. Mécanisme d'action des bêta-bloquants.

Pour les mammifères, y compris les humains, les bêtabloquants sont des inhibiteurs des récepteurs bêta-adrénergiques  $\beta_1$  et  $\beta_2$  en particulier au niveau du cœur, et sont antagonistes des catécholamines endogènes (adrénaline, noradrénaline). Ces bêta-bloquants ont des affinités différentes pour ces récepteurs. Le métoprolol et l'aténolol présentent une spécificité au  $\beta_1$ -récepteurs (Rang et al., 1999), contrairement au propranolol qui bloque à la fois les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Ce dernier a également une activité stabilisatrice de la membrane. Il réduit la perméabilité de la membrane pour divers ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{+2}$ ) et il a une activité

anesthésique locale. Ainsi, l'effet sur la survie de l'organisme peut être dû en partie à des effets néfastes sur la stabilisation de la membrane (Frayssé et Garric, 2005; Dzialowski et al., 2006; Claessens et al., 2013).

#### II.4.3. Caractéristiques physico-chimiques.

La majorité des bêta-bloquants ont une solubilité relativement élevée dans l'eau, une faible volatilisation, et un faible coefficient de partage ( $\log K_{ow}$ ) (tableau 8), dans la phase aqueuse, la volatilisation et le transfert vers les sédiments sont peu susceptibles de se produire dans des conditions pertinentes pour l'environnement (pH 7 et 20 °C) (Liu et al., 2009). Ce n'est pas le cas pour le Propranolol et le métoprolol. Parmi ces deux composés, le propranolol est le plus hydrophobe et présente une valeur de  $\log K_{ow}$  le plus élevé (Kibbey et al., 2007) et un potentiel de bioaccumulation (Kibbey et al, 2007; Maurer et al, 2007; Wang et al, 2012; Wilde et al, 2013).

**Tableau 8.** Caractéristiques physico-chimiques de certaines molécules de bêta-bloquants.

Composés	CAS	Poid moléculaire $\text{g mol}^{-1}$	$\log K_{ow}$	$\text{pK}_a$	Solubilité dans l'eau à 20–25°C ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Acébutolol	37517-30-9	336,45	1,19		
Aténolol	29122-68-7	266,34	0,16		
Métoprolol		267,36	1,95	9,52	13,30
Nadolol	42200-33-9	309,40	0,85	9,69	
Propranolol	525-66-6	259,34	3,48	9,53	61,70

Dans les eaux environnementales, les produits pharmaceutiques peuvent subir diverses voies de dégradation, biotique et abiotique (hydrolyse, photolyse). La stabilité à l'hydrolyse de bêtabloquants a été étudiée à des pH de 4 ; 7 et 9 (Maszkowska et al., 2014). Les résultats obtenus ont révélé une stabilité à l'hydrolyse élevée du métoprolol et de propranolol à 50 °C. Chacun des bêtabloquants a révélé une tendance à une légère dégradation dans l'environnement acide (pH 4), dans lequel la dégradation ne dépasse pas 6%. Selon la procédure 111 de L'Organisation de coopération et de développement économique (OCDE), la demi-vie de ces composés dans le milieu aquatique à 25 °C peut être estimée à une année.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Wang et al. (2012) qui ont rapporté seulement un faible degré de dégradation hydrolytique de métoprolol et nadolol (moins de 2%) dans l'eau déionisée à une gamme de pH comprise entre 4 et 10.

La biodégradation des bêta-bloquants est considérée comme peu importante dans les eaux de rivière, étudiées dans des conditions de laboratoire (Kuemmerer et al., 2000). Par conséquent, la photo-dégradation pourrait être le mécanisme principal de devenir des bêtabloquants dans les milieux aquatiques (Robinson et al., 2007).

L'étude menée par Liu et Williams (2007) sur la photolyse aqueuse directe de bêta-bloquants a montré des valeurs de demi-vies de propranolol, l'aténolol, le métoprolol, respectives de 16, 350, et 630 heures à 20-26 °C. Ces résultats ont démontré une photolyse directe avec des demi-vies rapides, qu'ainsi le propranolol est probablement peu persistant dans les eaux naturelles.

Selon Piram et al. (2008), l'acébutolol est mal photodégradé en dépit d'une absorption importante dans les rayons UV-B. Après adsorption de l'énergie, la molécule peut revenir à son niveau fondamental par des voies telles que la phosphorescence ou la fluorescence, qui ne conduisent pas à une liaison intramoléculaire. En effet, l'acébutolol est un composé fluorescent (Adbdellatef et al., 2006), cette molécule présente une demi de vie de 144 heures dans l'eau pure et de 10 à 28 heures dans les eaux des stations d'épurations contrairement à l'aténolol qui reste stable (Piram et al., 2008).

Les résultats de Piram (2008) sur la demi-vie du propranolol concordent avec ceux de Liu et Williams (2007) qui montrent que le propranolol est la molécule la plus photodégradable. La demi-vie est de 8 heures dans l'eau pure et de 3 heures dans les eaux de stations d'épurations (Piram et al., 2008).

#### II.4.4. Elimination des bêta-bloquants par les stations d'épurations.

Plusieurs molécules de bêta-bloquants ne sont pas complètement éliminées dans les effluents des stations d'épuration (STEP). Vieno et al. (2006) ont constaté une élimination de 11 % de métoprolol et 76 % d'aténolol, tandis que Ternes (1998) a constaté une élimination respective de 83 et 96% de métoprolol et de propranolol. Par conséquent, les résidus pharmaceutiques non éliminés peuvent atteindre les eaux de surface à de faibles concentrations de l'ordre du ng L<sup>-1</sup>, par exemple, la valeur maximale enregistrée du métoprolol par Vieno et al. (2006) dans la rivière de Venta en Finlande était de 116 ng L<sup>-1</sup>.

### **II.5. Les antihistaminiques**

Un antihistaminique est un médicament qui sert à réduire ou à éliminer les effets de l'histamine, par action sur les récepteurs de l'histamine. Dans l'usage général, le terme

antihistaminique désigne uniquement les antagonistes des récepteurs H1, appelés antihistaminiques H1 (Leurs et al., 2002; Simons, 2004).

Les plus connus et commercialisés des antihistaminiques H1 sont la cétirizine, la lévocétirizine, la loratadine et la desloratadine. La cétirizine, métabolite de l'hydroxyzine, est caractérisée par sa forte sélectivité pour le site du récepteur H1.

#### II.5.1. Utilisation des antihistaminiques.

Les antihistaminiques H1 sont commercialisés en France depuis le début des années 1940. Ils constituent le principal traitement des allergies respiratoires (avec les corticoïdes). La cétirizine est utilisée dans les réactions allergiques induites par l'histamine, elle bloque également l'infiltration d'éosinophiles au site de réactions cutanées induites par des allergènes. Cette molécule a prouvé son efficacité dans le traitement de la rhinite et l'urticaire allergique saisonnière et vivace (Sheffer et Samuels, 1990). La cétirizine, dérivé carboxylé de l'hydroxyzine utilisée comme anxiolytique, elle inhibe la libération de diverses cytokines et des leucotriènes.

#### II.5.2. Mécanisme d'action des antihistaminiques.

Les antihistaminiques H1 constituent une classe médicamenteuse d'usage courant en médecine générale et en allergologie. Ce sont des antagonismes compétitif de l'histamine sur les récepteurs H1, présents au niveau des terminaisons nerveuses du muscle lisse et des cellules glandulaires (Baroody, 2000), c'est-à-dire que la fixation de ces médicaments sur les récepteurs H1 à l'histamine, inhibent d'une manière compétitive les effets de l'histamine et plus particulièrement l'effet vasodilatateur et l'augmentation de la perméabilité capillaire à l'origine des réactions œdémateuses. Ils ne s'opposent pas aux réactions antigène/anticorps, ni à la libération d'histamine.

#### II.5.3. Concentrations de la cétirizine dans l'environnement.

La présence de la cétirizine dans l'environnement aquatique a été étudiée par Bahlmann et al. (2012). Cette molécule est retrouvée dans les affluents et les effluents des eaux usées et dans les eaux de surfaces à des concentrations maximales respectives de 0,49 ; 0,51 et 0,72  $\mu\text{g L}^{-1}$  à Berlin en Allemagne. En Inde, cette molécule a été détectée à des niveaux élevés de concentration de 1,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  dans des effluents de STEP (Larsson et al., 2007). La concentration de ce médicament est variable d'un mois à l'autre, elle est

significativement augmentée, pendant la saison du rhume des foins, entre Mars et Août (Bahlmann et al., 2012).

## **II.6. Les antiépileptiques.**

### II.6.1. Utilisation des antiépileptiques.

Durant ces dernières années, de nombreux antiépileptiques avec des améliorations de la tolérance et de la pharmacocinétique ont été développés permettant aux patients et aux médecins d'avoir de nombreuses options pour traiter les épilepsies (Arzimanoglou et al., 2010). Ces médicaments sont utilisés dans le traitement des douleurs neuropathiques telles la neuropathie diabétique et la neuropathie post-herpétique (Segal et Rordorf, 1996). Ils peuvent être également utilisés comme des co-analgésiques à des dérivés morphiniques dans le cadre de douleurs cancéreuses neuropathiques (Body et al., 2004) ou pour soulager la douleur neurotrope associée à la maladie de Lyme (Weissenbacher et al., 2005).

### II.6.2. Mécanisme d'action des antiépileptiques.

Les médicaments antiépileptiques agissent dans le système nerveux central (SNC) en réduisant l'activité neuronale globale. Le mécanisme d'action de ces médicaments diffère d'une molécule à une autre. Par exemple, la gabapentine inhibe la synthèse du glutamate et/ou active la transformation du glutamate en GABA. Selon Sills (2006), cette molécule est l'inhibitrice spécifique de certains canaux calciques contenant une sous-unité  $\alpha 2\delta-1$ . Pour les benzodiazepines, le mode d'action est plutôt dû à l'amélioration de l'effet inhibiteur du neurotransmetteur acide  $\gamma$ -aminobutyrique (Rang et al., 1999).

### II.6.3. Caractéristiques physico-chimiques de la gabapentine.

La gabapentine, antiépileptique de deuxième génération, est structurellement un dérivé de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). Cette molécule est peu soluble dans l'eau, faiblement soluble dans l'éthanol.

### II.6.4. Concentration des antiépileptiques dans l'environnement.

La plupart des études sur la présence et le devenir des antiépileptiques dans l'environnement sont menées sur la carbamezépine. Cette molécule est omniprésente dans l'environnement, d'après Ternes (1998), elle n'est pas significativement éliminée par les traitements en STEP et par conséquent, est détectée dans les rivières (Vieno et al., 2006 ; Moldovan, 2006 ; Bendz, 2005 ; Le et Munekage, 2004 ; Kim et al., 2009a) à des concentrations allant jusqu'à 595 ng L<sup>-1</sup> dans la rivière de Mankyungen Corée de sud (Kim et al., 2009a). Cette molécule a

également été trouvée dans les eaux souterraines (Sacher, 2001 ; Reddersen et Heberer, 2003) à des concentrations qui peuvent atteindre  $900 \text{ ng L}^{-1}$ .

En ce qui concerne la gabapentine, cette molécule est trouvée dans les affluents de STEP mais pas dans les effluents de STEP, à des concentrations comprises entre 100 et  $130 \text{ ng L}^{-1}$  (Yu et al., 2006, 2012).

#### II.6.5. Dégradation, demi-vie et élimination de quelques molécules d'antiépileptiques.

La biodégradation est utilisée pour le traitement des eaux usées et du sol. Les expériences de la biodégradation aérobie (par boues activées comme inoculum microbien) menées par Yu et al. (2006) ont montré que la gabapentine est biodégradable à 90%.

Tixier et al. (2003) calculent le temps de demi-vie à 63 jours pour la carbamazépine. D'après Ternes (1998), cette molécule n'est pas significativement éliminée par les traitements en STEP (moins de 10 %).

### **III. TOXICITE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES TROUVÉS DANS L'ENVIRONNEMENT.**

La toxicité des substances pharmaceutiques est évaluée par des tests sur des organismes de laboratoires tels que les algues, le zooplancton et autres invertébrés et les poissons (Garric et al., 2006). Ces organismes permettent de définir les concentrations effectives (CE50, concentrations pour lesquelles la molécule aura un impact sur la croissance ou la reproduction de 50 % des organismes étudiés), les concentrations létales (CL50, concentrations pour lesquelles la molécule provoquera la mort de 50 % des individus) ou encore les LOEC (Lowest Observed Effects Concentration) et les NOEC (No Observed Effects Concentration, c'est-à-dire les plus petites concentrations provoquant des effets observables et les concentrations n'entraînant pas d'effets observables).

Une analyse des différentes valeurs de toxicité aiguë relevées dans la bibliographie fait ressortir qu'en règle générale, la toxicité exprimée par les valeurs de CL50 ou CE50 chez les vertébrés et les invertébrés d'eau douce est comprise entre 100 et  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  à l'exception des algues pour lesquelles ces valeurs peuvent dépasser les  $10000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tableau 9.** Toxicité aiguë des molécules d'antidépresseurs sur quelques organismes aquatiques.

Taxa	Espèces	Toxicités aiguës	Concentrations	Références
<b>Clomipramine</b>				
Crustacé	<i>D. magna</i>	CE50-48h	2,74 mg L <sup>-1</sup>	Minguez et al. (2014)
<b>Fluoxétine</b>				
Algue	<i>P. subcapitata</i>	CI10-96h	31,34 µg L <sup>-1</sup>	Johnson et al. (2007)
		CI50-96h	44,99 µg L <sup>-1</sup> •	
	<i>S. acutus</i>	CI10-96h	55,60 µg L <sup>-1</sup>	Brooks et al. (2003a)
		CI50-96h	91,23 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>S. quadricauda</i>	CI10-96h	97,76 µg L <sup>-1</sup>	
		CI50-96h	212,98 µg L <sup>-1</sup>	
<i>C. vulgaris</i>	CI10-96h	2901,57 µg L <sup>-1</sup>		
	CI50-96h	4339,25 µg L <sup>-1</sup>		
Crustacé	<i>P. subcapitata</i>	CE50	24 µg L <sup>-1</sup>	Brooks et al. (2003a)
	<i>C. dubia</i>	CE50	234 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>C. dubia</i>	CL50	234 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>D. magna</i>	CE50	820 µg L <sup>-1</sup>	
Poisson	<i>H. azteca</i>	CE50-48h	5,91 mg L <sup>-1</sup>	Minguez et al. (2014)
		CE50	>43 µg L <sup>-1</sup>	Brooks et al. (2003a)
	<i>C. tentans</i>	CL50	15,2 µg L <sup>-1</sup>	Henry et Black (2008)
	<i>P. promela</i>	CL50	705 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>G. affinis</i>	CL50 (7 jrs)	546 µg L <sup>-1</sup>	
<b>Fluvoxamine</b>				
Algue	<i>P. subcapitata</i>	CI10-96h	3987,38 µg L <sup>-1</sup>	Johnson et al. (2007)
		CI50-96h	4002,88 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>S. acutus</i>	CI10-96h	2503,65 µg L <sup>-1</sup>	
		CI50-96h	3620,24 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>S. quadricauda</i>	CI10-96h	1662,91 µg L <sup>-1</sup>	
		CI50-96h	3563,34 µg L <sup>-1</sup>	
<i>C. vulgaris</i>	CI10-96h	6162,86 µg L <sup>-1</sup>		
	CI50-96h	10208,47 µg L <sup>-1</sup>		
Crustacé	<i>C. dubia</i>	CL50-48h	0,84 mg L <sup>-1</sup>	Henry et al. (2004)
<b>Paroxétine</b>				
Crustacé	<i>X. laevis</i>	CE50	4,6 mg L <sup>-1</sup>	Richards et Cole (2006)
	<i>C. dubia</i>	CL50-48h	0,58 mg L <sup>-1</sup>	Henry et al. (2004)
	<i>D. magna</i>	CE50-48h	6,24 mg L <sup>-1</sup>	Minguez et al. (2014)

### III.1. Toxicité des antidépresseurs sérotoninergiques sur les organismes aquatiques.

Le tableau 9 présente l'ensemble des données de toxicité aiguë retrouvées pour les organismes aquatiques appartenant aux différents maillons de la chaîne trophique.

Ces données sont présentées en fonction des espèces les plus utilisées dans les tests de toxicologie, appartenant aux grands groupes taxonomiques (algues, crustacés et poisson).

#### III.1.1 Toxicité sur les algues.

Les algues jouent un rôle très important dans la structuration planctonique des écosystèmes aquatiques. Elles occupent le premier maillon de la chaîne trophique, comme leur apport d'énergie provient du soleil.

Les effets des antidépresseurs sur l'inhibition de croissance des algues dépendent de la structure chimique de la molécule testée et de l'espèce. Les valeurs de CL50 présentées dans le tableau 9 ci-dessus varient de 0,027 à 10,2 mg L<sup>-1</sup>, la sertraline étant l'un des composés les plus toxiques pour toutes les espèces d'algue. *Pseudokirchneriella subcapitata* a montré une grande sensibilité vis-à-vis de la fluoxétine et la sertraline que les autres algues, elle est 100 et 63 fois plus sensible respectivement pour la fluoxétine et le sertraline que *Chlorella vulgaris*.

#### III.1.2. Toxicité sur les invertébrés.

Les antidépresseurs sérotoninergiques, notamment la fluoxétine et la sertraline, préoccupaient plusieurs chercheurs au cours de ces dernières années en raison de leur potentiel perturbateur des systèmes neuroendocriniens dans les organismes aquatiques (Brooks et al., 2003a).

La fluoxétine est soupçonnée de provoquer des effets non négligeables dans le milieu aquatique et altère les taux de stéroïdes sexuels chez les invertébrés (tableau 10), en diminuant la fécondité de *Ceriodaphnia dubia* à 14 µg L<sup>-1</sup> (Brooks et al., 2003b) et en réduisant le nombre de nouveau-nés par femelle pour des concentrations minimales de 0,44 mg L<sup>-1</sup> (Henry et al., 2004). Elle agit sur l'embryogenèse de *Daphnia magna* (Péry et al., 2008) par une amélioration de sa reproduction à une concentration de 36 µg L<sup>-1</sup> (Flaherty et Dodson, 2005).

Pour certaines concentrations, les effets des antidépresseurs sérotoninergiques deviennent létaux. Les valeurs de CL50-48h de toxicité aiguë sur le crustacé d'eau douce *C. dubia* varient de 120 (sertraline) à 840 µg L<sup>-1</sup> (fluvoxamine) (Henry et al., 2004). La capacité de locomotion de *C. dubia* a également été négativement affectée à des concentrations d'ISRS au-dessous des valeurs de la CL50 déterminée (Henry et al., 2004).

**Tableau 9.** Toxicité aiguë des molécules d'antidépresseurs sur quelques organismes aquatiques (suite).

<b>Taxa</b>	<b>Espèces</b>	<b>Toxicités aiguës</b>	<b>Concentrations</b>	<b>Références</b>
<b>Sertraline</b>				
Algue	<i>P. subcapitata</i>	CI10-96h	4,57 µg L <sup>-1</sup>	Johnson et al. (2007)
		CI50-96h	12,10 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>S. acutus</i>	CI10-96h	54,59 µg L <sup>-1</sup>	
		CI50-96h	98,92 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>S. quadricauda</i>	CI10-96h	48,19 µg L <sup>-1</sup>	
		CI50-96h	317,02 µg L <sup>-1</sup>	
Crustacé	<i>C. vulgaris</i>	CI10-96h	152,73 µg L <sup>-1</sup>	Richards et Cole (2006) Henry et al. (2004) Christensen et al. (2007)
		CI50-96h	763,66 µg L <sup>-1</sup>	
	<i>X. laevis</i>	CE50	4,6 mg L <sup>-1</sup>	
Crustacé	<i>C. dubia</i>	CE50-48h	0,12 mg L <sup>-1</sup>	Christensen et al. (2007)
	<i>D. magna</i>	CE50-48h	920 µg L <sup>-1</sup>	
Poisson	<i>P. promelas</i>	CE50-48h	1,15 mg L <sup>-1</sup>	Valenti et al. (2009)
		CE50-48h	72 µg L <sup>-1</sup>	
<b>Venlafaxine</b>				
Crustacé	<i>D. magna</i>	CE50-48h	141,28 mg L <sup>-1</sup>	Minguez et al. (2014)

L'effet additif des médicaments est marqué pour le mélange des antidépresseurs sérotoninergiques dans certains tests d'écotoxicité sur *D. magna*, *P. subsapitata* (Christensen et al., 2007; Metcalfe et al., 2010) et sur *C. dubia* (Henry et Black, 2007), ces derniers auteurs ont considéré que des effets de la toxicité aiguë chez les organismes aquatiques peuvent être additifs pour chaque ISRS dans un mélange.

### III.1.3. Toxicité sur les poissons.

Le test effectué sur le poisson *Pimephales promelas* a montré une valeur de CL50 de  $705 \mu\text{g L}^{-1}$ , après 48 h d'exposition à la fluoxétine (Brooks et al., 2003a). Les juvéniles de *Gambusia affinis* exposés à  $71 \mu\text{g L}^{-1}$  de cette molécule ont montré un retard dans le développement de la maturité de la morphologie sexuelle chez les mâles et les femelles (Henry et Black, 2008). Une étude menée par Valenti et al. (2009) montre que les tests de toxicité aiguë 48h (tableau 9) et chronique 7 jours (tableau 10) sur *Pimephales promelas* exposés à la sertraline a un effet adverse sur la survie, la croissance et le taux de nutrition.

Les LOECs et les NOECs de la toxicité chronique sont aussi présentées dans le tableau 10 sur ces organismes afin d'évaluer la toxicité des différentes molécules d'antidépresseurs et le risque qu'elles représentent sur l'environnement.

Certains auteurs tentent d'appréhender le potentiel synergique des mélanges d'antidépresseurs avec d'autres classes des médicaments. Renner (2002) a montré qu'un mélange de fluoxétine, l'ibuprofène, et de ciprofloxacine possède une toxicité sur les plantes, le plancton et les poissons à des concentrations 100 à 200 fois plus faibles que celles des composés seuls. Ceci suggère que les composés apparaissant à des concentrations inférieures à leur NOEC peuvent contribuer à l'effet total du mélange. L'exposition du poisson *Fathead minnows* à un mélange de six produits pharmaceutiques, de l'ordre de  $\text{ng L}^{-1}$ , n'a pas affecté la survie, la croissance ou la production d'œufs, mais il a augmenté le nombre de malformations chez leurs descendants (Parrott et Bennie, 2009).

L'exposition des organismes aquatiques (tableau 10) aux ISRSs même à l'état de trace conduit à l'altération de plusieurs activités biologiques telle que la locomotion de l'amphipode *Gammarus pulex* (De Lange et al., 2006) à une concentration de  $100 \text{ ng L}^{-1}$  de fluoxétine. Elle peut conduire à la réduction de la reproduction, des anomalies dans le développement embryonnaire, un retard dans le développement physiologique et la maturation sexuelle. Lazzara et al. (2012) ont montré une réduction du nombre d'ovocytes par

**Tableau 10.** Valeurs des concentrations d'antidépresseurs (LOEC, NOEC) induisant des effets toxiques chroniques chez quelques organismes aquatiques.

Taxa		Toxicité	Concentrations	Effets	Références
<b>Fluoxétine</b>					
Crustacé	<i>C. dubia</i>	NOEC	0,089 mg L <sup>-1</sup>	nombre des nouveau-nés	Henry et al. (2004)
	<i>D. magna</i>	NOEC	8,9 µg L <sup>-1</sup>	longueur des nouveau-nés	Péry et al. (2008)
		LOEC	31 µg L <sup>-1</sup>		
	<i>P. antipodarum</i>	NOEC	13 µg L <sup>-1</sup>	reproduction	
		LOEC	69 µg L <sup>-1</sup>		
	<i>P. antipodarum</i>	NOEC	33,3 µg L <sup>-1</sup>	nombre de cumuler des	Gust et al. (2009)
		LOEC	100 µg L <sup>-1</sup>	nouveau-nés comportements	
	<i>G. pulex</i>	LOEC	100 ng L <sup>-1</sup>	croissance	De Lange et al.(2006)
	<i>C. tentans</i>	LOEC-10 jrs	1,3 mg kg <sup>-1</sup>	nombre d'embryons sans	Brooks et al. (2003a)
	EC10-56 jrs	0,81 µg L <sup>-1</sup>	coquille	Nentwing (2007)	
	NOEC-56 jrs	0,47 µg L <sup>-1</sup>			
Poisson	<i>P. promelas</i>	CL50-48h	705 µg L <sup>-1</sup>		Brooks et al. (2003a)
<b>Fluvoxamine</b>					
Crustacé	<i>C. dubia</i>	NOEC	0,366 mg L <sup>-1</sup>	nombre des nouveau-nés	Henry et al. (2004)
<b>Sertraline</b>					
Crustacé	<i>C. dubia</i>	LOEC	0,045 mg L <sup>-1</sup> 100	nombre des nouveau-nés	Henry et al. (2004) Minagh et al. (2009)
	<i>D. magna</i>	LOEC-21 jrs	µg L <sup>-1</sup>	reproduction	
		EC50-21 jrs	66 µg L <sup>-1</sup>	reproduction	
Poisson	<i>D. rerio</i>	Biomarqueurs-21 jrs	66 µg L <sup>-1</sup>	répression des gènes	Park et al. (2012)
	<i>O. mykiss</i>	LOEC-96 h	320 µg L <sup>-1</sup>	mortalité	
	<i>P. promelas</i>	LOEC- 21 jrs	0,0052 µg L <sup>-1</sup> 60-	mortalité	Schultz et al. (2011)
	<i>P. promelas</i>	LOEC-7 jrs	120 µg L <sup>-1</sup>	croissance et nutrition	Johnson et al. (2005)

follicule et de spermatozoïdes par tube séminifère dans les gonades de *Dreissena polymorpha* exposés à la fluoxétine, par rapport aux témoins, à des concentrations de l'ordre de 20 ng L<sup>-1</sup>. Cette molécule peut induire la ponte des moules (Fong et al., 1998) et augmente le taux d'œstradiol à de faibles concentrations de 0,1 et 0,5 µg L<sup>-1</sup> (Foran et al., 2004).

Plusieurs auteurs ont montré que la sertraline peut induire des effets néfastes à des concentrations environnementales. Selon Connors et al. (2009) cette substance peut causer une toxicité sur le développement des têtards de *Xenopus laevis* à 0,1 et 1 µg L<sup>-1</sup>. L'exposition chronique de 21 jours du mâle de *Pimephales promelas* à la sertraline à 5,2 ng L<sup>-1</sup> cause sa mortalité (Schultz et al., 2011). Elle présente une grande toxicité pour plusieurs organismes aquatiques tels que *P. subcapitata*, *C. dubia*, *D. magna* (Christensen et al., 2007; Connors et al., 2009; Henry et al., 2004; Johnson et al., 2005; Lajeunesse et al., 2011; Minagh et al., 2009; Park et al., 2012; Sanderson et Thomsen, 2009; Schultz et al., 2011; Valenti et al., 2009; 2012 ; Mínguez et al. (2014)).

Très peu d'études ont été menées pour évaluer les effets chroniques des antidépresseurs sérotoninergiques sur plusieurs générations d'espèces dulçaquicoles. Selon notre connaissance, il existe une seule étude réalisée par Lamichhane et al. (2014) qui a traité de l'effet de la sertraline sur plusieurs générations. Ces auteurs ont utilisé la ceriodaphnie *Ceriodaphnia dubia* comme modèle pour ces tests. Ils ont trouvé que la LOEC qui affecte la fécondation et la croissance de la céridaphnie est de 53,5 µg L<sup>-1</sup> pour les deux premières générations et que la génération suivante est devenue plus sensible (LOEC était de 4,8 µg L<sup>-1</sup>).

L'exposition chronique de quatre semaines de *Japanese medaka* à une gamme de concentration de 0,1 à 5 µg L<sup>-1</sup> de setraline a révélé que la fécondité, la fertilisation des œufs et leur éclosion n'ont pas été modifiées par l'exposition. Cependant, une augmentation du taux des anomalies au cours du développement des embryons de poissons a été observée et les concentrations d'œstradiol dans le plasma étaient significativement élevées chez les femelles exposées (Nentwing, 2007).

### **III.2. Toxicité des antifongiques sur les organismes aquatiques.**

Les études sur les antifongiques azolés, dans l'environnement sont à ce jour, récentes et limitées. Ces fongicides inhibent l'activité de certains cytochromes P450 (CYP) chez les champignons et ils ont le pouvoir de cibler des CYP chez d'autres espèces, dont celles des vertébrés (Mason et al., 1985; Trosken et al., 2004), comme par exemple le CYP17 chez les mammifères (Ayub et Levell 1987; Eil 1992).

**Tableau 11** : Données de toxicité aiguë et chronique de quelques antibiotiques sur les organismes aquatiques.

Taxa	Espèce	Toxicité	Concentrations	Effets	Références
<b>Clarithromycine</b>					
Algue	<i>P. subcapitata</i>	CE50-72 h	2 µg L <sup>-1</sup>	croissance	Isidori et al. (2005)
		CE50-96 h	11 µg L <sup>-1</sup>	croissance	Yamashita et al. (2006)
		LOEC-96 h	6,3 µg L <sup>-1</sup>	croissance	Yamashita et al. (2006)
		NOEC-96 h	3,1 µg L <sup>-1</sup>	croissance	Yamashita et al. (2006)
Crustacé	<i>D. magna</i>	CE50-21 jrs	40 µg L <sup>-1</sup>	reproduction	Yamashita et al. (2006)
		LOEC-21 jrs	6,3 µg L <sup>-1</sup>		
		NOEC-21 jrs	3,1 µg L <sup>-1</sup>		
	<i>B. calyciflorus</i>	CL50-24 h	35,46 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Isidori et al. (2005)
		CE50-48 h	12,21 mg L <sup>-1</sup>	croissance	
	<i>T. platyurus</i>	CL50-24 h	94,23 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Kim et al. (2009b)
	<i>T. platyurus</i>	CL50-24 h	33,64 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Isidori et al. (2005)
	<i>D. magna</i>	CE50-24 h	25,72 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Yamashita et al. (2006)
	<i>C. dubia</i>	CE50-24 h	18,66 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Yamashita et al. (2006)
		CE50-7 jrs	8,16 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Yamashita et al. (2006)
CL50-96 h		>100 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Kim et al. (2009b)	
Poisson	<i>O. latipes</i>	CL50-96 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Kim et al. (2009b)
<b>Erythromycine</b>					
Macrophyte	<i>L. minor</i>	CE50-7 jrs	5,62 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Pomati et al. (2004)
Crustacé	<i>T. platyurus</i>	CL50-24 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Kim et al. (2009b)
Poisson	<i>O. latipes</i>	CL50-96 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Kim et al. (2009b)
Rotifer	<i>B. calyciflorus</i>	CL50-24 h	27,53 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Isidori et al. (2005)
		CE50-48 h	0,94 mg L <sup>-1</sup>	croissance	
Crustacé	<i>T. platyurus</i>	CL50-24 h	17,68 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Isidori et al. (2005)
	<i>D. magna</i>	CE50-24 h	22,45 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	Isidori et al. (2005)
Algue	<i>C. dubia</i>	CE50-24 h	10,23 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	Isidori et al. (2005)
	<i>P. subcapitata</i>	CE50-7 jrs	0,22 mg L <sup>-1</sup>	croissance	
	<i>S. capricornutum</i>	CE50-72 h	0,020 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Isidori et al. (2005)
		CE50	0,0366 mg L <sup>-1</sup>		
	<i>C. vulgaris</i>	NOEC	0,0103 mg L <sup>-1</sup>		

Des recherches ont révélé l'impact potentiellement adverse de certains antifongiques azolés sur le système endocrinien des organismes aquatiques (Zarn et al., 2003 ; Ankley et al., 2005). Chez les poissons par exemple, le kétoconazole peut inhiber la synthèse des stéroïdes par les tissus de ces gonades (Monteiro et al, 2000; Villeneuve et al, 2007) et il diminue la production de testostérone (TS) et de 17  $\beta$ -œstradiol (E2) de ces ovaires (Villeneuve et al., 2007). Ce fongicide augmente la sensibilité de la truite *Gadus morhua* exposée à l'éthinylestradiol (EE2) *in vivo* (Hasselberg et al., 2008).

L'étude de Mascotti et al. (2008) a montré que les tests de toxicité aiguë du miconazole altère la survie du poisson *Poecilia reticulata*, cette molécule provoque 100 % de mortalité à 24 h et 48 h d'expositions et 20 % de mortalité à 96 h à des concentrations respectives de 20 ; 2 et 0,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La CL50 est obtenue pour cette substance à une concentration de 0,204  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Ponsoda et al., 1991) elle est loin à celle que nous trouvons dans les affluents et les effluents des stations d'épuration (Van De Steene et al., 2010).

### III.3. Toxicité des antibiotiques sur les organismes aquatiques.

Bien que les bactéries soient les cibles principales des antibiotiques, ces derniers peuvent entraîner des effets néfastes pour les algues, en particulier sur les organites comme les chloroplastes et les mitochondries, qui possèdent des similitudes avec les structures bactériennes (Vannini et al., 2011).

Des niveaux de concentrations provoquant des effets toxiques aigus et chroniques sont présentés dans le tableau 11.

Les études sur les effets toxiques des antibiotiques dans les milieux aquatiques ont montré que les algues vertes ne sont pas sensibles à un certain nombre d'antibiotiques. Par exemple, la CE50 (72 h) à *P. subcapitata* a été trouvé à 2,97  $\text{mg L}^{-1}$  pour la ciprofloxacine, de 7,8  $\text{mg L}^{-1}$  pour la sulfadiazine (Holtén-Lützhøft et al., 1999) et de 2,3  $\text{mg L}^{-1}$  pour la spiramycine (Halling-Sorenson, 2000). Les macrolides ont une toxicité importante envers cette espèce (tableau 11) à des concentrations de CE50-72 h respectives de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  et 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour l'érythromycine et la clarithromycine (Isidori et al., 2005). La concentration présentée par la clarithromycine est très proche à la concentration maximale détectée dans les affluents et des effluents de STEP (Lin et al, 2009) et il est possible qu'elle pourrait présenter un risque sur d'autres organismes dépendant de ces algues (crustacés, mollusques,...) comme nourriture. Ces dernières sont considérées comme l'apport d'alimentation pour les herbivores et des bactéries ainsi que comme messager chimique. Ces producteurs primaires pourraient même

**Tableau 11** : Données de toxicité aiguë et chronique de quelques antibiotiques sur les organismes aquatiques (suite).

<b>Sulfamethoxazole</b>					
Bactérie	<i>V. fischeri</i>	CE50-15 min	78,1 mg L <sup>-1</sup>	luminescence	Kim et al. (2007b)
		CE50-30 min	23,3 mg L <sup>-1</sup>		Isidori et al. (2005)
Algue	<i>P. subcapitata</i>	CE50 72 h	0,52 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Isidori et al. (2005)
	<i>S. capricornutum</i>	CE50	1,53 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Eguchi et al. (2004)
Cnidaire	<i>Hydra attenuata</i>	NOEC	0,614 mg L <sup>-1</sup>		
		LC50-96 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	morphologie	Quinn et al. (2008a)
		LOEC-96 h	10 mg L <sup>-1</sup>	morphologie	
Crustacé	<i>D. magna</i>	NOEC-96 h	5 mg L <sup>-1</sup>	morphologie	
		CE50-48 h	189,2 mg L <sup>-1</sup>	Immobilization	Kim et al. (2007b)
		CE50-96 h	177,3 mg L <sup>-1</sup>		
	<i>D. magna</i>	CE50-48 h	123,1 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	Park et Choi (2008)
	<i>M. macrocopa</i>	CE50-24 h	84,9 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	Park et Choi (2008)
		CE50-48 h	70,4 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	
	<i>C. dubia</i>	CE50-24 h	15,51 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Isidori et al. (2005)
		CE50-7 jrs	0,21 mg L <sup>-1</sup>		
CL50-24 h		26,27 mg L <sup>-1</sup>			
<i>B. calyciflorus</i>		CE50-48 h	9,63 mg L <sup>-1</sup>	croissance	
Poisson	<i>T. platyurus</i>	CL50-24 h	35,36 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	
	<i>O. latipes</i>	CL50-48 h	>750 mg L <sup>-1</sup>		Isidori et al. (2005)
<b>Sulfapyridine</b>					
Bactérie	<i>V. fischeri</i>	CE50-15 min	>1000 mg L <sup>-1</sup>		Kim et al. (2007b)
Cnidaire	<i>H. attenuata</i>	CL50-96 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	morphologie	Quinn et al. (2008a)
		CE50-96 h	21,61 mg L <sup>-1</sup>		
		LOEC-96 h	5 mg L <sup>-1</sup>		
		NOEC-96 h	1 mg L <sup>-1</sup>		
Crustacé	<i>D. magna</i>	LOEC-21 jrs	35 mg L <sup>-1</sup>	Reproduction	Park et Choi (2008)
	<i>D. magna</i>	CE50-48 h	149,3 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	Kim et al. (2007b)
		CE50-24 h	616,7 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	Park et Choi (2008)
Poisson	<i>M. macrocopa</i>	CE50-48 h	391,1 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	
	<i>O. latipes</i>	CL50-48 h	>500 mg L <sup>-1</sup>		Kim et al. (2007b)

causer un déséquilibre dans la chaîne trophique vu qu'ils jouent un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore à l'échelle de la planète.

Autres études menées par Eguchi et al. (2004) sur l'effet du mélange de la triméthoprine, le sulfaméthoxazole et la sulfadiazine sur les algues ont montré une augmentation considérable de l'inhibition de la croissance de l'algue *S. capricornutum*.

Les données de toxicité aiguë (tableau 11) montrent que les macrophytes, les rotifères, les crustacés et les poissons sont peu impactés par la clarithromycine, l'érythromycine, le sulfaméthoxazole et la sulfapyridine. La toxicité exprimée par les valeurs de CL50 ou CE50 pour ces organismes est comprise entre 1 et 1000 mg L<sup>-1</sup> pour ces molécules. *Daphnia magna* et *Cériodaphnia dubia* sont les seuls crustacés qui ont présenté une sensibilité vis-à-vis de la clarithromycine (40 µg L<sup>-1</sup>) et le sulfaméthoxazole (210 µg L<sup>-1</sup>).

Peu d'études écotoxicologiques sur la clarithromycine ont été publiées (Isidori et al., 2005; Yamashita et al., 2006; Harada et al., 2008; Yang et al., 2008; Kim et al., 2009b), à partir desquelles les données ont été utilisées pour établir des normes de qualité proposées pour l'évaluation des risques en milieu aquatique (Kase et al., 2011).

Selon Eguchi et al. (2004), le mélange de la triméthoprine, le sulfaméthoxazole et la sulfadiazine a considérablement augmenté l'inhibition de la croissance de l'algue *S. capricornutum*.

#### **III.4. Toxicité de quelques bêta-bloquants sur les organismes aquatiques.**

Un nombre limité de travaux ont été publiés sur les effets des bêta-bloquants sur des espèces environnementales.

De fortes différences dans la toxicité des différents bêta-bloquants ont été observées pour les organismes aquatiques (tableau 12). L'acébutolol, l'aténolol, le métoprolol et le propranolol ont des effets variables selon les espèces d'un même groupe taxonomique. Le propranolol est le seul à montrer une toxicité sur les algues. Cleuvers (2005) a suggéré que les différences dans les valeurs de CE50 dépendaient principalement des valeurs de Log K<sub>ow</sub>, ce qui explique la puissance des composés testés. Le propranolol est considéré comme le composé le plus toxique vu qu'il présente la valeur de Log K<sub>ow</sub> la plus élevée et une grande hydrophobie par rapport au métoprolol et à l'aténolol.

Chez les crustacés d'eau douce, *D. magna* et *C. dubia*, Huggett et al. (2002) ont obtenu pour le métoprolol des valeurs de la CL50 respectives de 63,9 et 8,8 mg L<sup>-1</sup>.

**Tableau 12** : Toxicité de quelques molécules de bêta-bloquants sur les organismes aquatiques.

Taxa	Espèces	Toxicité	Concentrations	Effets	References
<b>Acébutolol</b>					
Crustacé	<i>C. dubia</i>	CL50-48 h	90 mg L <sup>-1</sup>	mobilité	Garric et al. (2006)
Rotifères	<i>D. rerio</i>	LOEC-7 jrs	> 62,5 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Garric et al. (2006)
		NOEC-10 jrs	≥ 16 mg L <sup>-1</sup>	Mortalité embryonnaire et larvaire	
Poisson	<i>B. calyciflorus</i>	CE50	230 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Garric et al. (2006)
		LOEC-48 h	250 mg L <sup>-1</sup>		
		NOEC-7 jrs	62,5 mg L <sup>-1</sup>		
<b>Aténolol 29122-68-7</b>					
Cnidaire	<i>H. vulgaris</i>		>0,01mg L <sup>-1</sup>		Pascoe et al. (2003)
Crustacé	<i>D. magna</i>	CE5 -48 h	313 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	Cleuvers (2005)
	<i>T. platyurus</i>	CL50-24 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Kim et al. (2009b)
Poisson	<i>D. subspicatus</i>	CE50	620 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Cleuvers (2005)
	<i>O. latipes</i>	CL50-96 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Kim et al. (2009b)
	<i>P. promelas</i>	NOEC-28 jrs	3,2 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Winter et al. (2008)
		LOEC-28 jrs	10 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Winter et al. (2008)
		NOEC-21 jrs	10 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Winter et al. (2008)
	LOEC-21 jrs	>10 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Winter et al. (2008)	
<b>Métoprolol 83-43-2</b>					
Macrophyte	<i>L. minor</i>	CE50-7 jrs	>320 mgL <sup>-1</sup>	croissance	Cleuvers (2003)
Algue	<i>D. subspicatus</i>	CE50-48 h	7,3 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Cleuvers (2003)
Crustacé	<i>H. azteca</i>	CL50-48 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Huggett et al. (2002)
	<i>C. dudia</i>	CL50-48 h	8,8 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Huggett et al. (2002)
	<i>D. magna</i>	CL50-48 h	63,9 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Huggett et al. (2002)
	<i>D. magna</i>	CE50-48 h	>100 mg L <sup>-1</sup>	immobilisation	Cleuvers (2003)
	<i>D. magna</i>	CE50-48 h	438 mg L <sup>-1</sup>	immobilisation	Cleuvers (2005)
	<i>D. magna</i>	NOEC-9 jrs	6,15 mg L <sup>-1</sup>	biomasse	Dzialowski et al. (2006)
	<i>D. magna</i>	LOEC-9 jrs	12,5 mg L <sup>-1</sup>	biomasse	Dzialowski et al. (2006)
	<i>D. magna</i>	LOEC-9 jrs	6,15 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Dzialowski et al. (2006)
	<i>D. magna</i>	LOEC-9 jrs	3,2 mg L <sup>-1</sup>	Rythme cardiaque	Dzialowski et al. (2006)

**Tableau 12** : Toxicité de quelques molécules de bêta-bloquants sur les organismes aquatiques (suite).

<b>Propranolol 525-66-6</b>					
Macrophyte	<i>L. minor</i>	CE50	113 mg L <sup>-1</sup>	Biomasse	Cleuvers (2005)
		CE50-7 jrs	114 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Cleuvers (2003)
Algue	<i>S. leopolensis</i>	CE50-96 h	0,668 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Ferrari et al. (2004)
	<i>C. meneghiniana</i>	CE50-96 h	0,244 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Ferrari et al. (2004)
	<i>D. subspicatus</i>	CE50-72 h	5,8 mg L <sup>-1</sup>	croissance	Cleuvers (2003)
		CE50-48 h	0,7 mg L <sup>-1</sup>		Cleuvers (2005)
	<i>P. subcapitata</i>	CE50-72 h	0,77 mg L <sup>-1</sup>	Croissance	Liu et al. (2009)
		CE50-96 h	0,66 mg L <sup>-1</sup>		Yamamoto et al. (2007)
		NOEC-96 h	0,1 mg L <sup>-1</sup>		Yamamoto et al. (2007)
Crustacé	<i>B. calyciflorus</i>	NOEC-48 h	0,18 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Garric et al. (2006)
	<i>B. calyciflorus</i>	NOEC-7 jrs	9 µg L <sup>-1</sup>	reproduction	Ferrari et al. (2004)
	<i>H. azteca</i>	CL50-48 h	29,8 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Huggett et al. (2002)
	<i>H. azteca</i>	NOEC-27 jrs	0,001 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Huggett et al. (2002)
	<i>H. azteca</i>	LOEC -27 jrs	0,1 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Huggett et al. (2002)
	<i>B. calyciflorus</i>	/	0,18 mg L <sup>-1</sup>	/	Ferrari et al. (2003)
	<i>C. dudia</i>	CL50-48 h)	0,8 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Huggett et al. (2002)
	<i>C. dudia</i>	NOEC-7 jrs	0,125 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Huggett et al. (2002)
	<i>C. dudia</i>	LOEC-7 jrs	0,25 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Huggett et al. (2002)
	<i>C. dudia</i>	NOEC-7 jrs	0,009 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Ferrari et al. (2004)
	<i>D. magna</i>	CL50-48 h	1,6 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Huggett et al. (2002)
		CE50-48 h	7,7 mg L <sup>-1</sup>	immobilization	Cleuvers (2005)
		NOEC-9 jrs	0,22 mg L <sup>-1</sup>	biomasse	Dzialowski et al. (2006)
		LOEC-9 jrs	0,44 mg L <sup>-1</sup>	biomasse	Dzialowski et al. (2006)
		NOEC-9 jrs	0,055 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Dzialowski et al. (2006)
		LOEC-9 jrs	0,11 mg L <sup>-1</sup>	reproduction	Dzialowski et al. (2006)
		LOEC-9 jrs	0,055 mg L <sup>-1</sup>	rythme cardiaque	Dzialowski et al. (2006)

**Tableau 12 :** Toxicité de quelques molécules de bêta-bloquants sur les organismes aquatiques (suite).

Taxa	Espèces	Toxicité	Concentrations	Effets	References
<b>Propranolol 525-66-6</b>					
Poisson	<i>O. latipes</i>	CL50-48 h	24,3 mg L <sup>-1</sup>	mortalité	Huggett et al. (2002)
	<i>O. latipes</i>	CL50-96 h	11,4	mortalité	Kim et al. (2009b)
	<i>P. promelas</i>	CL50-48 h	1,42	mortalité	Stanley et al. (2006)
	<i>P. promelas</i>	CL50-48 h	1,69	mortalité	Stanley et al. (2006)
	<i>P. promelas</i>	CL50-48 h	1,21	mortalité	Stanley et al. (2006)
	<i>O. latipes</i>	CL50-96 h	9	mortalité	Yamamoto et al. (2007)
	<i>D. rerio</i>	NOEC-10 jrs	2	mortalité	Ferrari et al. (2004)
	<i>O. latipes</i>	NOEC-14 jrs	0,1	croissance	Huggett et al. (2002)
	<i>O. latipes</i>	NOEC-28 jrs	<0,0005	production d'œufs	Huggett et al. (2002)

Cependant, Cleuvers (2005) a obtenu une CL50 plus élevée (438 mg L<sup>-1</sup>). Cette molécule a également provoqué une accélération du rythme des battements du cœur à de faibles concentrations (2,67 mg L<sup>-1</sup>) chez cette espèce et une diminution de la fréquence des battements du cœur à des concentrations plus élevées (26,7 mg L<sup>-1</sup>) (Villegas-Navarro et al., 2003).

Le métoprolol induit une toxicité chronique non seulement sur le système cardiovasculaire mais également sur la reproduction. Cette dernière est affectée chez *H. azteca* et *C. dubia* à des NOECs respectives de 1 et 125 µg L<sup>-1</sup> (Huggett et al., 2002). Pour des concentrations de 1 µg L<sup>-1</sup> de métoprolol, les changements ultra structuraux (réduction des réserves de glycogène combinées avec l'apparition de matière formant la membrane au sein des cellules, en plus d'une formation de vésicules longues, dilatées et dans des orientations irrégulières) dans le foie et les reins ont été observés et aussi dans les branchies si la concentration est élevée à plus de 20 µg L<sup>-1</sup> (Triebkorn et al., 2007).

La reproduction de *Hyalella azteca* est aussi affectée après 27 jours d'exposition au propranolol à 100 µg L<sup>-1</sup> (Huggett et al., 2002). La LOEC du propranolol pour les crustacés et les poissons sont proches des valeurs maximales trouvées dans les effluents hospitaliers à 6,5 µg L<sup>-1</sup> (Gómez et al., 2006). Nous observons également une différente toxicité entre le propranolol et l'acébutalol avec des NOEC respectives sur la reproduction de *B. calyciflorus* de 0,18 et 125 mg L<sup>-1</sup> (Garric et al., 2006), et des NOEC (7 jours de reproduction) de 9 µg L<sup>-1</sup> pour le propranolol (Ferrari et al., 2004) et de 62,5 mg L<sup>-1</sup> pour l'acébutolol (Garric et al., 2006).

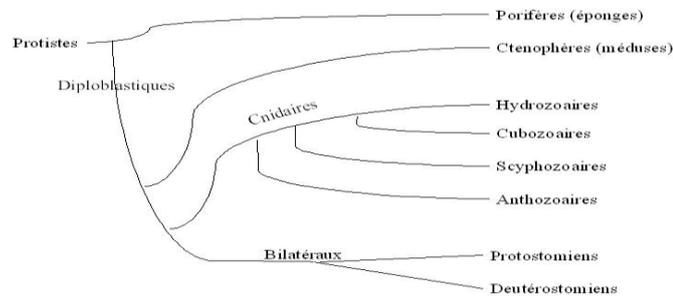
L'exposition chronique de *D. magna* à propranolol (9 jours) a entraîné une réduction significative de la fréquence cardiaque, de la fécondité et de la biomasse avec des valeurs de LOEC respectives de 55 ; 110 et 440 µg L<sup>-1</sup> (Dzialowski et al., 2006).

Des changements significatifs des taux de stéroïdes plasmatiques ont été observés chez le poisson *Oryzias latipes* après 14 jours d'exposition au propranolol. Huggett et al. (2002) ont rapporté que cette molécule inhibe de manière significative la production d'œufs de cette espèce à 1,0 et 0,5 µg L<sup>-1</sup> par rapport aux témoins, bien que cet effet n'ait pas été observé à des concentrations plus élevées.

#### IV. ASPECTS GÉNÉRAUX DE LA BIOLOGIE DE L'HYDRE.

Les hydres font partie du phylum des cnidaires, phylum qui, avec celui des cténophores, forme un groupe frère de celui des bilatériens (Philippe et al., 2009 ; figure 7).

Elles appartiennent à la classe des hydrozoaires et de l'ordre de hydroïdes. Ces Métazoaires diploblastiques acéломates sont des organismes aquatiques, marins pour la plupart, carnivores, à symétrie radiaire, caractérisés par des cellules urticantes (Galliot et Schmid, 2002).



**Figure 7.** Position et diversification du phylum des cnidaires.

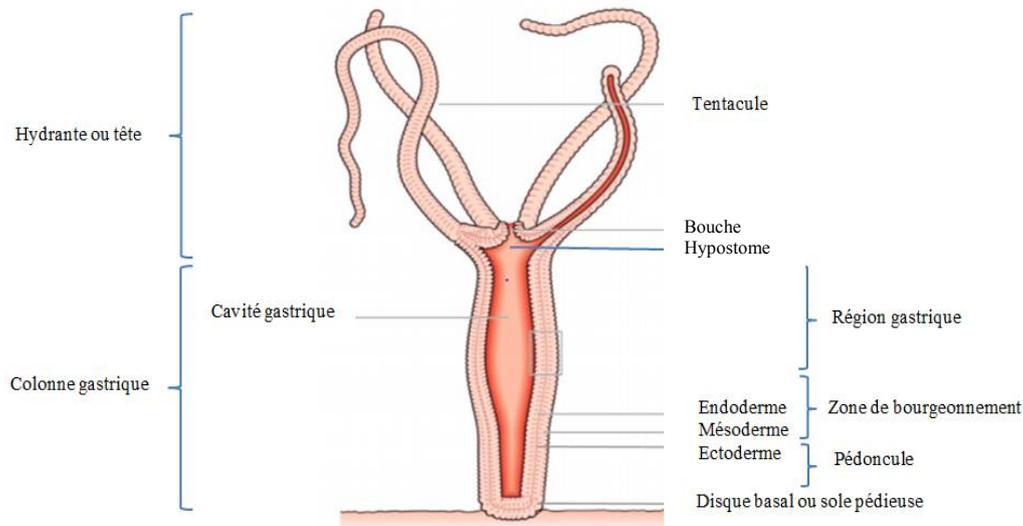
*Hydra attenuata* est une espèce dulcicole, peuplant les eaux lenticules peu profondes, peu ou pas polluées (Beach et Pascoe, 1998) avec distribution cosmopolite (Trembley, 1744) c'est-à-dire dans le monde entier à l'exception des régions froides (Shostak, 2002).

Cette espèce vie en polypes solitaires ayant secondairement perdu la phase méduse. Ces polypes possèdent une forme cylindrique portant une extrémité basale qui permet la fixation de l'animal au substrat et une extrémité apicale constituée d'une bouche entourée de tentacule. Ils produisent du mucus pour nettoyer leur surface des particules qui sédimentent.

#### **IV.1. Morphologie.**

L'hydre est un animal de petite taille (de 5 à 10 mm de long et de 0,3 à 1 mm de large). Elle a la forme d'un tube creux attaché au substrat par un pied terminé par un disque adhésif composé de cellules ectodermiques sécrétant du mucus et permettant à l'animal de s'attacher au substrat.

La tête est composée de deux parties : l'hypostome, un orifice par lequel la nourriture pénètre dans la cavité gastrique et qui sert aussi à expulser le matériel non digestible. L'hypostome sert à la fois de bouche et d'anus, il est entouré par une couronne de 5 à 7 tentacules (figure 8).



**Figure 8.** Morphologie d'une hydre d'eau douce (Wenger et al. 2014).

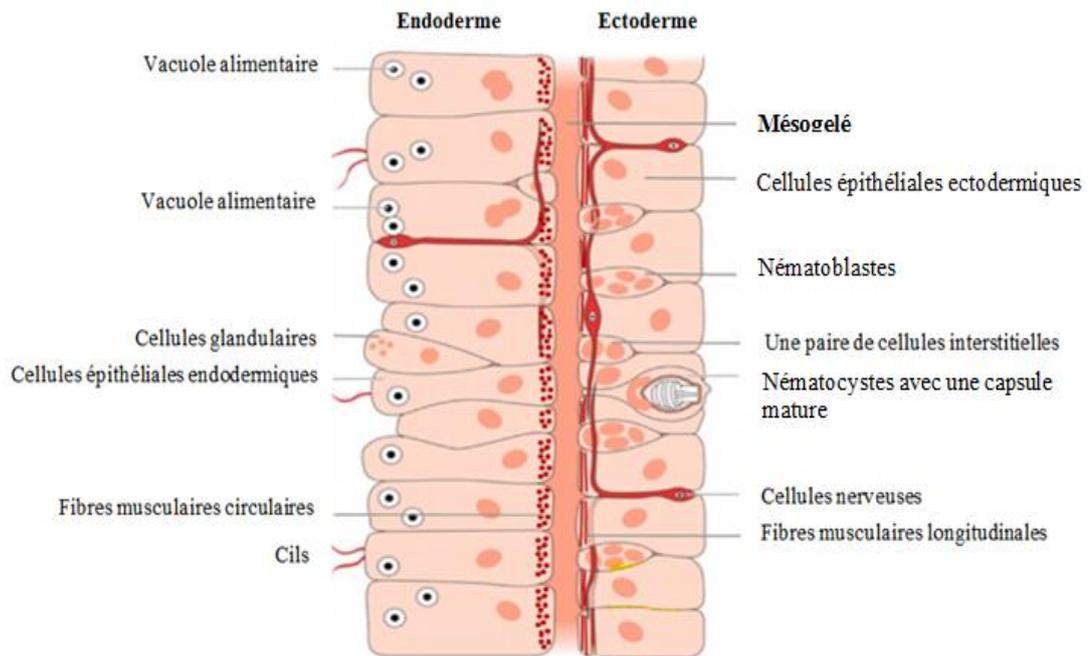
Les hydres ont un squelette hydrostatique qui leur permet de changer la forme de leur corps ou de bouger leurs tentacules. Lorsque la bouche est fermée, la cavité gastrovasculaire remplie de liquide permet à l'organisme d'avoir la rigidité requise.

#### IV.2. Histologie.

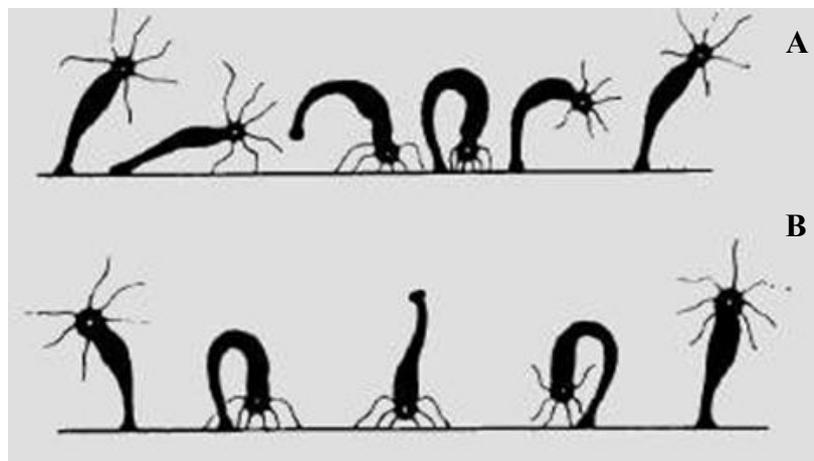
La cavité gastrique centrale constituée de deux lignées épithéliales : l'endoderme qui contient des cellules digestives et musculaires et l'ectoderme qui contient des cellules épithélio-musculaires (figure 9). Ces deux types cellulaires comportent une couche unicellulaire (Bode, 1996) qui secrète la mésogelée. Le tissu est spécialisé à l'extrémité apicale pour former les différentes parties de la tête et à l'extrémité basale pour former la sole pédieuse.

Les cellules interstitielles forment la troisième lignée, situées principalement dans l'ectoderme où elles sont réparties de façon homogène dans toute la région gastrique alors qu'on les retrouve en très peu de nombre dans le disque basale et l'hypostome (David et Plotnick, 1980). Ces dernières sont des cellules souches multipotentes qui forment après leur différenciation des cellules sécrétrices, nerveuses, des nématocystes et des gamètes (David et Murphy, 1977; Bosch et David, 1987 ; Hager et Davide, 1997 ; Steele, 2002).

Les cellules sécrétrices sécrètent des enzymes digestives (très similaires à nos cellules pancréatiques exocrines) (Galliot, 2010) et phagocytent les aliments ingérés par les hydres.



**Figure 9.** Coupe longitudinale d'une paroi d'hydre d'eau douce (Wenger et al. 2014).



**Figure 10.** Locomotion de l'hydre d'eau douce. A : déplacement par arpentage. B : déplacement par culbute. <http://baladesnaturalistes.hautetfort.com/archive/2009/10/05/les-cnidaire-d-eau-douce.html>

Les cellules du réseau neuronal (figure 9) combinent des fonctions sensorielles et motrices de l'hydre (Shimizu, 2002).

Les nématocystes sont équipés d'un cil sensoriel (cnidocil) mais également d'une capsule venimeuse (nematocystes). Quand la proie touche le cnidocil, cela provoque une réaction qui va elle-même provoquer une pression sur la capsule du cnidoblaste. Le filament urticant se retourne brusquement, les épines transpercent la proie et le filament injecte le liquide urticant. Il existe quatre types de nématocystes, chacun d'eux a un rôle différent (Ewer, 1947 ; Sher et Zlotkin, 2009) :

Les sténotèles et les desmonèmes participent à la capture des proies (le desmonème emmêlant la proie et le sténotèle injecte le venin et il la paralyse), les holotrichous isorhiza sont utilisés pour la défense de l'hydre contre les prédateurs. Ils sont répartis sur tout le corps de l'hydre (Klug et al, 1989 ; Sher et Zlotkin, 2009). Enfin, un quatrième type de nématocyste, l'atrishousisorhiza, est utilisé pour la locomotion des tentacules d'ancrage de l'hydre au substrat lorsque l'animal se déplace d'un endroit à l'autre en faisant une boucle ou culbute (Ewer, 1947 ; Sher et Zlotkin, 2009).

### **IV.3. Alimentation.**

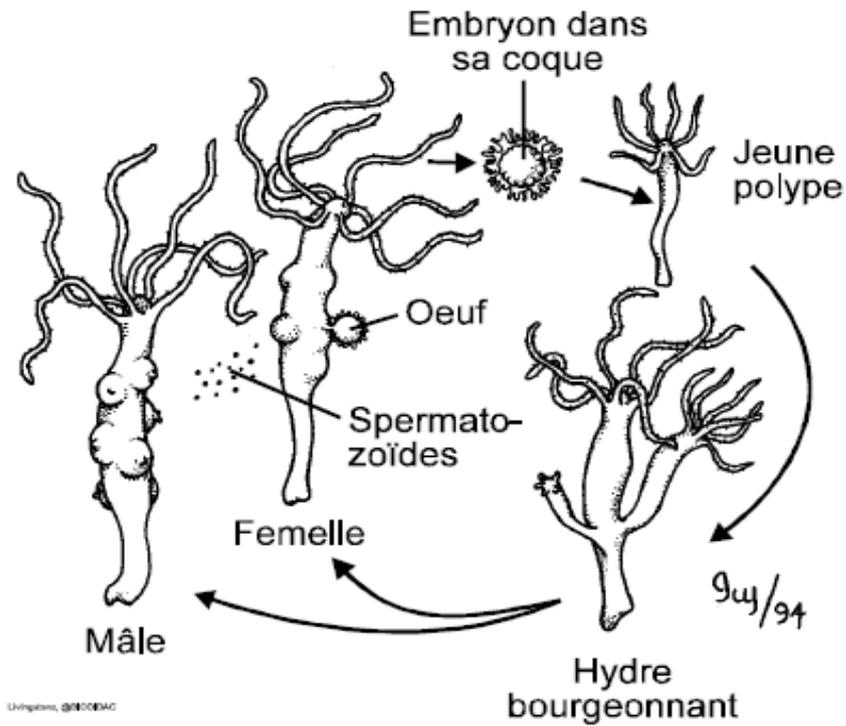
Les hydres sont des carnivores, elles se nourrissent d'une variété d'organismes tels que les micro crustacés, annélides et les larves de poissons, et ont donc un rôle important dans les réseaux trophiques aquatiques (Schwartz et al., 1983; Elliott et al., 1997).

### **IV.4. Locomotion et mouvement.**

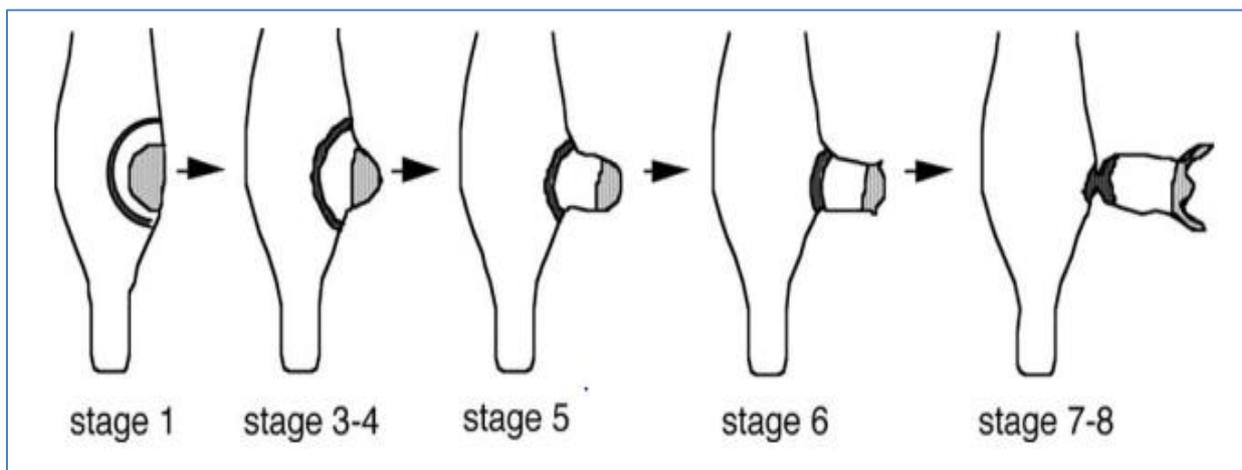
Un système neuromusculaire régit et assure les mouvements des hydres (Galliot et al., 2009) en rétractant leur corps en une boule et étalant leurs tentacules en position de chasse. Les déplacements se font par glissement sur la sole pédieuse par arpentage ou par culbute (figure 10), avec l'aide du mucus. L'hydre peut quitter son support et nager grâce à ses tentacules.

### **IV.4. Respiration.**

L'hydre ne possède pas de système respiratoire : chaque cellule prend l'oxygène sous forme de gaz dissous dans l'eau et rejette le gaz carbonique sous forme dissoute. La perméabilité de la membrane cellulaire aux gaz dissous autorise ces échanges par simple diffusion



**Figure 11.** Cycle de vie d'hydre d'eau douce (Houseman, Département de biologie, Université d'Ottawa). (<http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/labo%2FProtocoles%2Fcnidaria.pdf>).



**Figure 12.** Schéma de développement des bourgeons d'hydre (Fabila et al., 2002). Les étapes sont numérotées comme décrit par Otto et Campbell (1977).

#### IV.5. Reproduction.

- Reproduction sexuée.

On observe une reproduction sexuée des hydres lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables pour les organismes (baisse de la température, manque de nourriture) généralement en automne et en hiver ou bien en période de jeûne. (Kuznetsov et al., 2001).

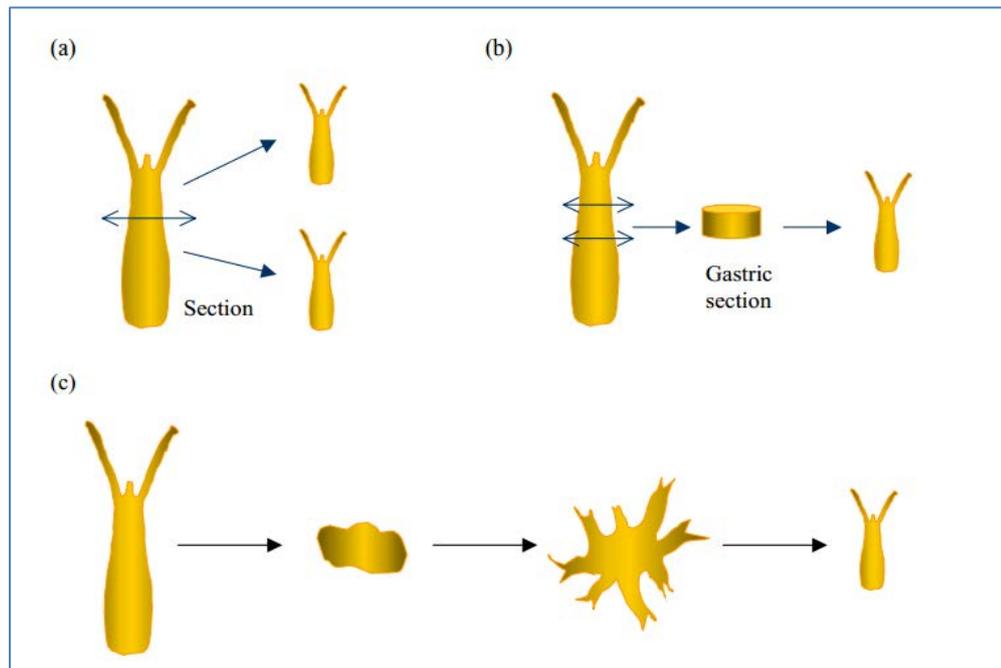
Les gamètes se développent à partir des cellules souches interstitielles situées dans l'ectoderme qui se différencient au sein des gonades. Les ovaires sont généralement placés près de l'extrémité aborale et ont une forme arrondie, tandis que les testicules ont la forme de cônes avec de petits mamelons (figure 11). L'œuf produit attendra d'être fécondé par la libération de spermatozoïdes contenus dans la paroi testiculaire d'un autre individu. L'œuf fécondé se développera sur le pied mère, puis l'embryon s'entourera d'une cuticule (gaine gélatineuse) épaisse qui le protégera et lui permettra de survivre jusqu'au moment où les conditions deviendront favorables, alors que les polypes vont mourir après l'avoir produit (Galliot, 2010). Cet embryon deviendra ensuite une hydre (voir figure 11).

La plus part des hydres sont gonochoriques, sauf pour l'hydre verte *Hydra viridissima* qui est hermaphrodite et possède les deux organes reproducteurs au sein du même individu.

- Reproduction asexuée.

L'hydre se reproduit principalement de façon asexuée par bourgeonnement, lorsque les conditions sont favorables et la nourriture abondante. Des nodosités apparaissent sur le tronc de l'hydre et forment de nouveaux individus. Par ailleurs l'amputation de sa colonne corporelle à n'importe quel niveau induit un processus de régénération.

La formation initiale d'un bourgeon se produit dans la zone de bourgeonnement. Elle commence par l'apparition d'une placode circulaire dans cette zone, qui s'allonge en protrusion cylindrique (figure 12). Depuis le stade 1, il est possible d'identifier les tissus qui formeront la tête (gris clair dans le centre du nouveau bourgeon), la colonne de corps et le pied (cercle gris foncé). Le tissu du bourgeon provient principalement de tissu parental jusqu'à son développement. Par la suite, la tête se forme à l'extrémité distale de la protrusion, comme indiquée par l'apparition de tentacules et de l'hypostome. Par la suite, il se forme un pied à l'extrémité distale.



**Figure 13.** Différents types de régénération chez *Hydra attenuata*. Régénération après (a) amputation, (b) section gastrique, (c) réagrégation des cellules d'hydre dissociées (d'après Berking, 1997).

Il faut environ deux jours et demi pour qu'un bourgeon se détache du pied mère (Shostak, 1979) et se développe en un adulte en 4 à 6 jours. Cette forme de reproduction est la plus fréquemment observée dans les conditions de laboratoire.

L'aptitude de l'hydre à la multiplication asexuée par bourgeonnement conduit à la production de nouveaux individus avec une très faible variation génétique (clone) ce qui minimise les variations morphologiques, la croissance du corps est équilibrée par la perte des cellules à travers l'exportation de tissus aux bourgeons en développement (Campbell, 1967a, b). Plus l'individu se nourrit plus le taux de bourgeonnement augmente. La taille de l'hydre reste toujours constante, elle règle son taux de bourgeonnement plutôt que d'ajuster sa taille (Shostak, 1993), par l'exportation des nématocytes aux tentacules, et par la mort des cellules à l'extrémité des tentacules et dans le disque basal (Campbell, 1967a, b).

Ces cellules interstitielles indifférenciées se distribuent uniformément le long de la colonne gastrique, mais sont absentes au niveau de la tête et du pied (Sugiyama, 1994;

Teragawa et Bode, 1995). Elles assurent l'abondance des nématoblastes, une fois différenciées en nématocytes elles migrent vers les tentacules.

Takaku et al. (2011) ont démontré que la formation de réseaux de microtubules se produit longitudinalement du long de l'axe du corps hydre dans des cellules de forme allongée et perpendiculaire à l'axe dans les cellules les plus courtes. Ils ont également suggéré que ces microtubules étaient impliqués dans la régulation de la longueur de la colonne gastrique de l'hydre en modifiant la forme des cellules épithéliales.

#### **IV.6. Régénération.**

L'hydre a une possibilité de développement complet persistant à tout moment de la vie de l'animal. Sa régénération se fait par un processus de morphallaxie, c'est à dire qu'il se produit par un mécanisme qui ne nécessite pas la prolifération et la croissance (Cummins et Bode, 1984).

Les hydres peuvent être complètement dissociées à l'état de simple cellules puis être ensuite capables de se reformer à l'état d'un animal complet (Noda, 1971 ; Gierer et al., 1972). Quand un certain nombre de ces cellules sont centrifugés ensemble, elles forment des agrégats (figure 13 c) à partir desquelles les têtes, et les pieds apparaissent au cours de quelques jours. Il suffit de 150 à 300 cellules épithéliales pour qu'une hydre puisse se régénérer (Bode et Bode, 1980, 1984a ; Bode et al., 1988 ; Shimizu et al., 1993). En dessous de cette quantité de cellules, la régénération n'a pas lieu (Bode et Bode, 1980).

L'amputation de sa colonne gastrique à n'importe quel niveau (figure 13 b) induit le processus de régénération, l'hydre régénère la partie manquante dans un temps qui varie entre 4 à 7 jours en fonction de la taille initiale (Bode et Bode, 1984b; Shimizu et al., 1993). Chaque régénération est précédée par une cicatrisation des tissus lésés. Cette dernière est achevée à la 6<sup>ième</sup> heure. L'organogénèse débute dès la 48<sup>ième</sup> heure.

Une réponse immunitaire complexe de blessure (amputation ou dissection gastrique) est liée à la cicatrisation et la régénération de l'hydre. Cette réponse se manifeste par étirage des cellules épithéliales pour la fermeture de la plaie, la migration des cellules interstitiels vers la plaie, la mort cellulaire, la phagocytose des débris cellulaires, ou de la reconstruction de la matrice extracellulaire (Wenger et al., 2014). Les cellules épithéliales produisent la laminine et le collagène sur-sécrété dans l'espace inter-épithéliale pour réformer la lame basale (Sarras, 2012). Cette dégradation et la reconstruction de la mésogelée sont associées aux métalloprotéinases de la matrice, qui sont hautement régulées après blessure, ce qui

contribue à la dégradation de la matrice extra cellulaire (ECM) mais également des procédés de mise en forme (Shimizu et al., 2002 ; Leontovich et al., 2000). Le processus apoptotique n'a pas d'incidence sur les cellules épithéliales (Chera et al., 2009 ; Reiter et al., 2012).

La régénération de la tête après décapitation est différente de la régénération après bissection (figure 13a) au niveau mi-gastrique (Technau et Holstein, 1995). Après décapitation, les tentacules apparaissent d'abord, suivis de l'hypostome, contrairement à la bissection de la colonne gastrique où la formation de hypostome précède la formation des tentacules.

La régénération du pied après bissection est différente de celle de la tête, il s'agit d'un processus proche de la réparation tissulaire incluant une phase de cicatrisation et une phase de différenciation des cellules du disque basal.

#### IV.6.1. Aspect génétique de la régénération.

Plusieurs gènes sont impliqués dans les processus physiologiques ou dans le développement des différents tissus d'hydre. Au niveau de la tête, différents gènes spécifiques exprimés dans le tissu de la région céphalique (cellules épithéliales de l'ectoderme des tentacules, endoderme de hypostome, ou des cellules interstitielles et les cellules de différenciation des nematocystes) sont impliqués dans la formation de la tête après décapitation ou au cours de la régénération. Parmi ces gènes se trouve le *Ks1* (Weinziger et al., 1994), *ras2* (Bosch et al., 1995), *Cngsc* (Broun et al., 1999), *Budhead* (Martinez et al., 1997), *prdl-a* et *prdl-b* (Gauchat et al., 1998), *HyAlx* (Smith et al., 2000), CREB (Galliot et al., 1995). Le gène *Cnox-2* empêche la formation de la tête, il est exprimé dans la partie basale du tissu, dans la colonne gastrique et très peu dans la tête (Shenk et al., 1993). D'autres gènes sont exprimés dans la partie basale de l'hydre et associés à la formation du pied comme *CnNK-2* (Martinez et al., 1997) qui est distribué selon un gradient le long de la colonne gastrique avec un maximum au niveau basal juste au-dessus du pied et qui diminue juste au-dessus de la zone de bourgeonnement (Grens et al., 1999). Il existe aussi des gènes qui sont spécifiques de la colonne gastrique et du bourgeon ou qui sont communs avec la colonne gastrique et le pied ou avec la tête, le pied et le bourgeon. Ces gènes montrent une expression contrôlée précisément durant le développement de l'hydre.

D'autres gènes impliqués dans la neurogenèse, ont été étudiés par Miljkovic-Licina et al. (2004). Leur expression dans des cellules nerveuses et/ou des cellules neurosensorielles, les cnidocytes de l'hydre (*prd*, *msh*, *COUP*, *Ash*, *TSP1*). De plus, une expression partagée par

les cellules nerveuses et les cnidocytes (*prbl-b* et COUP) suggère que ces deux types cellulaires dérivent d'un type cellulaire ancestral.

#### IV.7 Génétique de l'hydre.

##### IV.7.1. Taille du génome et nombre du chromosome.

La taille du génome de l'hydre diffère d'une espèce à l'autre. Selon Zacharias et al. (2004) *Hydra Oligactis* possède le plus grand génome de 1450 Mbp, suivie par *H. carnea* (1350 Mbp), *H. vulgaris* (1250 Mpb) et *H. circumcincta* (1150 Mbp). Le plus petit génome et celui de *H. viridissima*, il est de 380 Mbp. Ces auteurs ont rapporté que le nombre de chromosomes est identique à toutes les cinq espèces d'hydre ( $2n=30$ ) et que la taille des chromosomes est strictement corrélée à la taille du génome.

En 2010, le génome d'*Hydra magnipapillata* a été entièrement séquencé par Chapman et ses collaborateurs, ce qui en fait un modèle intéressant pour les études de biologie moléculaire.

L'analyse du transcriptome après la blessure de l'hydre induit à la modélisation de la transcription de 2636 gènes annotés comme gènes immunitaires de l'hydre, 43 gènes présentant une régulation immédiate dans tous les contextes de régénération examinés (Wenger et al., 2014). Ces régulations suggèrent une cytoprotection renforcée via le signalé ROS, *TNFR* et *TLR*, l'activité de protéasome, les protéines de stress et tous les régulateurs potentiels de l'activité de *NF-B*. D'autres gènes codant pour des protéines immunitaires tels que *NPYR4*, *GTPases*, *Swap70*, l'anti-proliférative *BTG1*, les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (5-lipoxygénase, *ACSF4*) et les facteurs coagulants sécrétés. Les peptidases sécrétées sont également régulateurs de l'impulsion lors de la bissection.

Le gène *FoxO* est impliqué de près ou de loin dans le système immunitaire de l'hydre. Plusieurs chercheurs ont rapporté que la désactivation de ce gène entraîne le vieillissement des hydres, phénomène alors accompagné d'un affaiblissement de son système immunitaire le rendant plus vulnérable aux maladies.

## IV.8. Neurologie

La nature synaptique des contacts entre les cellules nerveuses de cnidaires semble établie (Bullock et Horridge, 1965). Des synapses électriques (uniquement chez les Hydrozoaires) et des synapses chimiques ont été mises en évidence (Bullock et Horridge, 1965). Les synapses chimiques de cnidaires présentent des caractéristiques ultra structurales à l'exception de certaines synapses (bidirectionnelles) qui présentent une accumulation des vésicules synaptiques sous les membranes des deux cellules en contact (les deux cellules sont émettrices et réceptrices). Ce type de synapse est qualifié de bidirectionnelle et elle présente la propriété de permettre à l'influx de passer dans un sens comme dans l'autre (Anderson, 1985). Les Cnidaires sont donc dotés de deux types de synapses chimiques : les synapses unidirectionnelles et les synapses bidirectionnelles.

### IV.8.1. La neurogénèse chez les hydres.

Le système nerveux de l'hydre, constitué de différents neurones sensori-moteurs, de cellules ganglionnaires, de cellules mécanoreceptrices (cnidocytes), se différencie à partir des cellules souches interstitielles. Ces cellules sont distribuées le long de l'axe corporel parmi les cellules épithéliales de l'ectoderme et de l'endoderme. Leur densité est au moins six fois plus élevée dans la région de la tête que dans la colonne de corps (figure 14). Les nématocytes différenciés migrent ensuite vers les tentacules (Campbell et Marcum, 1980). Ces derniers contiennent des batteries de cellules et chaque batterie de cellule comprenant plusieurs nématocytes, eux-mêmes reliés à des neurones sensoriels par des synapses (figure 14).

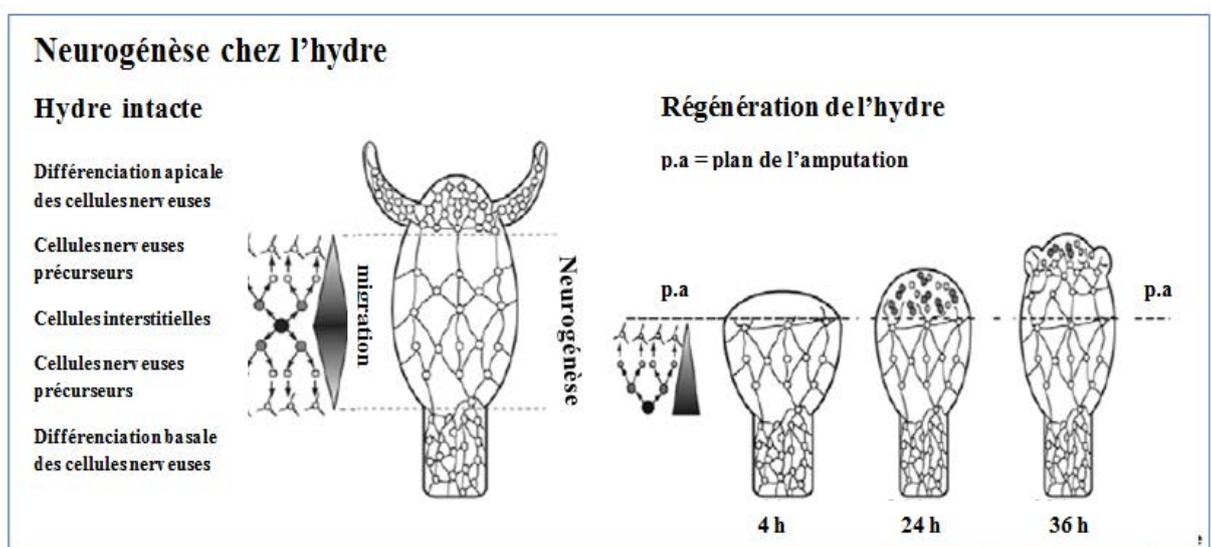


Figure 14. Vues schématiques de la neurognèse chez les hydres (Galliot et al., 2009).

Les nerfs coronaires sont considérés comme des formes annulaires du système nerveux central, impliqués dans la coordination des comportements (Grimmelikhuijzen et Westfall, 1995; Mackie, 2004; Garm et al, 2007; Koizumi, 2007).

#### IV.8.2. Neurotransmetteurs et neuromodulateurs chez l'hydre.

La recherche des neurotransmetteurs impliqués dans la transmission, a fait l'objet de plusieurs études. La présence d'acétylcholine, de glutamate, de GABA et de glycine (transmetteurs rapides), de catécholamine et sérotonine (transmetteurs lents) est établie ainsi que l'implication de neuropeptides dans la neurotransmission chez les cnidaires (Takeda et Svendsen, 1991, Grimmelikhuijzen et Westfall, 1995 ; Grimmelikhuijzen et al., 2002 ; Kass-Simon et Pierobon, 2007). D'après les travaux de Grimmelikhuijzen et Westfall (1995) chez les cnidaires, la transmission synaptique serait principalement peptidergique et les neurotransmetteurs constitués de petits peptides (Grimmelikhuijzen et Westfall, 1995). En plus de la transmission synaptique, il existerait une conduction nerveuse paracrine comme le suggère l'accumulation de vésicules au voisinage des membranes, loin des sites des contacts synaptiques.

Chez les hydrozoaires, les études de Takeda et Svendsen (1991) ont rapporté la présence de la sérotonine chez *Hydra magnipapillata* et démontré que sa distribution n'était pas équitable dans les différentes parties du corps : elle est plus concentrée dans la colonne gastrique que dans les tentacules et l'hypostome. Ce neurotransmetteur joue un rôle majeur dans la métamorphose des hydrozoaires *Phialidium gregarium* et *Eudendrium racemosum* (McCaulet, 1997 ; Zega et al., 2007). Il est conservé dans tous les phylums animaux mais les processus physiologiques régulés par ce neurotransmetteur peuvent différer d'une espèce à l'autre. D'autres neurotransmetteurs tels que l'épinéphrine, la norépinéphrine, La dopamine, la noradrenaline, le FMRFamide et le récepteur GABA<sub>B</sub> sont également trouvés chez *Hydra vulgaris* (Wood, 1963; Wood et Lentz, 1964; Wood et Barnett, 1965 ; Castano et Rossi, 1978 ; Carlberg, 1992 ; Concas et al., 1998; Pierobon et al., 1995).

Hanai et Kitajima (1984) Rapportent que la dopamine inhibe la réponse alimentaire chez *Hydra japonica* et que la durée de cette dernière est diminuée chez *Hydra vulgaris* par l'addition simultanée des agonistes dopaminergiques, apomorphine et l'amphétamine (Venturini et Carolei, 1992). Les transmetteurs d'acides aminés, le GABA, la glycine, le glutamate et ont également été impliqués dans la coordination de la réponse alimentaire induite par la GSH.

#### **IV.9. Immunologie.**

Le système immunitaire inné de l'hydre lui permet de survivre, se régénérer et de lutter contre les microbes, Son tissu est bien équipé pour empêcher les agents infectieux de pénétrer dans le corps, même en l'absence totale de cellules phagocytaires migratrices (Bosch et al., 2008 ; Miller et al 2007 ; Jung et al., 2008), il contient une activité anti-microbienne contre les bactéries Gram-négatif et Gram-positif, activité positivement corrélée à la présence de cellules nerveuses (Kashahara et Bosch, 2003). En effet les réponses immunitaires de l'hydre impliquent non seulement les cellules épithéliales qui se reposent sur une série de peptides antimicrobiens tels que Hydramacin (Jung et al., 2009), Arminins (Augustin et al., 2009 ; Franzenburg et al., 2013) ou Periculins (Fraune et al., 2010), mais aussi les cellules des glandes sont impliqués de manière critique dans la défense innée de l'hydre en produisant des inhibiteurs de sérine protéase (Bosch et al., 2008) de type Kazal, kazal2, qui ont une puissante activité in vitro dans bactéricide contre *Staphylococcus aureus* (Augustin et al., 2009).

Sa défense contre l'agent pathogène est basée sur la reconnaissance du récepteur médié par des motifs moléculaires des pathogènes associés, tels que la flagelline et LPS (Bosch et al., 2008). Lors de la liaison du ligand, le complexe HyTRR-1/2 HyLRR-récepteur (Bosch et al., 2008) est considéré comme initiateur un réseau de transduction du signal conservé (Miller et al 2007) qui active une réponse à multiples facettes de la défense.

#### **IV.10. Intérêt et utilisation de l'hydre en écotoxicologie.**

L'hydre est facilement cultivée et entretenue au laboratoire grâce à son pouvoir de régénération (asexué) qui conduit à un élevage d'individus génétiquement identiques. Les hydres sont utilisées en biologie de développement et en écotoxicologie dans le but d'étudier les facteurs moléculaires de la régénération, de la morphogenèse et de détecter le potentiel tératogène des polluants, notamment les effluents d'eau douce différentes (Blaise et Kusui, 1997; Pardos et al., 1999), les métaux lourds (Holdway et al., 2001; Karntanut et Pascoe, 2002), les composés oestrogéniques (Pascoe et al., 2002; Pachura-Bouchet et al., 2006) et les produits pharmaceutiques (Pascoe et al, 2003., Blaise et al., 2006, Quinn et al., 2008 a et b ).

#### IV.11. Effets toxiques de quelques produits pharmaceutiques testés sur l'hydre.

La toxicité aiguë de 10 composés pharmaceutiques testés sur la survie et la morphologie du cnidaire d'eau douce *Hydra attenuata* (tableau 13, Quinn et al., 2008a) montre que le gemfibrozil, l'ibuprofène et le naproxène avaient les valeurs les plus faibles de CL50. Ces effets toxiques se traduiront par des anomalies morphologiques touchant d'abord les tentacules et aboutissant au stade tulipe, qui est un stade léthal précédant la désintégration, pour les hydres adultes. Ces auteurs ont classé les substances pharmaceutiques, comme toxiques (gemfibrozil, l'ibuprofène et le naproxène), nuisibles (carbamazépine, le bézafibrate, sulfapyridine, oxytétracycline et novobiocine) et non-toxiques (sulfaméthoxazole, triméthoprime et la caféine), en utilisant la directive européenne 93/67/CEE.

Ces mêmes molécules ont été testées par Quinn et al. (2008b) sur les sections gastriques des hydres (embryons). Les résultats montrent des valeurs de CI50s respectives de 0,9 ; 3,84 ; 4,9 et 22,5 mg L<sup>-1</sup> pour le gemfibrozil, l'ibuprofène, le naproxène et le bézafibrate (tableau 13). L'indice de toxicité (IT) calculée est supérieur à 1, ce qui confère un potentiel tératogène à l'ensemble de ces molécules.

Les valeurs de CE50 basées sur la nutrition des hydres ont été similaires à ceux sur la base de la morphologie, mais avec une sensibilité accrue pour la carbamazépine, le bézafibrate et la novobiocine (tableau 13, Quinn et al., 2008a).

La sensibilité de l'hydre est équivalente à celle des autres invertébrés d'eau douce. En termes de toxicité aiguë, elle est très proche de celle de *Daphnia magna* pour la plupart des produits polluants chimiques testés (Castillo et al. (2000) ; Minguez et al. (2014)). Cependant elle est supérieure à celle des daphnies pour la majorité des substances pharmaceutiques indiquées dans le tableau ci-dessous, sauf pour la propranolol et la fluoxétine.

Les seuils de concentrations nécessaires pour obtenir ces effets létaux sont très élevés, de l'ordre du mg L<sup>-1</sup> et sont donc rarement observés dans les milieux naturels.

La toxicité aiguë (7 jours) de 10 médicaments : l'ibuprofène, le paracétamol, l'acide acétylsalicylique, l'amoxicilline, bendrofluméthiazide, le furosémide, l'aténolol, le diazépam, de la digoxine, l'amlodipine, n'affecte pas la survie des hydres à des concentrations inférieurs ou égales à 1 mg L<sup>-1</sup>. Cependant, des effets sur la régénération des sections gastriques du cnidaire *H. vulgaris* ont été observés pour le diazépam, la digoxine et l'amlodipine après 17 jours d'exposition pour une concentration de 10 µg L<sup>-1</sup> (Pascoe et al., 2003).

**Tableau 13.** Présentation de quelques valeurs de CL50 sur des organismes aquatiques.

Composés	Espèces cibles	Familles	Toxicités en mg L <sup>-1</sup>		Effets	Références
<b>Anti inflammatoires non stéroïdiens</b>						
<b>Acétylsalicylique</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	88,1	Immobilisation	Cleuvers (2004)
<b>Diclofénac</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	86	Immobilisation	Cleuvers (2003, 2004)
	<i>C. dubia</i>	Crustacé	CE50 48h	0,023	Immobilisation	Ferrari et al. (2003)
<b>Ibuprofène</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	108	Immobilisation	Cleuvers (2003)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	22,36	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	1,65	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	3,85	Alimentation	Quinn et al. (2008a)
<b>Naproxène</b>	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CI50 96h	3,84	Régénération	Quinn et al. (2008b)
	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	174	Immobilisation	Cleuvers (2003)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	22,36	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	2,62	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
<b>Paracétamol</b>	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	2,68	Alimentation	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	4,9	Régénération	Quinn et al. (2008b)
	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	30,1	Immobilisation	Kim et al. (2007b)
<b>Régulateurs du métabolisme lipidique.</b>						
<b>Acide clofibrrique</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	72	Immobilisation	Cleuvers (2003)
<b>Bézafibrate</b>	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	70,71	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	25,85	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	8,59	Alimentation	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CI50 96h	22,5	Régénération	Quinn et al. (2008b)
<b>Gemfibrozil</b>	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	22,36	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	1,18	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	1,76	Alimentation	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	0,9	Régénération	Quinn et al. (2008b)
	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	42,6	Immobilisation	Zurita et al. (2007b)

**Tableau 13.** Présentation de quelques valeurs de CL50 sur des organismes aquatiques (suite).

<b>Antibiotiques</b>						
<b>Ofloxacine</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	4,6	Immobilisation	Wollenberger et al. (2000)
<b>Sulfadiméthoxine</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	375,3	Immobilisation	Kim et al. (2007b)
<b>Sulfadiazine</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	221	Immobilisation	Yamashita et al. (2006)
<b>Sulfadiméthoxine</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	212	Immobilisation	De Liguoro et al. (2009)
<b>Sulfaméthazine</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	202	Immobilisation	De Liguoro et al. (2009)
<b>Sulfaméthoxazole</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	189,2	Immobilisation	Kim et al. (2007b)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	> 100	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
<b>Sulfapyridine</b>	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	> 100	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	21,61	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
<b>Sulfathiazole</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	149,3	Immobilisation	Kim et al. (2007a)
<b>Chlorotétracycline</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	225	Immobilisation	Park et Choi (2008)
<b>Oxytétracycline</b>	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	> 100	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	40,13	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	621,2	Immobilisation	Park et Choi (2008)
<b>Antiépileptiques</b>						
<b>Carbamazépine</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	> 100	Immobilisation	Cleuvers (2003) ; Kim et al. (2007b)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	29,4	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	15,52	Morphologie	Quinn et al. (2008a)
	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CE50 96h	3,76	Alimentation	Quinn et al. (2008a)
<b>B-Bloquant</b>						
<b>Aténolol</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	313	Immobilisation	Cleuvers (2005)
<b>Métoprolol</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CL50 48h	63,9	Mortalité	Huggett et al. (2002)
	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	438	Immobilisation	Cleuvers (2005)
<b>Propranolol</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	7,5	Immobilisation	Cleuvers (2003)

<i>D. magna</i>	Crustacé	CL50 48h	1,6	Mortalité	Huggett et al. (2002)
<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	32,5		Pachura et al. (2005)

**Tableau 13.** Présentation de quelques valeurs de CL50 sur des organismes aquatiques (suite).

<b>Antidépresseurs</b>						
<b>Citaloprame</b>	<i>C. dubia</i>	Crustacé	CE5048h	3,9	Survie	Henry et al. (2004)
				30,14	Immobilisation	Minguez et al. (2014)
<b>Fluoxétine</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CL50 48h	0,82	Survie	Brooks et al. (2003)
				5,91	Immobilisation	Minguez et al. (2014)
<b>Fluvoxamine</b>	<i>H. attenuata</i>	Cnidaire	CL50 96h	15		Pachurat et al. (2005)
	<i>C. dubia</i>	Crustacé	48h	0,51	Survie	Henry et al. (2004)
	<i>C. dubia</i>	Crustacé	CE50 48h	0,84	Survie	Henry et al. (2004)
<b>Paroxétine</b>	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	2,5	Immobilisation	Cunningham et al. (2004) ;
				6,24	Immobilisation	Minguez et al. (2014)
<b>Sertraline</b>	<i>C. dubia</i>	Crustacé	CE50 48h	0,58	Survie	Henry et al. (2004)
	<i>D. magna</i>	Crustacé	CE50 48h	1,3	Immobilisation	Minagh et al. (2009)
<b>Venlafaxine</b>	<i>C. dubia</i>	Crustacé	CE50 48h	1,15	Immobilisation	Minguez et al. (2014)
				0,12	Survie	Henry et al. (2004)
				141,3	Immobilisation	Minguez et al. (2014)

La seule étude de mélange des médicaments qui a été effectuée sur le cnidaire *H. attenuata* est celle de Quinn et al. (2009). Ces chercheurs ont testé la toxicité du mélange de 11 molécules médicamenteuse (ibuprofène, naproxène, gemfibrozil, bézafibrate, carbamazépine, sulfapyridine, oxytétracycline, novobiocine, triméthoprim, sulfaméthoxazole et caféine) à des concentrations environnementales et ils l'ont comparé avec leur étude précédente sur ces mêmes molécules testées individuellement (Quinn et al., 2008a), ils ont trouvé que ces produits pharmaceutiques agissent de manière additive dans un mélange, ayant des effets sub-létaux à des concentrations qu'on trouve dans l'environnement et que ces concentrations combinées sont toxique pour l'hydre et peuvent l'être pour d'autres organismes aquatiques.

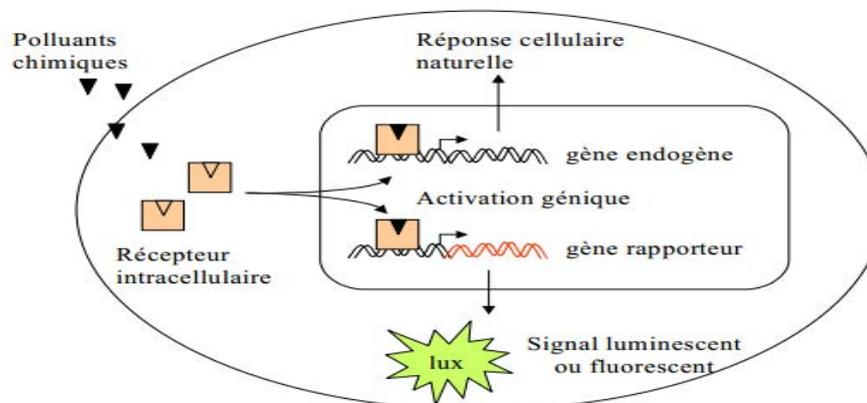
## V. MODELE D'ETUDE IN VITRO: LES CELLULES MDA-KB2

Une diversité de bioessais *in vitro* a ainsi été développée pour étudier les perturbateurs endocriniens PE. Un des mécanismes primaires importants qui initie leur toxicité réside dans leur capacité à se lier aux récepteurs des hormones stéroïdes (œstrogènes, androgènes) et à perturber la réponse cellulaire régulée par ces récepteurs.

Différents modèles cellulaires ont été rapportés dans la littérature et sont actuellement disponibles dans de nombreux laboratoires de recherche. La lignée cellulaire MDA-kb2 est dérivée de cellules de cancer du sein humain MDA-MB453 et transfectée de manière stable par le gène rapporteur de construction de luciférase (Wilson et al., 2002).

### V.1. Principe du test MDA-Kb2.

Au niveau cellulaire, les récepteurs des hormones stéroïdes (œstrogènes, androgènes) ont un rôle de facteur de transcription : une fois activé par liaison avec un ligand (ex : une substance chimique qui peut être l'hormone endogène ou un xénobiotique), ils migrent vers le noyau de la cellule où ils vont se fixer sur des séquences spécifiques de l'ADN et moduler l'expression de gènes cibles (Figure 15). Il est possible de déterminer spécifiquement l'activité *in vitro* de substances pharmaceutiques sur un récepteur donné à l'aide de modèles cellulaires ayant intégré de manière stable un gène rapporteur (luciférase dans le cas des cellules MDA-Kb2), régulé par ce récepteur et facilement mesurable en luminescence ou fluorescence (Figure 15). La réponse génique ainsi mesurée est dépendante de la concentration en ligand effecteur ; elle atteint un plateau lorsque tous les récepteurs intracellulaires sont saturés par les ligands.



**Figure 15.** Principe des tests cellulaires *in vitro* basés sur l'interaction ligand/récepteur au sein d'une cellule (INERIS, 2009).

## **V.2. Intérêt et utilisation de la lignée cellulaire MDA-Kb2.**

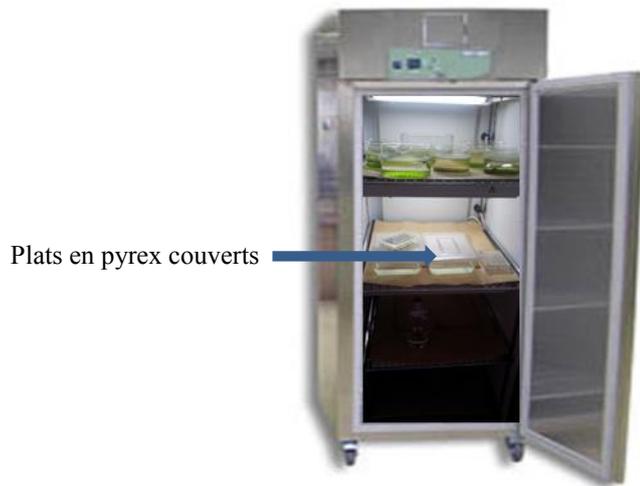
Dans cette étude, nous avons choisis de travailler sur une lignée cellulaire MDA-kb2. Ces cellules permettent de cribler des produits chimiques et pharmaceutiques, pas seulement pour les activités androgénique mais aussi pour les glucocorticoïdes. Ce test a plusieurs avantages (Wilson et al., 2002), (i) rapidité du test (24 h), (ii) réactivité stable pour plus de 80 passages, (iii) élimination de la nécessité pour la transfection, (iv) réalisation du test en microplaques de 96 puits et (v) production des résultats cohérents et reproductibles.

## **V.3. Effet anti-androgène des antifongiques azolés sur les cellules MDA-Kb2.**

Les fongicides azolés sont suspectés d'avoir une propriété de perturbation endocrinienne. Certains d'eux, comme le prochloraz, sont connus pour interagir avec des récepteurs nucléaires, comme par exemple le récepteur des androgènes AR (Andersen et al., 2002; Birkhoj et al., 2004). Autres azolés sont aussi décrit comme pouvant interagir avec d'autres récepteurs, comme le PXR, en tant qu'agoniste pour le propiconazole (Lemaire et al., 2004) ou antagoniste pour le kétoconazole (Ekins et al., 2007).

Récemment, Christen et al. (2014) ont analysé l'activité anti-androgène des fongicides azolés en tant que substances simples et dans des mélanges à l'aide des cellules MDA-Kb2. Ils ont constaté une forte activité anti-androgène pour la plupart des fongicides azolés étudiées. L'activité anti-androgène du propiconazole, d'éconazole et du vinclozoline était importante. Ces molécules inhibent plus de 50% de l'activité de la DHT. Ces auteurs montrent que tous les mélanges binaires qui comprends l'éconazole (Econazole-Tebuconazole ; Econazole-Propiconazole ; Econazole-Vinclozolin) ont un effet synergique. Cependant, le mélange ternaire composé d'époxyconazole, d'éconazole et de tebuconazole présente un effet additif pour les CE25 et synergique pour les CE50.

MATÉRIEL ET  
MÉTHODES



**Figure 16.** Maintien d'élevage des hydres dans l'enceinte thermostatée.

**Tableau 14.** Caractéristiques générales des substances qui composent le milieu hydre.

Substances (g.mole <sup>-1</sup> )	Formules	Masse moléculaire	N°CAS	Fournisseur
Chlorure de Calcium	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	147,02	233-140-8	Sigma
EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	292,20	60-00-4	Sigma
TES	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>6</sub> S	229,25	7365-44-8	Sigma

## **PARTIE I: ETUDE IN VIVO.**

### **I.PROTOCOLE D'ELEVAGE DES HYDRES.**

#### **I.1. Conditions de culture des hydres utilisées au laboratoire LIEC.**

Les hydres (*Hydra attenuata*) ont été maintenues et cultivées dans des plats en pyrex couverts (figure 16), d'une capacité de 1,5 L et contenant 0,5 L de milieu hydre (110 mg L<sup>-1</sup> TES [N-Tris (hydroxyméthyle) méthyl 1-2 acide aminoéthanesulfonique], 147 mg L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Chlorure de Calcium), 4 mg L<sup>-1</sup> EDTA [acide éthylènediaminetétraacétique]. Les différents sels sont dissous dans l'eau milli-Q et le pH du milieu est ajusté à 7,0 ± 0,1 avec une solution de soude (NaOH) à 1N. L'élevage a été maintenu à 20 ± 1°C, avec une photopériode de 16:8h (jour : nuit) à 800 lux, suivant la procédure adaptée de Trottier et al. (1997).

Le tableau 14 indique les caractéristiques générales des substances entrant dans la composition du milieu hydre.

#### **I.2. Protocole d'alimentation et de nettoyage des hydres.**

L'alimentation a un rôle primordial dans la sensibilité de l'hydre et dans la qualité et la quantité de bourgeons produits. C'est pourquoi un protocole strict doit être respecté. Les populations d'hydres sont nourries avec des nauplii d'artémies (*Artemia salina*) fraîchement éclos. Les nauplii sont obtenues à partir de kystes d'artémies (acheté chez Aquarium system, France) mis à éclore dans un milieu salin (préparé à une concentration en sel de mer (Océan instantané acheté chez Aquarium system, France) de 20 g L<sup>-1</sup> dans de l'eau distillée). La dissolution du sel de mer se fait sous agitation durant quelques minutes. Le milieu ainsi préparé peut être conservé trois à quatre semaines à température ambiante.

Le dispositif où l'on fait éclore les artémies (figure 17) est nettoyé à l'eau chaude après chaque utilisation pour prévenir la formation d'un biofilm, puis rincée à l'eau déminéralisée.



**Figure 17.** Dispositif utilisé pour faire éclore les artémies.

L'éclosion se déroule durant une période de 24h, sous une lampe de 40 watts, avec un bullage léger et continu et à une température de 25°C.

Après 24h les artémies sont décantées une première fois afin d'éliminer un maximum de kystes non éclos. Les artémies sont ensuite placées dans un tamis et rincées abondamment tout d'abord à l'eau du robinet, puis avec du milieu hydre. Le rinçage des artémies après éclosion est une étape importante car l'introduction de sel dans le milieu hydre serait létale pour celles-ci. Afin de décanter le reste des kystes non éclos, les artémies nageant dans le milieu hydre sont laissées quelques minutes sous une lampe (40w), les kystes tombent dans le fond du récipient alors que les artémies vivantes surnagent. Ce sont les artémies surnageant qui serviront à l'alimentation des hydres.

Pour les élevages, les hydres sont nourries deux fois par semaine (mardi et vendredi). Les artémies sont introduites dans le milieu hydre à l'aide d'une pipette Pasteur « *ad libitum* ». Après 4 h les hydres ont suffisamment consommé d'artémies, les ont digérées et régurgité les exosquelettes. Il convient alors de changer le milieu d'élevage afin de limiter toute décomposition des artémies non consommées.

Le nettoyage des hydres se fait en deux étapes :

- Après chaque repas les hydres sont décrochées de leur support avec la pulpe du doigt, en procédant très délicatement. Les organismes sont ensuite passés au travers d'un tamis (340 µm) afin de conserver les hydres et les bourgeons et d'éliminer les artémies et les exosquelettes. Les hydres sont ensuite rincées avec du milieu frais. Cette étape de rinçage doit être douce et rapide afin de ne pas endommager les hydres et d'éviter qu'elles ne restent à l'air libre trop longtemps.

(Les) 400 ml de milieu sont ensuite répartis dans un bac propre et les hydres sont transférées dans le bac par rinçage du tamis à l'aide de 100 ml de milieu hydre.

Les plats sont nettoyés à l'eau chaude et rincés à l'eau milli, puis séchés. Ils sont stérilisés régulièrement au four Pasteur à 170°C pendant 3 heures afin de prévenir tout risque de contamination. De même, qu'il est nécessaire de désinfecter régulièrement les ustensiles servant à la manipulation des hydres ou d'utiliser des ustensiles à usage unique (comme les pipettes Pasteur).

## **II. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX DES TESTS HYDRE SUR ADULTES ET EMBRYONS.**

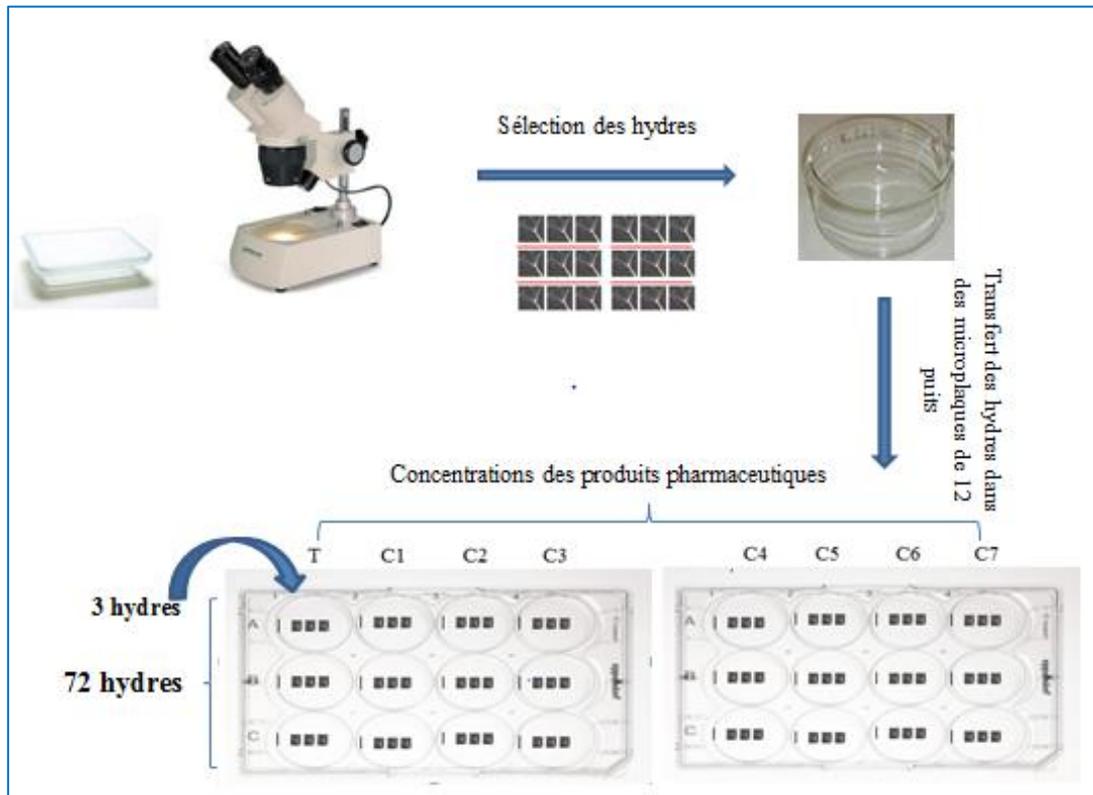
### **II.1. Organisme d'essai.**

Les hydres utilisées dans tous les tests de toxicité ont été sélectionnées 2 jours après les avoir nourries afin d'obtenir des lots tests homogènes comprenant des hydres de taille similaire.

### **II.2. Produits pharmaceutiques étudiés.**

Nous avons étudié dans le cadre du programme du projet ANR CES « Pharm@Ecotox », quatorze substances médicamenteuses, qui appartiennent à différentes classes thérapeutiques telles que : 1) les antidépresseurs (la clomipramine, la fluoxétine, la fluvoxamine, la paroxétine, la sertraline et la venlafaxine); 2) les antifongiques (l'amphotéricine B, l'éconazole, le kétoconazole et le miconazole); 3) les antibiotiques (clarithromycine); 4) les  $\beta$ -bloquants (l'acébutolol); 5) l'antiépileptiques (le gabapentine) et 6) les antihistaminiques (la cétirizine). Ces substances ont été sélectionnées par famille chimique parmi les molécules les plus représentatives des écosystèmes aquatiques, suite à l'analyse physicochimique réalisée par un laboratoire partenaire du projet ANR. Puis sur la base de leur forte écotoxicité sur les algues et les daphnies. En effet, étant donné la durée des tests chroniques et la nécessité d'un suivi quotidien des effets et des traits biologiques sur les hydres, seules les molécules les plus écotoxiques ont été retenues parmi les 15 à 20 molécules testées par famille thérapeutique. Les molécules choisies sont testées seules et en mélange, afin d'étudier la possibilité de phénomène de synergie, de potentialisation et d'antagonisme sur le modèle biologique étudié.

Ces molécules sont fournies par Sigma Aldrich (France) et dissoutes dans le DMSO. Seuls les antidépresseurs (à l'exception de la venlafaxine) et l'antiépileptique sont dissous



**Figure 18.** Schéma de réalisation d'un test aigu.

dans de l'eau. Les solutions mères sont diluées avec le milieu hydre et utilisées comme solutions pour les différents tests.

### **II.3. Toxicité aiguë.**

Dans cette étude nous avons utilisés une large gamme de concentrations (tableau 15) en se basant sur les résultats des essais d'écotoxicités aigus réalisés par un des partenaires du projet ANR sur les algues et les daphnies, dans le but de déterminer les différentes CE50 des différentes substances testées.

Les tests aigus ont été menés pour mettre en évidence des effets sur la survie et sur le développement des hydres.

**Tableau 15.** Concentrations des substances pharmaceutiques utilisées dans des tests aigus sur les hydres adultes et embryons.

<b>Composés</b>	<b>Concentrations des substances pharmaceutiques (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Antidépresseurs</b>	
Clomipramine, Fluoxétine, Fluvoxamine, Paroxétine, Sertraline.	0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 100 (adultes et embryons)
<b>Antifongiques</b>	
Amphotéricine B.	0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 2,5 ; 3 ; 4 ; 5 ; 10 (adultes et embryons)
Econazole	0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,4 (adulte) 0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,6 (embryon)
Kétoconazole	0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 10 (adultes et embryons)
Miconazole	0 ; 0,075 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 (adulte) 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 ; 0,6 (embryon)

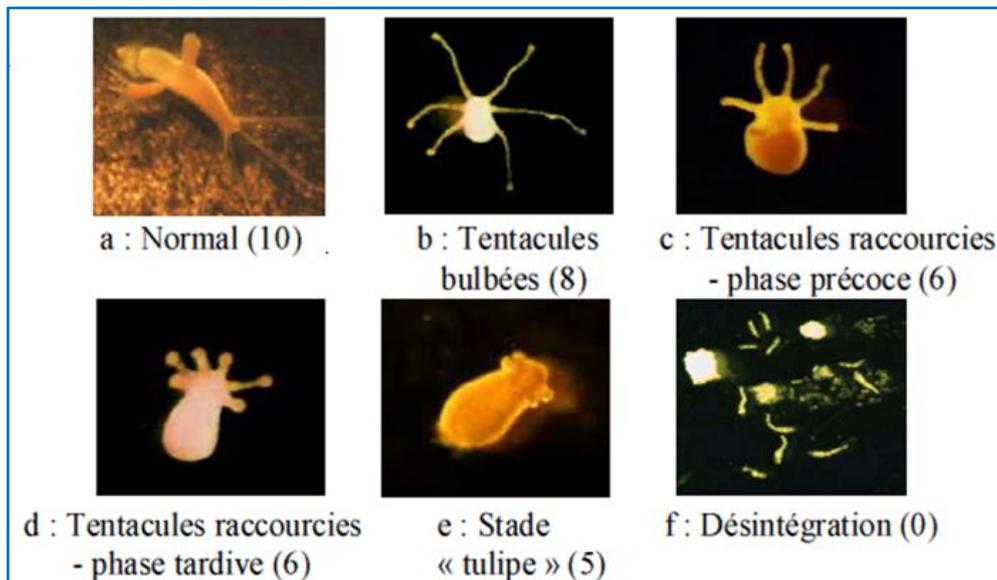
#### II.3.1. Effet sur la survie d'hydres adultes.

Nous avons utilisé des hydres sans bourgeons pour les tests aigus effectués sur les adultes dans le but de mesurer la survie des individus.

Trois hydres adultes non bourgeonnantes et de taille similaire ont été sélectionnées à l'aide d'une loupe binoculaire (x18) et placées dans chaque puits d'une microplaque de 12 puits (figure 18). Les expériences ont été réalisées en triplicat (Pachura-Bouchet et al., 2006).

**Tableau 16.** Classification de la toxicité des composés basée sur l'analyse de leur impact sur la morphologie de l'hydre (Wilby, 1988 ; Wilby et Tesh, 1990).

Score	Morphologie de l'hydre
10	Tentacules étendues, corps réactif
9	Partiellement contractée, faible réaction
8	Tentacules bulbées, corps faiblement contracté
7	Tentacules raccourcies, corps faiblement contracté
6	Tentacules et corps raccourcis
5	Totalement contractée, tentacules visibles = stade tulipe
4	Totalement contractée, pas de tentacules visibles
3	Etendue, tentacules visibles
2	Etendue, tentacules non visibles
1	Morte mais intacte
0	Désintégration

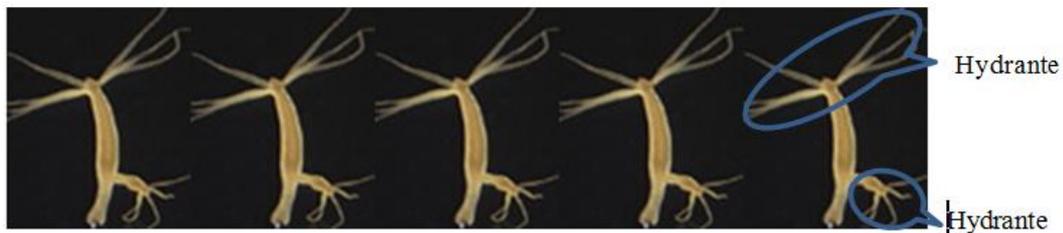


**Figure 19 :** Morphologies successives d'une hydre adulte placée dans un milieu toxique (d'après Wilby, 1988). Evolution des stades à partir d'un état normal (a ; score 10) jusqu'à la désintégration (f ; score 0), en passant par le stade tentacules bulbées (b ; score 8), tentacules raccourcies (c, d ; score 6) et « tulipe » (e ; score 5) (Pachurat et al., 2005).

Les hydres adultes sont restées à jeun pendant la période d'essai (96 h) et le milieu d'exposition n'a pas été renouvelé. Les hydres ont été observées sous loupe binoculaire toutes les 24 heures. Les modifications morphologiques ont été enregistrées et notées de 10 (normal) à 0 (désintégré) en utilisant la classification de Wilby(1988 ; tableau 16). Un score de 5 ou moins correspond à une létalité (Pachura-Bouchet et al., 2006 ; figure 19).

### II.3.2. Effets sur la survie des embryons

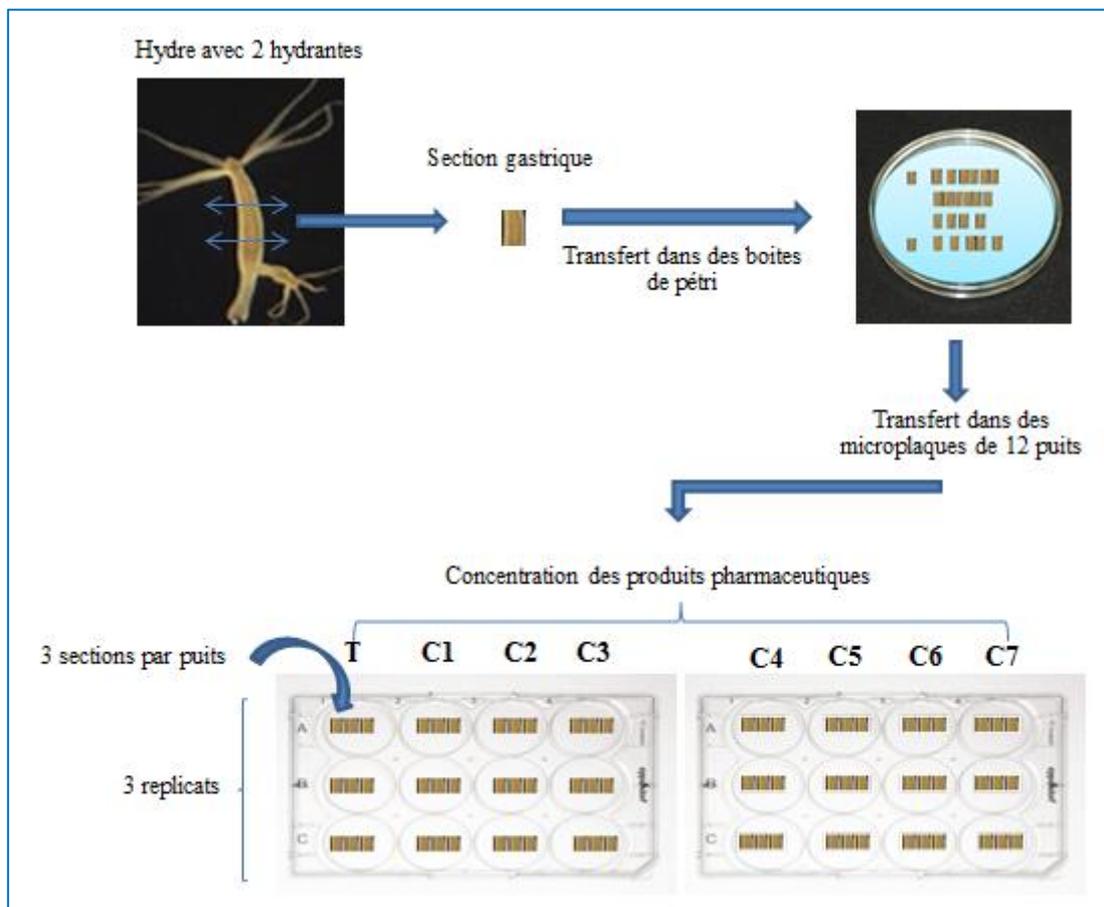
Dans ce test nous avons utilisé des hydres avec bourgeons (2 hydrantes) et de taille similaire afin d'obtenir des sections gastriques (tronçons) de même taille, le bourgeon aide à différencier le pédoncule du tube digestif de l'hydre (figure 21).



**Figure 20.** Vue de quelques hydres de taille similaire sélectionnées pour effectuer des sections gastriques.

L'obtention des sections gastriques se fait de la manière suivante : nous avons disséqué la partie située en dessous de l'hypostome et au-dessus du bourgeon (figure 20) à l'aide d'un scalpel. Ces sections gastriques ont été utilisées comme embryon car elles ne contiennent que des cellules indifférenciées (cellules souches multipotentes). Ces embryons ont été immédiatement transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu hydre. Trois sections gastriques de taille similaire sont ensuite placées dans chaque puits (3 mL) d'une microplaque de 12 puits (déjà décrites) et des triplicats ont été réalisés pour chaque concentration testée (figure 21).

Les embryons sont à jeun pendant la période d'essai de 96 heures. Chaque tronçon a ensuite été observé sous loupe binoculaire à 96h et le degré de régénération a été évalué selon la classification de Wilby (1988) (tableau 17) dans laquelle le score de 10 désigne la régénération complète d'une hydre avec la bouche, les scores 4-6 montrent la présence de tentacules et d'un pédoncule, tandis que le score 0 correspond à la désintégration de l'individu. La létalité correspond aux scores compris entre 5 et 0 (Pachura-Bouchet et al., 2006 ; figure 22).



**Figure 21.** Schéma démonstratif d'un test aigu conduit sur les embryons.

### II.3.3. Ratio A/D.

Le rapport A/D est un index de risque pour le développement le plus fréquemment utilisé (Setzer et Rogers, 1991) pour déterminer les relations quantitatives entre les niveaux toxiques d'exposition chez les embryons et les niveaux toxiques d'exposition chez les adultes. Il se calcule en divisant la CE50 obtenue chez les adultes par celle obtenue chez les embryons. Une valeur supérieure à 1 obtenue pour le rapport A/D met en évidence des effets sur le développement des hydres.

## **II.4. Toxicité chronique.**

### II.4.1. Toxicité chronique des substances testées seules.

Etant donné la durée des tests chroniques et le suivi quotidien des effets et des paramètres biologiques sur les hydres adultes et embryons, nous nous sommes concentrés sur neuf substances médicamenteuses, cinq de la famille des antidépresseurs et quatre de la famille des antifongiques.

Les concentrations testées ont été sélectionnées sur la base de CE50-96 h obtenues lors du test aigu. La plus forte concentration testée est celle qui correspond à la moitié de la valeur de CE50-96 h, puis une série de dilutions a été choisie à partir de cette valeur maximale. La gamme de concentration choisie est décrite dans le tableau 18, elle est supérieure aux concentrations environnementales, nous l'avons choisie pour déterminer les effets toxiques des médicaments sur l'hydre et la présence des malformations.

En ce qui concerne les autres molécules testées : la clarithromycine (antibiotique), l'acébutolol ( $\beta$ -bloquants), la gabapentine (antiépileptiques) et la cétirizine (antihistaminiques) nous les avons testées seules et en mélange à des concentrations environnementales retrouvées par un des partenaires du projet ANR et testées sur les algues et les daphnies.

a) Effets sur la morphologie, le nombre d'hydrantes et la capacité de nutrition.

Pour les essais de toxicité chronique, nous avons utilisé des hydres avec bourgeons dans le but de stimuler la reproduction des hydres et pouvoir ainsi mesurer le nombre d'hydrantes produites par chaque hydre et leur capacité à se détacher de l'hydre mère.

Neuf hydres de taille similaire ayant chacune 2 hydrantes ont été utilisées pour chaque condition. Elles ont été exposées individuellement dans chaque puits d'une microplaque de 24 puits contenant 2 mL de solution du test.

Cinq nauplii d'artémies nouvellement éclos ont été présentées à chaque hydre tous les jours durant les 10 jours du test. Le nombre d'artémies ingérées a été relevé dans les 2 heures

**Tableau 18.** Concentrations des substances pharmaceutiques utilisées dans les essais de toxicité chronique chez l'hydre.

Composés	Concentrations (mg L <sup>-1</sup> )	
	Adultes	Embryons
<b>Antidépresseurs</b>		
<b>Clomipramine</b>	0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5	0 ; 0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 1,25 ; 1,5
<b>Paroxétine</b>	0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2	0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2
<b>Fluoxétine.</b>	0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4	0 ; 0,28 ; 0,5625 ; 1,125 ; 2,25 ; 4,5
<b>Fluoxamine</b>	0 ; 0,5, 1, 5, 10, 50, 100	0 ; 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 15
<b>Sertraline</b>	0 ; 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75,1	0 ; 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1
<b>Venlafaxine</b>	0 ; C ; 0,000006	0 ; C ; 0,000006
<b>Antifongiques</b>		
<b>Amphotéricine B.</b>	0 ; C ; 0,14 ; 0,28 ; 0,56 ; 1,125 ; 2,25	0 ; C ; 0,14 ; 0,28 ; 0,56 ; 1,125
<b>Econazole</b>	0 ; C ; 0,016 ; 0,031 ; 0,625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5	0 ; C ; 0,0062 ; 0,0125 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2
<b>Kétoconazole</b>	0 ; C ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5	0 ; C ; 0,03 ; 0,06 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5
<b>Miconazole</b>	0 ; C ; 0,0125 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4	0 ; C ; 0,007 ; 0,014 ; 0,028 ; 0,056 ; 0,0112 ; 0,226
<b>β-bloquants</b>		
<b>Acébutolol</b>	0 ; C ; 0,000007	0 ; C ; 0,000007
<b>Antihistaminiques</b>		
<b>Cétirizine</b>	0 ; C ; 0,000025	0 ; C ; 0,000025
<b>Antibiotiques</b>		
<b>Clarithromycine</b>	0 ; C ; 0,000004	0 ; C ; 0,000004
<b>Antiépileptiques</b>		
<b>Gabapentine</b>	0 ; C ; 0,00005	0 ; C ; 0,00005

C : C'est le contrôle du DMSO à 0,3 % pour l'ensemble des molécules testées d'antifongiques ainsi que pour la venlafaxine et à 0,001 % pour les autres molécules testées

après nourrissage et les solutions du test ont été renouvelées après chaque période d'alimentation. Le nombre de nouvelles hydrantes produites a été noté et comptabilisé quotidiennement ainsi que les scores. A la fin du test le score de chaque hydre est noté.

Comme pour les essais de toxicité aiguë, les scores ont été attribués selon l'échelle de Wilby (1988) (tableau 16).

- b) Effets sur la régénération des embryons, le nombre d'hydrantes et la capacité de nutrition.

Neuf sections gastriques de taille similaire ont été préparées comme décrit précédemment pour chaque condition testée. Elles ont été transférées individuellement dans chaque puits d'une microplaque de 24 puits, contenant 2 mL de chaque concentration testée (figure 20). La durée d'essai était de 14 jours : les 4 premiers jours permettent de déterminer la capacité de ces tronçons à régénérer des adultes entiers. Les 10 jours d'exposition suivants permettent de suivre la capacité à se nourrir et à produire des hydrantes. Les conditions de nourrissage et de changement du milieu d'exposition ainsi que l'attribution des scores sont identiques à celles décrites pour les essais sur hydres adultes.

#### II.4.2. Toxicité chronique des substances testées en mélange.

- Effets sur le développement des hydres, régénération des embryons, nombre d'hydrantes, capacité de nutrition.

Pour les tests de toxicité chronique du mélange, nous avons utilisé les cinq molécules d'antidépresseurs citées dans le tableau suivant. X et Y représentent les plus fortes concentrations du mélange de molécules d'antidépresseurs testées ( $1/10^{\text{ième}}$  de la CE50-96 h), respectivement, sur les adultes et sur les embryons (tableau 19).

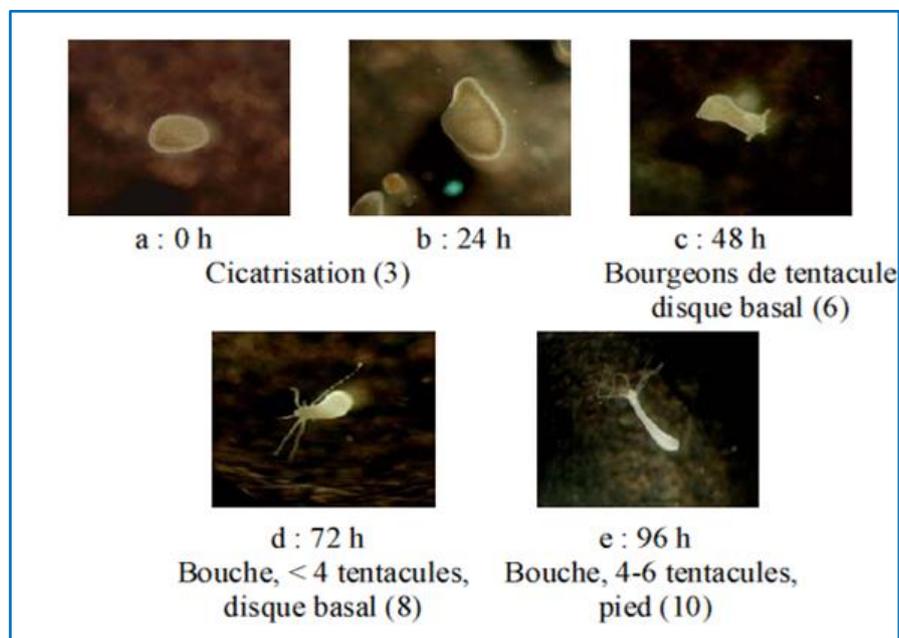
**Tableau 19.** Concentrations maximales du mélange d'antidépresseurs testées sur les adultes (A) et les embryons (D) et les différentes molécules qui le composent.

CE50/10 mg L <sup>-1</sup>	Clomipramine	Fluoxétine	Fluvoxamine	Paroxétine	Sertraline	Mélange
<b>Adultes (A)</b>	0,3	0,8	10	0,4	0,17	<b>X</b>
<b>Embryons (D)</b>	0,3	0,9	3	0,4	0,17	<b>Y</b>

X et Y = valeurs de la concentration maximale du mélange d'antidépresseurs testée respectivement sur les hydres adultes et embryons.

**Tableau 17.** Classification de la toxicité des composés sur la base de la régénération des embryons d'hydre (Wilby, 1988).

Score	Morphologie de l'embryon
10	Bouche, 4–6 tentacules et pédoncule
9	Bouche, 4–6 tentacules
8	Bouche, <4 tentacules et disque basal
7	Bouche, <4 tentacules
6	Bourgeons de tentacules et disque basal
5	Bourgeons de tentacules seulement
4	Disque basal seulement
3	Cicatrisation normale
2	Cicatrisation mais allongement
1	Extrémité ouverte, pas de cicatrisation ou mort
0	Désintégration



**Figure 22 :** Développement d'un embryon (section gastrique), de la cicatrisation (a ; score 3) jusqu'à la régénération complète d'une hydre adulte (e ; score 10) (Pachura-Bouchet et al., 2006).

Le mélange d'antifongiques est composé de l'amphotéricine B, l'éconazole, le kétoconazole et le miconazole. La plus forte concentration de ce mélange testé sur les adultes A et les embryons D est celle correspondant au 1/8 CE50-96h de chaque molécule testée (tableau 20). La concentration finale du DMSO présente dans le mélange est de 0,3 % (v:v) comme pour les substances testées individuellement.

**Tableau 20.** Concentrations maximales du mélange d'antifongiques testées sur des adultes (A) et les embryons (D) et les différentes molécules qui le composent.

CE50/8 mg L <sup>-1</sup>	Amphotéricine B	Econazole	Kétoconazole	Miconazole	Mélange
<b>Adultes (A)</b>	0,56625	0,1175	0,37625	0,105	<b>Z</b>
<b>Embryons (D)</b>	0,52	0,0475	0,13375	0,05625	<b>Q</b>

Z et Q = valeurs de la concentration maximale du mélange d'antifongiques testée respectivement sur les hydres adultes et embryons.

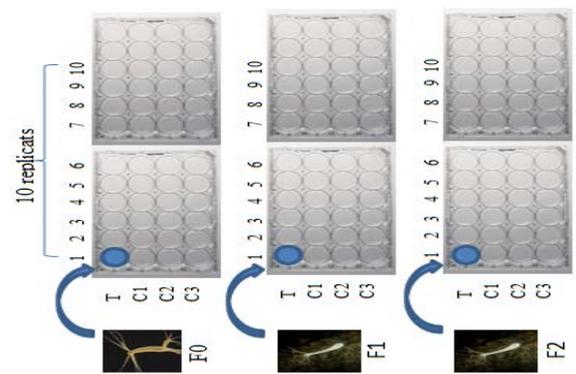
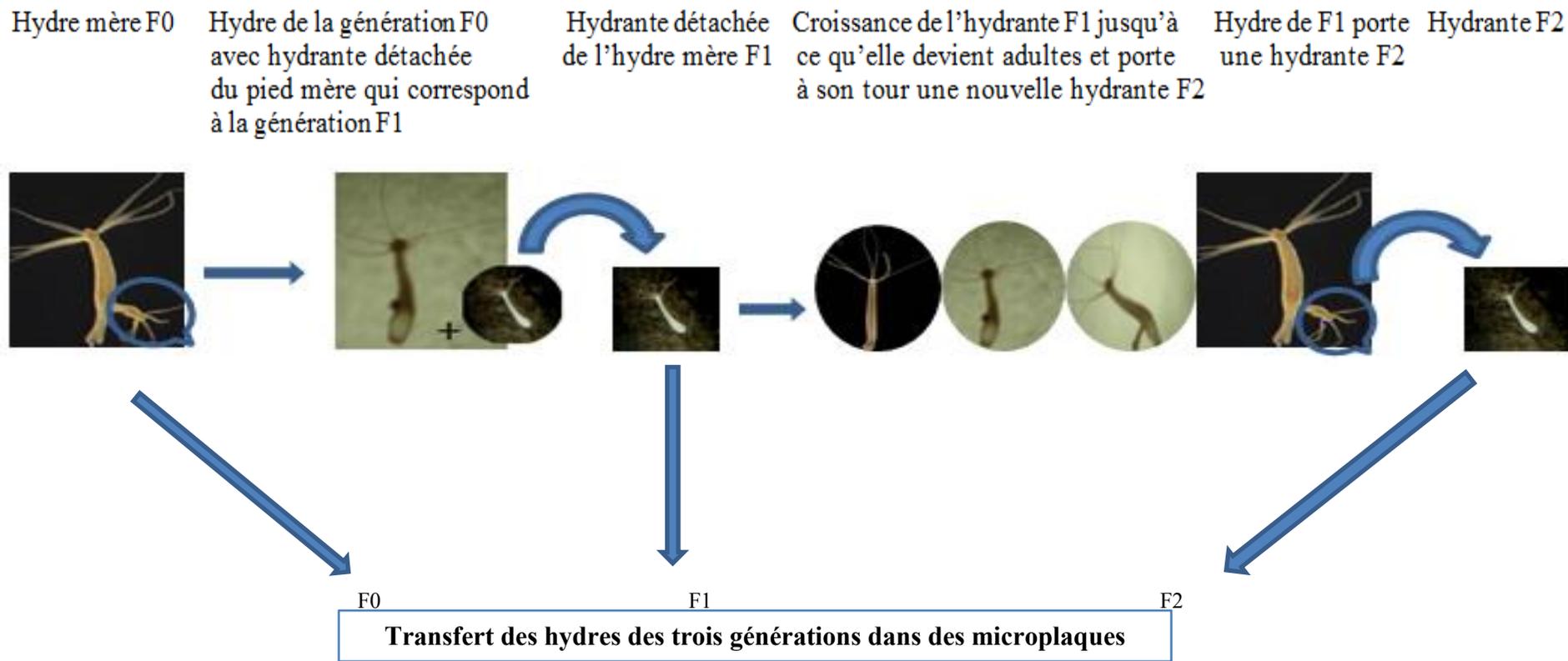
Finalement, les concentrations maximales des différents mélanges d'antidépresseurs et d'antifongiques testés sont diluées en 10 à chaque fois.

Un troisième mélange de molécules médicamenteuses nommé M a été testé à des concentrations environnementales. Ce mélange est constitué de 7 ng L<sup>-1</sup> d'acébutolol, 25 ng L<sup>-1</sup> de cétirizine, 4 ng L<sup>-1</sup> de clarithromycine, 50 ng L<sup>-1</sup> de gabapentine et 6 ng L<sup>-1</sup> de venlafaxine. La concentration finale du DMSO présente dans ce mélange est de 0,004 % (v:v). Nous avons choisi cette concentration car elle nous permet de dissoudre ces produits pharmaceutiques sans affecter la morphologie et la régénération des hydres, ainsi que de représenter ce qui se passe dans l'environnement. Andrae a mesuré 0,1 µg L<sup>-1</sup> et 0,5 µg L<sup>-1</sup> de DMSO ce qui représente 0,00091 et 0,00454 % respectivement dans l'eau de pluie océanique et l'eau de rivière aux États-Unis (Andrae 1980 a et b).

La période d'exposition des adultes et des embryons, les conditions d'exposition et les paramètres testés durant les tests sont similaires à ceux des tests chroniques présentés précédemment (effectués auparavant).

#### II.4.3. Toxicité chronique des antidépresseurs sur plusieurs générations d'hydres.

Le test chronique sur les trois générations (F0, F1 et F2) se déroule dans les mêmes conditions, en termes de température et de photopériode.



**Figure 23.** Toxicité chronique de la sertraline sur plusieurs générations d'hydres.

- Effet de la sertraline et du mélange d'antidépresseurs sur les hydres adultes F0.

Dans l'essai de toxicité chronique sur la première génération d'hydres, nommée F0, les organismes d'essai sont des hydres adultes (avec 2 hydrantes) de taille similaire. Nous avons utilisé le même protocole que celui mis en place pour les essais de toxicité chronique des antidépresseurs sur les hydres adultes et nous avons également gardé les mêmes concentrations de sertraline que celles utilisées dans les essais où cette molécule était testée seule et dans le mélange d'antidépresseurs.

- Effet des antidépresseurs sur les deux générations d'hydres F1 et F2.

➤ *Effet de la sertraline sur les deux générations d'hydres F1 et F2.*

Ce test permet de tester la sensibilité des hydres vis-vis de la sertraline au cours de plusieurs générations, pour cette raison nous avons étudié les mêmes paramètres biologiques sur les deux générations F1 et F2 afin de pouvoir comparer les résultats de ces trois tests.

Les hydrantes qui se sont détachées F1 sont exposées aux mêmes concentrations de sertraline que les adultes F0 exposés (figure 23). Ensuite chaque hydre de la deuxième génération F1 est nourrit quotidiennement avec cinq *Artemia nauplii* durant la période du test chronique (10 jours). Le nombre ingéré dans les 2 heures a été enregistré, les solutions de tests ont été renouvelées après chaque période d'alimentation et le nombre des nouvelles hydrantes produites a été comptabilisé quotidiennement. Ce test nous permet de constater si le nombre d'hydrantes ainsi que la capacité de nutrition augmentent ou sont réduits.

Quand des hydrantes se détachent de la génération F1 et correspondent donc à la génération F2 (figure 23), nous les plaçons de nouveau dans du milieu contaminé de même concentration et nous poursuivons l'expérimentation comme précédemment.

➤ *Effet du mélange d'antidépresseurs sur les deux générations d'hydres F1 et F2.*

Pour les tests de toxicité chronique du mélange sur les deux générations successives d'hydres F1 et F2, nous avons utilisé le même protocole appliqué au-dessus, pour tester l'effet de la sertraline sur les deux dernières générations d'hydres.

## **II.5. Analyses statistiques.**

Les caractéristiques morphologiques de chaque hydre et la régénération des embryons ont été comptabilisées (Wilby, 1988), le score moyen a été calculé pour chaque concentration d'exposition. Les valeurs de CE50-96h des tests aigus ont été calculées à l'aide du logiciel

REGTOX (version7.3), outil de régression basé sur le modèle de Hill ([http://www.normalesup.org/~vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html)). Les valeurs de CEx sont données avec un intervalle de confiance de 95 %.

La variabilité de tous les paramètres (la morphologie, le score de la régénération, l'alimentation, la reproduction) entre les organismes exposés et les contrôles a été testé par les tests non paramétrique de Kruskal-Wallis et de Man-Whitney pour identifier les concentrations induisant un effet significatif. Une ANOVA a également été utilisée pour comparer le nombre d'artémies ingérées. Les différences entre les hydres traitées comparées aux témoins et aux contrôles sont considérées significatives quand  $p \leq 0,05$ . L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Stat-View.

## **PARTIE II : ETUDE IN VITRO.**

### **I. CULTURE DE CELLULES MDA-kb2.**

La lignée cellulaire MDA-kb2 est dérivée de cellules de cancer du sein humain MDA-MB453 et transfectée de manière stable par le gène rapporteur de construction MMTV.luciférase.neo (Wilson et al., 2002). Ces cellules sont cultivées dans des flasques de culture cellulaire de 75 cm<sup>2</sup>, col incliné, bouchon à filtre (T75) de marque Greiner (Invitrogen, France) dans du milieu nutritif complet Leibowitz-15 (L-15) (Invitrogen ou Gibco, France) en présence de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 100 U mL<sup>-1</sup> de pénicilline (Sigma), 100 µg mL<sup>-1</sup> de streptomycine (Sigma), et 0,25 µg mL<sup>-1</sup> d'amphotéricine B (Sigma). Ces cellules sont maintenues dans un incubateur humidifié à 37 °C sans CO<sub>2</sub>.

### **II. PRODUITS PHARMACEUTIQUES ETUDIÉS.**

Nous avons utilisé les mêmes substances médicamenteuses que celles étudiées dans la première partie sur l'hydre afin d'obtenir des informations sur leur potentiel androgénique. Dans cette partie nous n'avons pas testé l'effet de l'amphotéricine B car elle est incorporée dans le milieu de culture. Les concentrations maximales de ces substances testées seules sont choisies selon les valeurs des concentrations précédemment décrites dans les tests chroniques sur les hydres adultes. Une série de dilutions de 10 à 100000 a été choisie à partir de ces concentrations dans le but d'atteindre les concentrations environnementales. Les gammes de concentrations utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 21.

Tous les produits chimiques ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à l'exception des antidépresseurs et de la gabapentine, et dilués à la concentration désirée avant utilisation (tableau 21). La concentration finale de DMSO dans le milieu de culture dans toutes les microplaques est de 0,02 % (v:v) pour toutes les substances testées seules et en mélange.

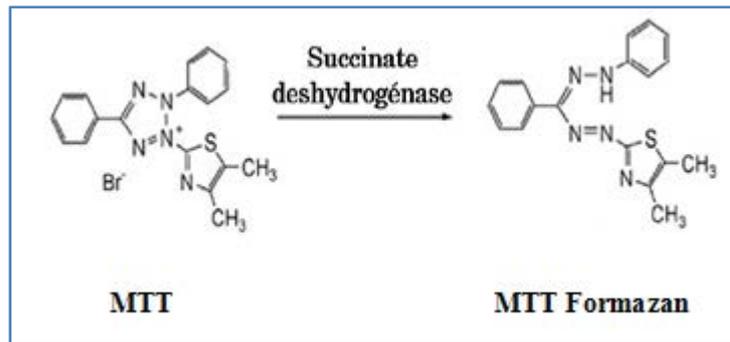
### **III. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX DES TESTS MDA-Kb2 et MTT.**

#### **3.1. Essai androgénique MDA-kb2.**

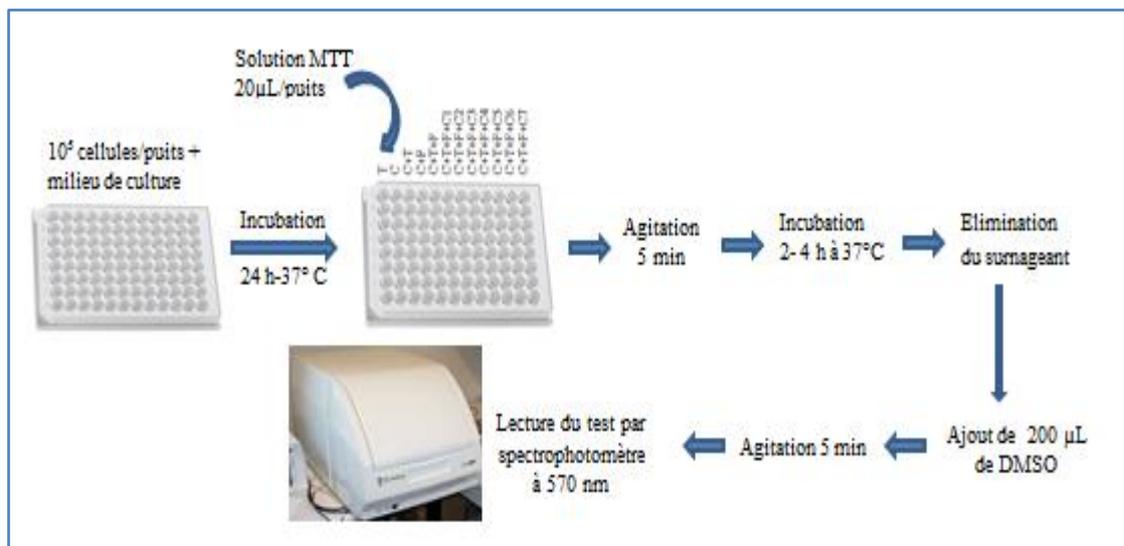
Le principe du test MDA-kb2 est démontré dans le premier chapitre (partie V.1), il est basé sur l'interaction ligand/récepteur au sein de la cellule. Le déroulement du test est résumé sur la figure 24. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 10<sup>5</sup> cellules par puits dans une microplaque (blanche, opaque et stérile) de 96 puits, et incubée pendant 24 heures à 37 °C.

**Tableau 21.** Concentrations des substances pharmaceutiques utilisées dans l'étude *in vitro* sur les cellules MDA Kb2.S

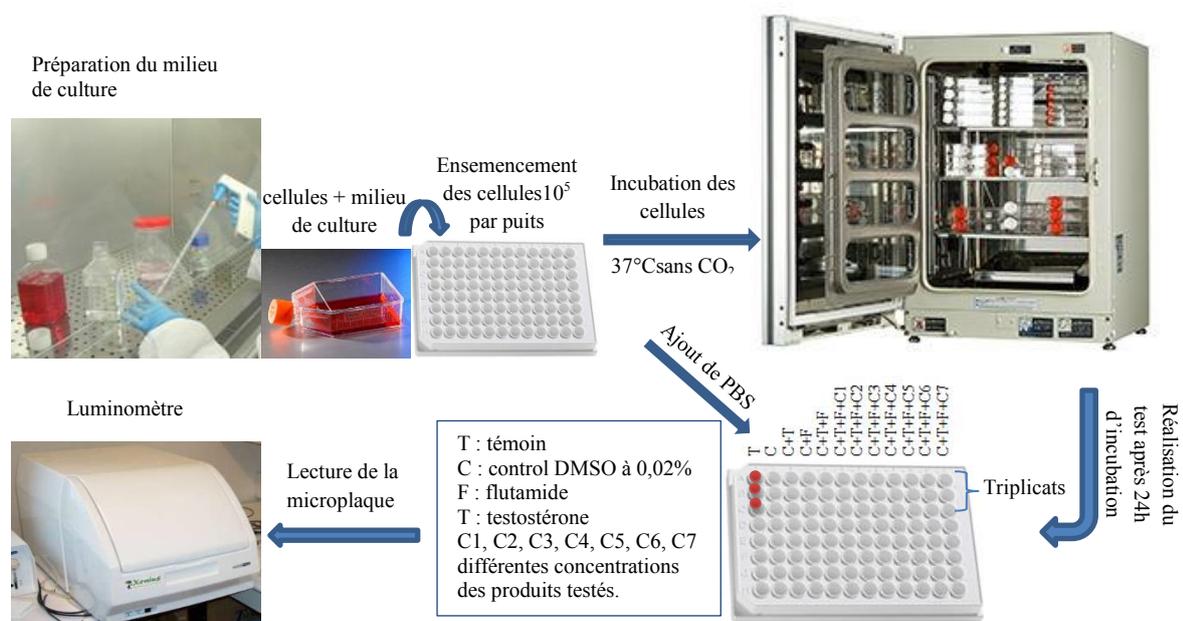
<b>Molécules</b>	<b>Concentrations (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Acébutolol	0 ; C ; 0,000007
Cétirizine	0 ; C ; 0,000025
Clarithromycine	0 ; C ; 0,000004
Clomipramine	0 ; C ; 0,000003 ; 0,00003 ; 0,0003 ; 0,003 ; 0,03 ; 0,3
Econazole	0 ; C ; 0,016 ; 0,031 ; 0,625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5
Fluoxétine	0 ; C ; 0,000008 ; 0,00008 ; 0,0008 ; 0,008 ; 0,08 ; 0,8
Fluvoxamine	0 ; C ; 0,0001 ; 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10
Gabapentine	0 ; C ; 0,000005
Kétoconazole	0 ; C ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5
Miconazole	0 ; C ; 0,0125 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4
Paroxétine	0 ; C ; 0,000004 ; 0,00004 ; 0,0004 ; 0,004 ; 0,04 ; 0,4
Sertraline	0 ; C ; 0,00000175 ; 0,0000175 ; 0,0001750 ; 00175 ; 0,0175 ; 0,175
Venlafaxine	0 ; C ; 0,000006



**Figure 25.** Principe du test MTT.



**Figure 26.** Essai de cytotoxicité MMT.



**Figure 24.** Schéma démonstratif de test anti-androgénique conduit sur les cellules MDA-kb2.

Ensuite, les cellules ont été mises en triplicats avec un solvant seul (DMSO à 0,02 % pour les produits pharmaceutiques testés, contrôle négatif et positif). Dans cet essai nous avons utilisé la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (DHT) et la flutamide comme contrôles positifs pour les AR agonistes et antagonistes. Une gamme de concentrations de produits pharmaceutiques a été testée seule et en présence de la flutamide afin d'identifier les molécules actives.

Après avoir rincé trois fois les cellules dans les microplaques avec une solution saline du tampon phosphate (PBS, pH 7,4). La luminescence émise dans chaque puits a été mesurée par le luminomètre des microplaques de 96 puits (LUMIStar, BMG LABTECH).

### III.2. Essai de cytotoxicité MMT.

Le test MTT sert à détecter la cytotoxicité des produits chimiques testés, il permet de mesurer le taux de la prolifération cellulaire et réciproquement la diminution de la viabilité cellulaire. C'est un test de détection colorimétrique de l'activité mitochondriale. Les cellules vivantes, qui présentent un métabolisme actif, convertissent le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) en un précipité « formazan » violet insoluble dans l'eau (figure 25). Lorsque les cellules meurent, elles perdent la capacité de convertir le MTT en formazan.

Les cellules ont étéensemencées à une densité de  $10^5$  cellules par puits d'une microplaque de 96 puits et laissées à incuber pendant 24 heures à 37 °C. Ces cellules ont été ensuite exposées au composé d'intérêt.

La solution de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure) est préparée à 5 mg mL<sup>-1</sup> dans du tampon PBS et ensuite filtrée pour éliminer le MTT non dissout et ne pas fausser les résultats. Un volume de 20 µL de cette solution (MTT) a été ajouté par puits, puis les plaques ont été placées sur un système d'agitation pendant 5 min et ensuite incubées pendant 2 à 4 h à 37 °C (figure 26).

Après l'incubation, le surnageant de culture a été soigneusement éliminé et remplacé par 200 µL de DMSO pour dissoudre les cristaux de formazan. La plaque est ensuite placée sur un agitateur pendant 5 min. La quantité de formazan est mesurée en enregistrant les modifications de l'absorbance à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques. La formation de couleur sert de marqueur utile et idéal des cellules vivantes. Donc la quantité de formazan est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

#### **IV. ANALYSES STATISTIQUES**

Les résultats présentés dans cette étude sont les moyennes et les médianes de l'intensité de luminescence mesurée. Les différences entre cellules MDA-Kb2 traitées, comparées aux témoins et aux contrôles positifs et négatifs ont été évaluées en utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et Mann-Whitney, ces tests sont considérés significatifs quand  $p \leq 0,05$ . Nous avons utilisé les mêmes versions des logiciels déjà citées pour les hydres.

# RÉSULTATS

Ce chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche. Il est divisé en 2 parties distinctes traitant de l'effet de quatorze substances médicamenteuses appartenant à différentes classes chimiques à l'aide de deux modèles biologiques, l'hydre (*Hydra attenuata*) et un modèle cellulaire (MDA-Kb2). Nous avons cherché à répondre à plusieurs questions : les produits pharmaceutiques retrouvés dans notre environnement ont-ils un effet toxique ? S'ils sont tératogènes ? Les molécules testées possèdent-elles potentiel androgène ? Quels sont les effets écotoxicologiques aigus et chroniques des produits pharmaceutiques testés seuls et en mélange ? Les effets observés le sont-ils à des concentrations proches des celles retrouvées au niveau environnemental.

**Une première partie** présente les résultats des tests *in vivo*, obtenus chez le modèle hydre utilisé comme indicateur de toxicité de différentes substances pharmaceutiques. Cette partie a fait l'objet de deux publications en préparation intitulées: « **Acute and chronic toxicity of five antidepressants in the cnidarian *Hydra attenuata*** » et « **Multiple generation on morphological and reproductive toxicity study of sertraline and mixture of SSRIs in the micro-invertebrate *Hydra attenuata*** ».

**Une seconde partie** présente les résultats de la cytotoxicité et le potentiel androgénique des 14 substances médicamenteuses testées seules et en mélange sur les cellules MDA-kb2.

## 1<sup>ère</sup> PARTIE. TOXICITE DE SUBSTANCES MEDICAMENTEUSES SUR LE MODELE HYDRE

Ce travail de recherche a consisté à étudier le modèle hydre comme indicateur de toxicité de différentes substances médicamenteuses appartenant à différentes classes thérapeutiques : 1) les antidépresseurs ; 2) les antifongiques ; 3) les antibiotiques ; 4) les  $\beta$ -bloquants ; 5) les antiépileptiques et 6) les antihistaminiques. Nous avons cherché à évaluer les effets toxiques de chaque substance testée seule ou en mélange à travers des essais de toxicité aiguë et chronique sur les hydres adultes et embryons, sur une ou plusieurs générations afin d'approcher le développement de la toxicité sur la descendance.

### I. Essais de toxicité aiguë

Les effets d'exposition des hydres adultes et des embryons (tronçons gastriques) pendant 96h à diverses concentrations de cinq antidépresseurs et de quatre antifongiques testés sont présentés dans le tableau 22.

**Tableau 22.** Valeurs de  $CE_{50}$  des antidépresseurs et antifongiques testés sur la survie et le développement des hydres (A: adultes ; D: embryons).

Molécules	$CE_{50-96h}$ mg L <sup>-1</sup> (A)	$CE_{50-96h}$ mg L <sup>-1</sup> (D)	Ratio A/D
<b>Antidépresseurs</b>			
<b>Clomipramine</b>	2,95	2,95	1
<b>Fluoxétine</b>	7,94	8,68	0,91
<b>Fluvoxamine</b>	> 100	29,13	> 3
<b>Paroxétine</b>	3,78	4,18	0,9
<b>Sertraline</b>	1,71	1,79	0,95
<b>Antifongiques</b>			
<b>Amphotéricine B.</b>	4,53	4,16	1,09
<b>Econazole</b>	0,94	0,38	2,5
<b>Kétoconazole</b>	3,01	1,07	2,81
<b>Miconazole</b>	0,84	0,45	1,9

### **I.1. Toxicité sur les hydres adultes.**

Les résultats des essais de toxicité aigus montrent un effet délétère des molécules testées sur la morphologie et la survie des hydres. Les valeurs des concentrations efficaces induisant 50% de mortalité ( $CE_{50}$ ) des hydres adultes exposées à chaque antidépresseur testé seul sont comprises entre de l'ordre croissant de 1,71 et plus de 100  $mg L^{-1}$ . Parmi les molécules de cette classe, la sertraline est avérée la plus toxique. La fluvoxamine est de 12,5 à 60 fois moins toxique que les autres molécules testées sur des adultes.

Les valeurs des  $CE_{50}$  varient de 0,84 à 4,53  $mg L^{-1}$  pour les molécules d'antifongiques testées, les azolés notamment le miconazole et l'éconazole sont plus toxiques que les polyènes (amphotéricine B). Ces deux molécules présentent des valeurs de toxicités inférieures à 1  $mg L^{-1}$ .

Les hydres adultes sont plus sensibles aux antifongiques qu'aux antidépresseurs.

### **I.2. Toxicité sur les embryons.**

La toxicité des substances médicamenteuses sur la survie et la régénération des embryons est exprimée par la  $CE_{50}$ . Les valeurs de cette dernière variaient de 1,79 à 29,31  $mg L^{-1}$  pour les antidépresseurs testés sur les embryons (tableau 22). La  $CE_{50-96 h}$  de la fluvoxamine est 4 à 18 fois supérieure à celle des autres antidépresseurs testés.

Les valeurs des  $CE_{50-96h}$  sont comprises entre 0,38 et 4,16  $mg L^{-1}$  pour les molécules d'antifongiques (tableau 22). Deux substances ont une toxicité plus importante : l'éconazole et le miconazole, pour lesquels les effets apparaissent à des concentrations de l'ordre de la centaine de  $\mu g L^{-1}$ .

### **I.3. Ratio A/D.**

Pour quatre substances, l'éconazole ; la fluvoxamine ; le kétoconazole et le miconazole, un ratio A/D relativement élevé de 1,9 à plus de 3 (tableau 22) a été obtenu, ce qui suggère que ces substances perturbent le développement et la régénération de l'embryon sans exercer de toxicité chez l'adulte pour la même concentration (effet sélectif sur le développement), contrairement à la paroxétine, la sertraline et la fluoxétine qui sont plus toxiques pour l'adulte.

En comparant la sensibilité des hydres adultes par rapport aux embryons vis-à-vis les différentes molécules d'antidépresseurs et d'antifongiques testées, les embryons exposés aux antifongiques

azolés et à la fluvoxamine montrent une sensibilité plus importante que les adultes contrairement aux reste des molécules qui présentent une sensibilité supérieure ou équitable.

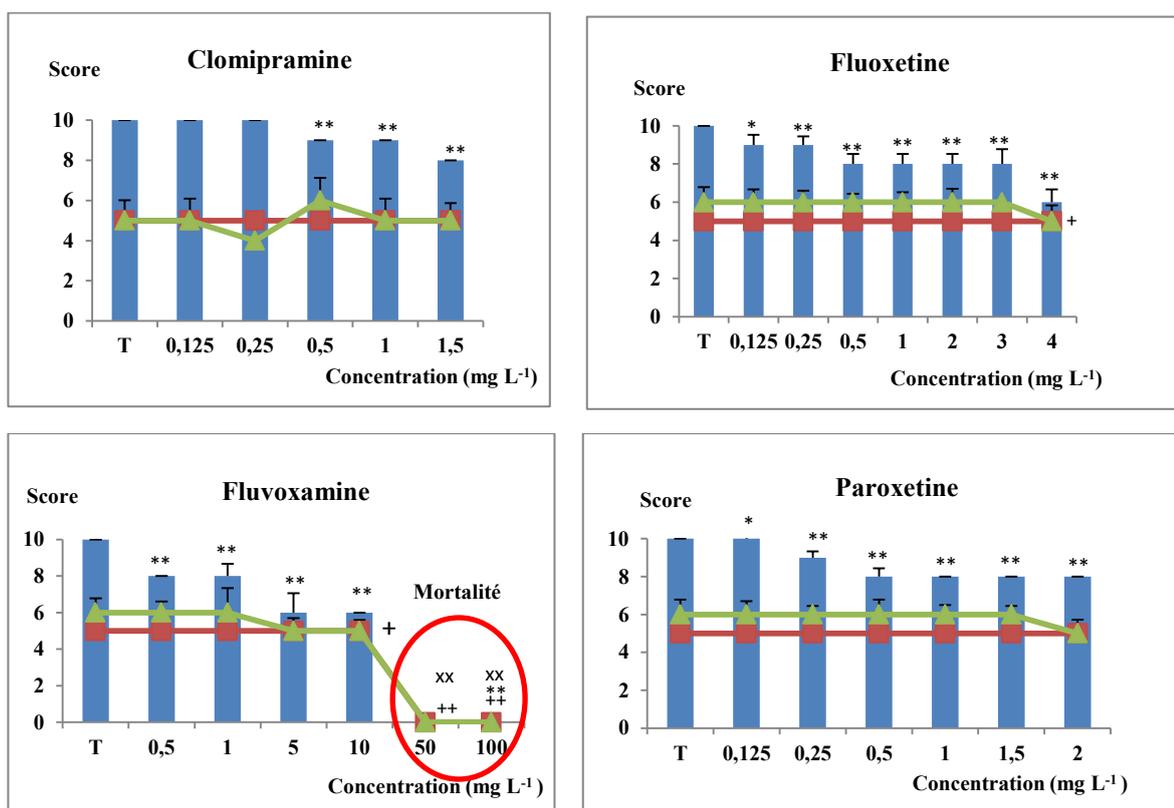
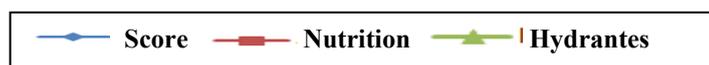
## II. Essai de toxicité chronique des antidépresseurs et antifongiques.

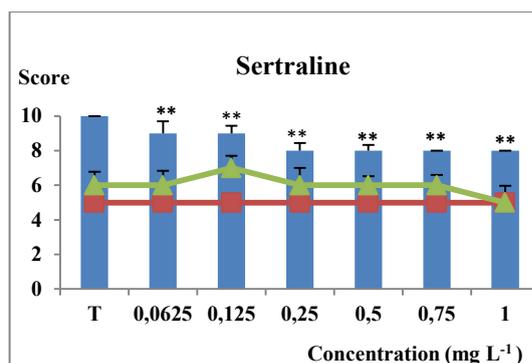
### II.1. Les antidépresseurs testés individuellement.

#### a. Toxicité sur les hydres adultes.

Pour les tests de toxicité chronique, les concentrations testées ont été sélectionnés sur la base de CE50-96 h obtenue lors du test aigu. La plus forte concentration testée est celle qui correspond à la moitié de la valeur de CE50-96 h, puis une série de dilution a été choisie à partir de la valeur maximale.

Les résultats obtenus chez les adultes exposés aux antidépresseurs sont présentés dans la figure 27.





**Figure 27.** Effets des antidépresseurs sur différents paramètres biologiques testés sur des adultes (morphologie des organismes (score), nutrition, nombre de bourgeons (hydrantes)).

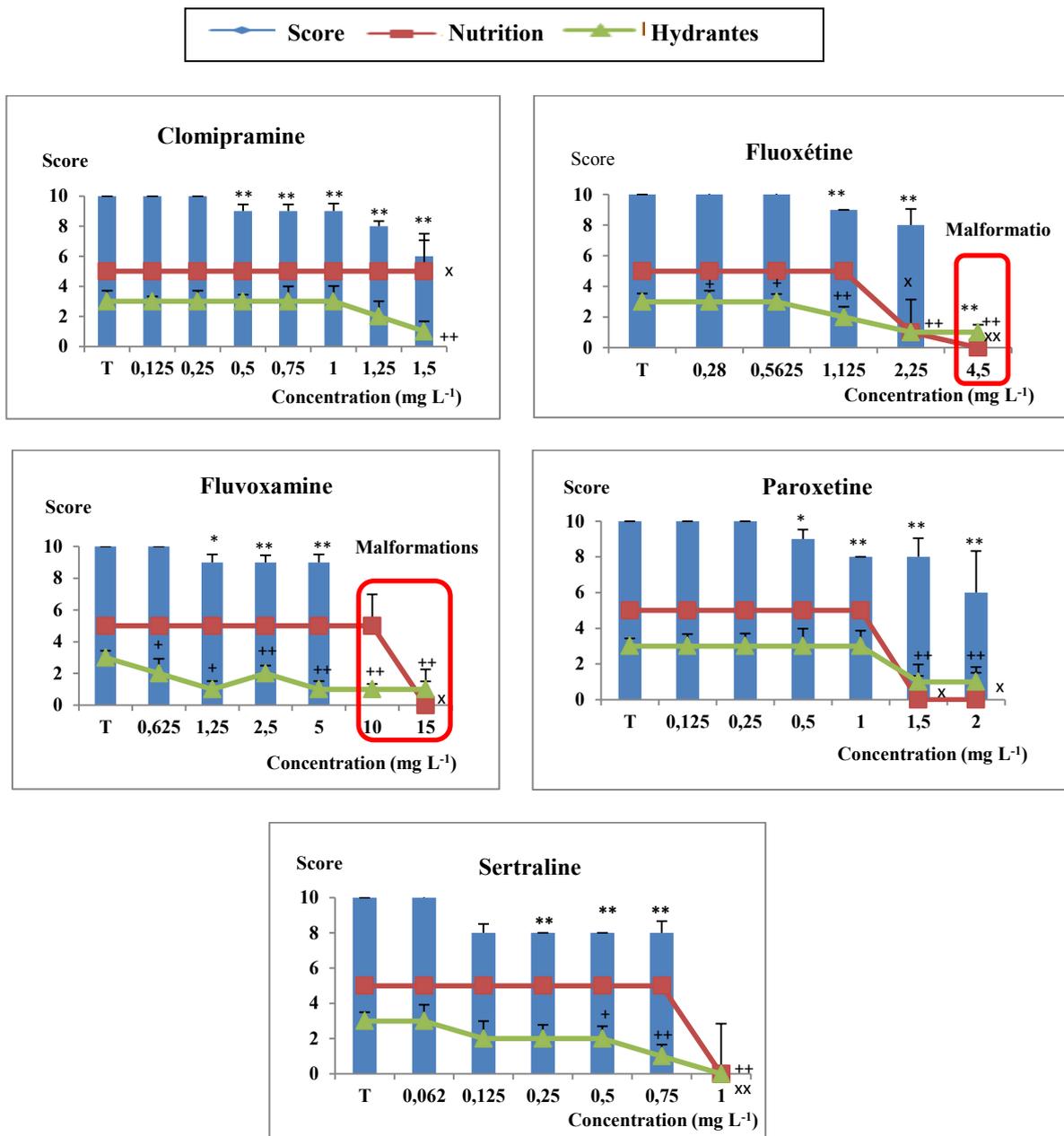
(\*\*\*), (<sup>x,xx</sup>) and (<sup>+,++</sup>) indiquent les niveaux de signification respectivement du score, de la capacité de nutrition et de la reproduction. ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ , tests paramétriques (ANOVA) et non-paramétriques Kruskal-Wallis et Mann Whitney).

L'exposition chronique des hydres adultes aux cinq antidépresseurs montre une réduction significative des scores avec l'augmentation de la concentration de chaque molécule, comparativement à celle du contrôle. Les deux stades 8 et 6 dominent pour la plus forte concentration testée. L'impact de ces antidépresseurs sur la morphologie a été démontré à de faibles concentrations, les LOECs des différents composés testés ont été calculés à 0,5 ; 0,125 ; 0,5 ; 0,125 et 0,0625 mg L<sup>-1</sup> pour la clomipramine, la fluoxétine, la fluvoxamine, la paroxétine, et la sertraline respectivement. Nous avons observé 100% de mortalité des hydres adultes exposées à 50 et 100 mg L<sup>-1</sup> de fluvoxamine entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour du test.

Les antidépresseurs testés n'ont aucun effet sur la capacité de nutrition des hydres pendant les 10 jours d'exposition. La reproduction asexuée des hydres (hydrantes) n'est pas affectée non plus pour l'ensemble de ces composés testés, sauf à des fortes concentrations de la fluoxétine (4 mg L<sup>-1</sup>) et la fluvoxamine (10 mg L<sup>-1</sup>) (figure 27).

#### **b. Toxicité sur les embryons.**

Les résultats obtenus chez les embryons exposés aux antidépresseurs sont présentés dans la figure 28.



**Figure 28.** Effets des antidépresseurs sur différents paramètres biologiques testés sur des embryons.

(\*\*\*), (<sup>x,xx</sup>) and (<sup>+,++</sup>) indiquent les niveaux de signification respectivement du score, de la capacité de nutrition et de la reproduction. ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ , tests paramétriques (ANOVA) et non-paramétriques Kruskal-Wallis et Mann Whitney).

Tous les paramètres sont significativement affectés chez les embryons exposés aux concentrations testées les plus élevées, pour l'ensemble des molécules étudiées (figure 28). Les résultats montrent un effet délétère sur la morphologie et le développement des embryons exposés aux antidépresseurs. Les LOECs obtenues pour les essais sur les embryons sont respectivement

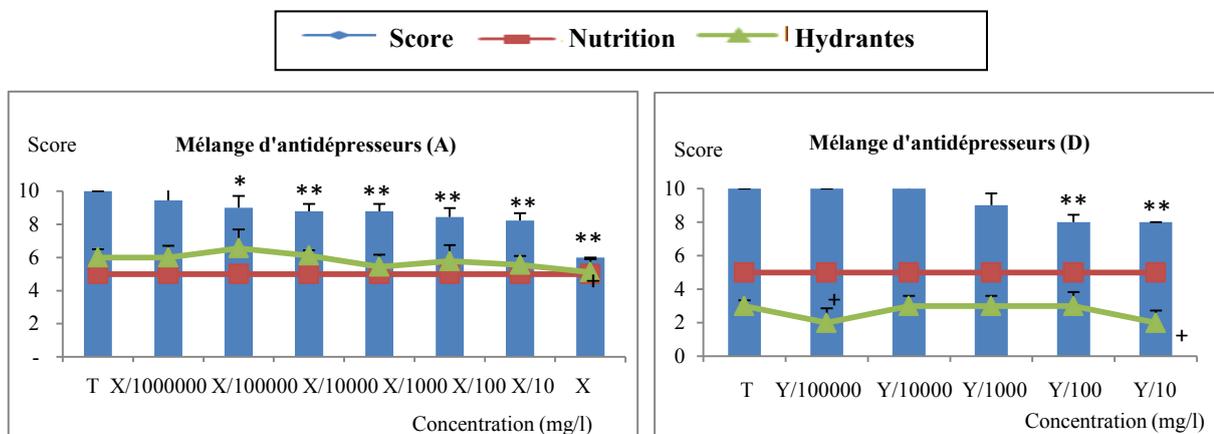
de 1,125; 0,5 ; 1,250 ; 0,5 et 0,5 mg L<sup>-1</sup> pour la clomipramine, la fluoxétine, la fluvoxamine, la paroxétine et la sertraline.

La comparaison des LOECs obtenues concernant l'impact sur la morphologie, montre que les hydres adultes sont plus sensibles que les embryons, notamment pour la sertraline, avec une valeur de LOEC 8 fois plus faible chez les adultes que chez les embryons.

La durée du test chronique a été prolongée dans le but de suivre l'évolution des hydres malformées et de voir si elles résistent au contaminant ou elles perdent toutes ces fonctions vitales. Les résultats montrent que les hydres perdent leur capacité de produire des hydrantes après 14 jours d'exposition à des concentrations de 4,5 mg L<sup>-1</sup> de la fluoxétine, 10 et 15 mg L<sup>-1</sup> de la fluvoxamine et 1 mg L<sup>-1</sup> de la sertraline. Ces trois molécules présentent aussi une réduction significative du nombre d'hydrantes à des LOECs respectives de 0,28 ; 0,625 et 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Pour les autres molécules testées, une hydre sur neuf seulement est capable de produire des hydrantes à des concentrations de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de clomipramine et de 2 mg L<sup>-1</sup> de paroxétine.

## II.2. Le mélange d'antidépresseurs.

Les résultats des tests chroniques sur les hydres adultes et les embryons exposés au mélange d'antidépresseurs sont présentés dans la figure 29.



**Figure 29.** Effets du mélange d'antidépresseurs sur les différents paramètres biologiques testés sur l'hydre adulte (A) et l'embryons (D).

Le graphe (figure 29) montre que le score des hydres diminue de 10 à 6 en fonction de l'augmentation de la concentration du mélange d'antidépresseurs testé. La concentration minimale du mélange d'antidépresseurs (LOEC) qui affecte la morphologie des hydres adultes est de quelques ng L<sup>-1</sup>. Elle est 100 fois inférieure à celle des embryons. Le nombre d'hydrantes

produites est significativement affecté chez les hydres exposées à la plus forte concentration du mélange testé X mg L<sup>-1</sup>. Cependant, les hydres n'ont pas perdu leur capacité de nutrition qu'elle que soit la concentration testée.

La toxicité chronique des cinq antidépresseurs testés en mélange sur les embryons affecte leur morphologie à des faibles concentrations LOEC de Y/100 mg L<sup>-1</sup>. Une réduction significative du nombre d'hydrantes produites est observée à la plus faible concentration testée Y/100000 mg L<sup>-1</sup> ainsi que pour la plus forte concentration.

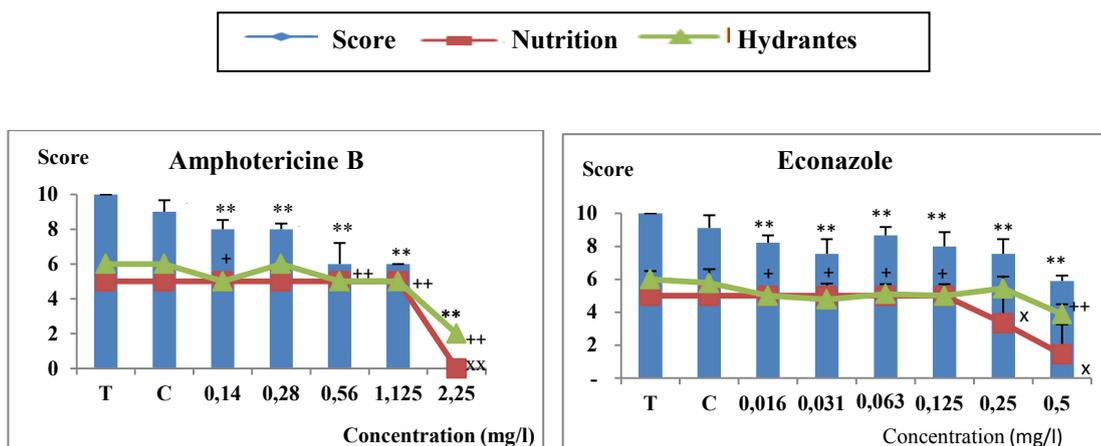
La concentration maximale qui correspond à Y mg L<sup>-1</sup> du mélange d'antidépresseurs testé sur les embryons n'a pas été montrée dans le graphe (figure 29) car la morphologie des hydres ne correspond à aucun score à cette concentration. Tous les paramètres semblent être affectés. Les hydres ne sont pas développées durant les 14 jours du test et elles ont perdu totalement leur capacité de nutrition. Au bout de quelques jours, toutes les hydres étaient mortes.

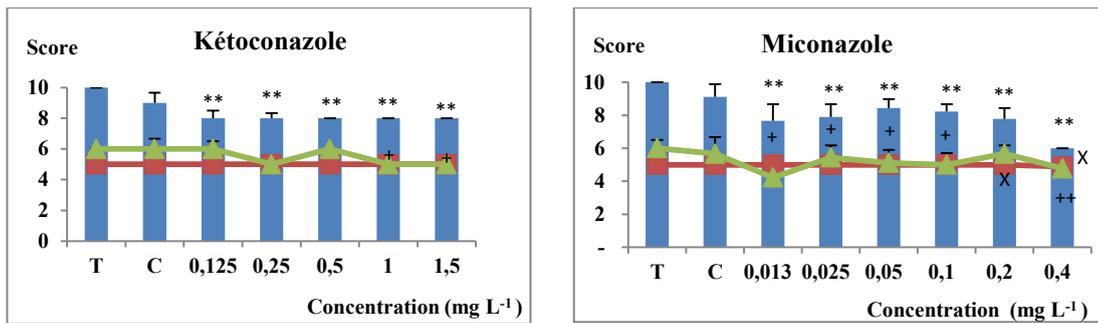
Les antidépresseurs testés seuls apparaissent moins toxiques que lorsqu'ils sont testés en mélange chez les adultes. La LOEC de la substance la plus toxique d'antidépresseurs testée seule est de 0,0625 mg L<sup>-1</sup>, alors qu'elle est de X/100000 mg L<sup>-1</sup> pour le mélange.

### II.3. Les antifongiques testés individuellement.

#### a. Toxicité sur les hydres adultes.

Les résultats obtenus chez les hydres adultes exposés aux antifongiques sont présentés dans la figure 30.





**Figure 30.** Effets des antifongiques sur différents paramètres biologiques testés sur des hydres adultes. (\*,\*\*), (<sup>x</sup>,<sup>xx</sup>) and (<sup>+</sup>,<sup>++</sup>) indiquent les niveaux de signification respectivement du score, de la capacité de nutrition et de la reproduction. ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ , tests paramétriques (ANOVA) et non-paramétriques Kruskal-Wallis et Mann Whitney).

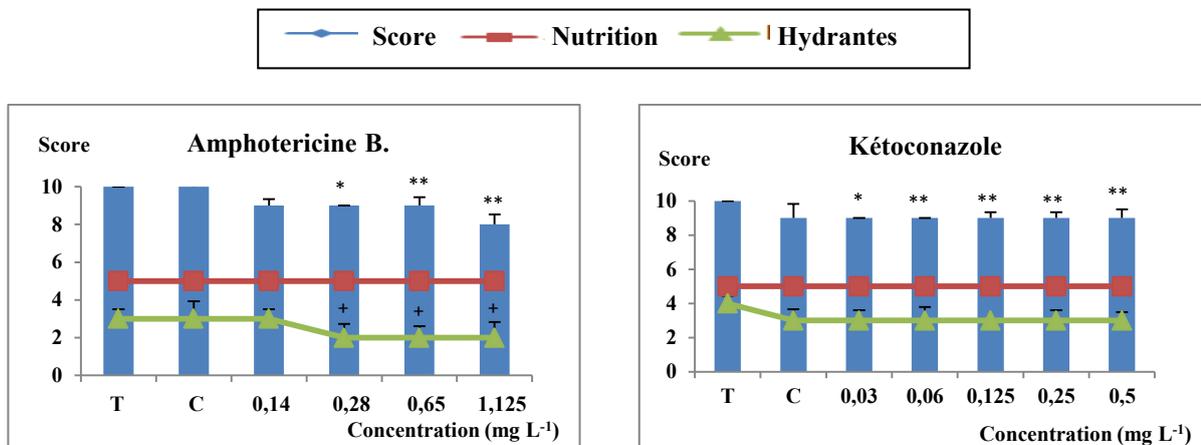
Contrairement aux antidépresseurs, les antifongiques ne sont pas solubles dans l'eau. Ces derniers ont été dissous dans le DMSO à 0,3 %. Cette concentration ne présente aucun effet significatif sur les différents paramètres biologiques testés par rapport au témoin ce qui nous a permis de le considérer comme contrôle dans ce test, il permet une comparaison directe des hydres exposées aux antifongiques à celle de contrôle au lieu du témoin.

Les résultats montrent qu'il y a une diminution significative du score durant la période du test. Pour les résultats obtenus chez les adultes, le score à la concentration de 2,25 mg L<sup>-1</sup> de l'amphotéricine B ne figure pas sur les graphes car à cette concentration les hydres présentent des malformations comme l'absence du développement des tentacules, la disparition de la formation de l'hypostome et le détachement des bourgeons (figure 30) ce qui a induit la quasi mortalité des hydres après quelques jours du test. Ces anomalies réduisent les activités vitales de l'hydre telles que la reproduction et la nutrition. Les concentrations minimales qui affectent la reproduction des hydres sont respectivement de 0,14 ; 0,016, 1 et 0,013 mg L<sup>-1</sup> pour l'amphotéricine B, l'éconazole, le kétoconazole et le miconazole. Cependant, la capacité de nutrition est affectée seulement pour trois des molécules d'antifongiques testées : 2,25 mg L<sup>-1</sup> d'amphotéricine B, 0,25 mg L<sup>-1</sup> d'éconazole et de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de miconazole.

Il apparaît aussi que les adultes sont plus sensibles que les embryons, comme cela était déjà le cas pour les essais sur antidépresseurs.

**b. Toxicité sur les embryons.**

Les résultats obtenus chez les embryons exposés aux antifongiques sont présentés dans la figure 31.



**Figure 31.** Effets des antifongiques sur différents paramètres biologiques testés sur des embryons.

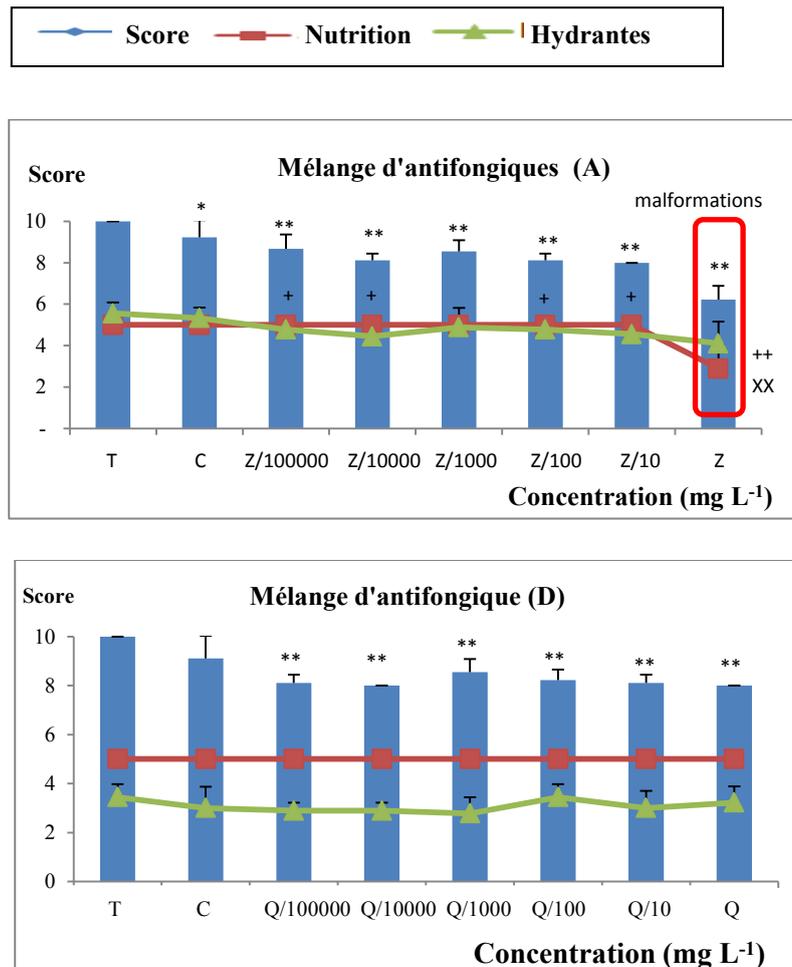
(\*,\*\*), (<sup>x</sup>,<sup>xx</sup>) and (<sup>+</sup>,<sup>++</sup>) indiquent les niveaux de signification respectivement du score, de la capacité de nutrition et de la reproduction. (p <0,05 et p <0,001, tests paramétriques (ANOVA) et non-paramétriques Kruskal-Wallis et Mann Whitney).

Pour les résultats obtenus chez les embryons, il est à noter que le kétoconazole n'induit aucun effet sur la reproduction et la nutrition, tandis que, l'amphotéricine B à un effet négatif sur la reproduction dès 0,28 mg L<sup>-1</sup>. Le miconazole réduit la capacité de nutrition mais seulement à la plus forte concentration testée.

Il apparait aussi que les adultes sont plus sensibles que les embryons, comme cela était déjà le cas pour les essais sur antidépresseurs.

**II.4. Mélange d'antifongiques**

Les résultats des tests chroniques sur les hydres adultes et les embryons exposés au mélange d'antifongiques sont présentés dans la figure 32.



**Figure 32.** Effets du mélange d'antifongique sur les différents paramètres biologiques testés sur l'hydre adulte (A) et l'embryons (D).

(\*\*\*), (<sup>x,xx</sup>) and (<sup>+,++</sup>) indiquent les niveaux de signification respectivement du score, de la capacité de nutrition et de la reproduction. ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ , tests paramétriques (ANOVA) et non-paramétriques Kruskal-Wallis et Mann Whitney).

Le graphe (figure 32) montre que les scores diminuent de 10 à 6 chez les hydres adultes et de 10 à 8 chez les embryons lorsque la concentration maximale du mélange d'antifongiques testé est atteinte. La concentration minimale du mélange d'antifongiques (LOEC) qui affecte la reproduction chez des hydres adultes est de l'ordre de  $\text{ng L}^{-1}$  ( $Z/100000 \text{ mg L}^{-1}$ ). Tous les paramètres ont sévèrement été affectés chez les hydres exposées à la plus forte concentration du mélange testé qui correspond à quelques  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $Z \text{ mg L}^{-1}$ ). A cette concentration plusieurs anomalies étaient visibles. Cependant, les embryons n'ont pas perdu leur capacité de nutrition et de reproduction quelle que soit la concentration testée.

Les antifongiques testés seuls apparaissent moins toxiques que lorsqu'ils sont testés en mélange chez les adultes.

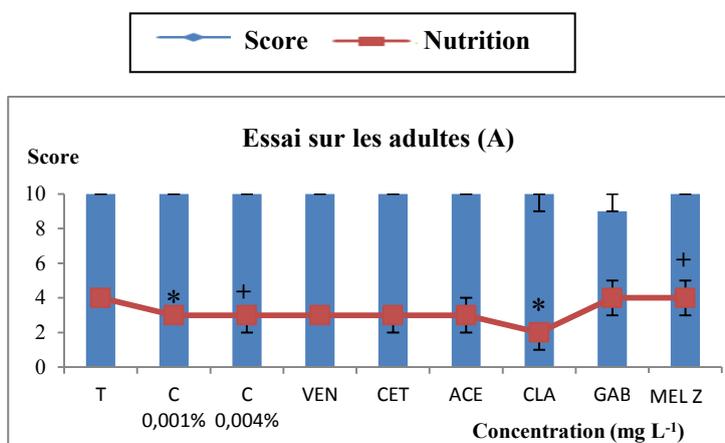
### III. Essai de toxicité chronique pour autres résidus pharmaceutiques trouvés dans l'environnement

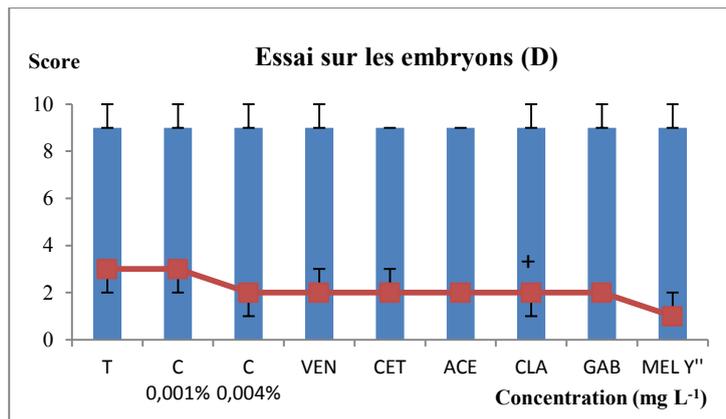
Plusieurs molécules qui appartiennent à des classes de médicament différentes ont été testées seules à des concentrations environnementales ; 7 ng L<sup>-1</sup> d'acébutolol (ACE), 25 ng L<sup>-1</sup> de cétirizine (CET), 4 ng L<sup>-1</sup> de clarithromycine (CLA), 50 ng L<sup>-1</sup> de gabapentine (GAB) et 6 ng L<sup>-1</sup> de venlafaxine (VEN). La concentration finale du DMSO présente dans le test est de 0,001 %. Ces mêmes molécules ont été combinées pour former un mélange d'une concentration nommée M qui contient au finale 0,004 % de DMSO.

Les résultats du test chronique sur les hydres adultes et les embryons montrent que le DMSO à des concentrations respectives de 0,001 et 0,004% n'affecte pas la morphologie des hydres adultes et des embryons. Un effet significatif ( $p < 0,05$ ) est observé seulement sur la reproduction des hydres adultes.

En comparant la toxicité des produits pharmaceutiques testés seuls avec celle du contrôle DMSO à 0,001%, il est observé que toutes les molécules n'affectent pas la morphologie de l'hydre et la régénération des embryons. Seule la clarithromycine a un effet significativement négatif sur la reproduction des hydres adultes et des embryons.

En comparant aussi la toxicité du mélange M testé sur les hydres adultes et embryons avec celle du DMSO à 0,004%, les résultats montrent qu'il n'a aucun effet sur la morphologie des adultes et la régénération des embryons mais le seule effet observé été sur la reproduction des hydres adultes (figure 33).





**Figure 33.** Effets du mélange de plusieurs classes médicamenteuses sur les différents paramètres biologiques testés sur l'hydre adulte (A) et l'embryons (D).

\* et + indiquent les niveaux de signification respectivement du score et de la capacité de la reproduction. ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ , tests non-paramétriques Kruskal-Wallis et Mann Whitney).

#### IV. Malformations.

##### IV.1. Pour les antidépresseurs

Les résultats obtenus chez les embryons exposés aux antidépresseurs sont présentés dans la figure 34.



**Figure 34.** Anomalies observées chez les embryons exposés aux antidépresseurs

Bien que les embryons soient moins sensibles que les adultes aux antidépresseurs, pendant les essais chroniques, nous avons constaté que la clomipramine, la sertraline, la paroxétine et la fluvoxamine testées seules induisaient des malformations (Figure 33) chez les embryons : tentacules bifides, bourgeons qui ne se détachaient pas et individus à deux têtes. Aux plus fortes concentrations de fluoxétine et de fluvoxamine testées, les sections gastriques se régénéraient en donnant les parties apicales et basales de l'hydre (score 8 ou 9) mais elles n'achevaient pas leur développement. Leur corps restait contracté et ne portait que 3 à 4 tentacules très courts. Ces individus étaient incapables de former leurs pédoncules ou d'atteindre le score de 10. La capacité de nutrition et de reproduction des bourgeons étaient affectées. La taille des hydres se réduisait au cours des 14 jours de traitement et une forte mortalité était à déplorer (33,33%). Ces malformations sont similaires à celles provoquées, sur les embryons, par la plus forte concentration (Y) du mélange d'antidépresseurs.

Les principales anomalies observées chez les embryons lors de l'exposition à la clomipramine et la paroxétine étaient (i) l'augmentation du nombre de tentacules formés par chaque hydre, allant de 9 à 13 au lieu des 7 habituellement observées chez les témoins, et (ii) la présence de tentacules bifides.

## **V.2. Pour les antifongiques**

Contrairement aux antidépresseurs, les antifongiques induisent des malformations (figure 35) chez les hydres adultes et non pas chez les embryons. Parmi les quatre molécules d'antifongiques testées, seulement l'amphotéricine B, l'éconazole et le miconazole causent des malformations aux fortes concentrations testées, respectivement de 2,25 ; 0,112 et 0,225 ; et 0,4 mg L<sup>-1</sup>. Ces anomalies touchent la morphologie de l'hydre. La perméabilité membranaire pourrait être modifiée. L'hydre devient de plus en plus fine et transparente sous une forme étendue. L'anatomie de l'hydre est aussi affectée: le nombre des tentacules se réduit et la bouche de l'hydre disparaît complètement (hydres exposées à 0,225 mg L<sup>-1</sup> d'éconazole).

Au cours des derniers jours du traitement par l'éconazole et le miconazole, les hydres portantes ces anomalies deviennent beaucoup plus petites que les hydres témoins. Elles continuent de se reproduire mais les hydrantes restent accrochées aux hydres mères. Toutes les hydres exposées à 2,25 mg L<sup>-1</sup> d'amphotéricine B meurent pendant le 7<sup>ème</sup> jour d'exposition.

La plus forte concentration du mélange d'amphotéricine B, d'éconazole, de kétoconazole et de miconazole induit des malformations les d'hydres adultes.



**Figure 35.** Malformations observées chez les adultes exposés à de fortes concentrations d'éconazole et de miconazole.

## VI. Effet des produits pharmaceutiques sur plusieurs générations d'hydres.

Les tests chroniques sur trois générations d'hydre ont été réalisés afin de voir si les descendants des deux générations successives d'hydres développent un système de défense et deviennent plus tolérantes (résistantes). Nous avons choisie de travailler sur la sertraline et le mélange d'antidépresseurs.

### VI.1. Effet de la sertraline.

La sertraline est la molécule d'intérêt testée dans ce test, elle a été choisie parmi les cinq molécules d'antidépresseurs car elle présente une forte toxicité chez plusieurs espèces aquatiques à des concentrations environnementales de 5,2 ng L<sup>-1</sup> pour *Pimephales promelas* (Schultz et al., 2011) et de 0,1 et 1 µg L<sup>-1</sup> pour *Xenopus laevis* (Connors et al., 2009).

Dans ce test les hydres adultes F0 (1<sup>ère</sup> génération) sont exposées à une gamme de concentration de 0 ; 0,0625 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 et 0,75 mg L<sup>-1</sup> de sertraline. Les hydrantes qui se détachent de ces hydres et qui correspondent donc à la génération F1 sont exposées aux mêmes concentrations de cette molécule que les adultes F0. Quand il y a des hydrantes F2 qui se détachent de cette génération F1, elles-sont placées dans du milieu contaminé comme précédemment. A la fin du test de chaque génération d'hydre, le nombre des hydrantes produites a été enregistré. Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau suivant, le score et le nombre d'hydrantes sont représentés par une moyenne ± l'erreur standard.

**Tableau 23.** Effet chronique de la sertraline sur la morphologie et la reproduction des hydres au cours des trois générations successives.

Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	F0		F1		F2	
	Score	Hydrantes	Score	Hydrantes	Score	Hydrantes
<b>Témoin</b>	<b>10,00±00</b>	<b>6,00±0,50</b>	<b>10,00±00</b>	<b>4,78±0,44</b>	<b>10,00±00</b>	<b>3,78±0,44</b>
62,5	9,22±0,67 <sup>a</sup>	6,22±0,97	8,89±0,78 <sup>a</sup>	4,44±1,01	9,78±0,44	3,44±0,73
125	8,67±0,50 <sup>b</sup>	6,33±1,20	8,22±0,44 <sup>b</sup>	4,44±0,53	9,22±0,44 <sup>a</sup>	3,33±0,71
250	8,00±0,87 <sup>b</sup>	5,44±0,88	7,78±0,67 <sup>b</sup>	4,33±0,71	8,44±0,53 <sup>b</sup>	3,22±0,44 <sup>a</sup>
500	7,89±0,78 <sup>b</sup>	5,56±0,88	7,56±0,88 <sup>b</sup>	3,78±0,83 <sup>a</sup>	8,22±0,44 <sup>b</sup>	3,00±0,50 <sup>a</sup>
750	6,67±1,00 <sup>b</sup>	5,56±1,24	6,22±0,67 <sup>b</sup>	3,22±0,97 <sup>a</sup>	6,00±00 <sup>b</sup>	2,44±0,53 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> et <sup>b</sup> indiquent le niveau de signification du score ou d'hydrantes respectivement pour les valeurs de  $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ .

L'exposition chronique des hydres adultes pendant les 10 jours de l'expérience montre une réduction significative des scores avec l'augmentation de la concentration en sertraline, comparativement à celle du témoin. Selon l'échelle de Wilby (Wilby, 1988), la morphologie a évolué du stade normal (score 10) au stade tulipe (score 6). Les deux stades 8 et 6 dominent à la plus forte concentration testée (750  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), successivement pour les hydres adultes F0 et les deux générations F1 et F2 (tableau 23). Toutefois, l'impact sur la morphologie a été démontré à de faibles concentrations de l'ordre de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Les LOECs de la molécule testée, basées sur la morphologie des hydres, ont été calculés à 62,5 ; 62,5 et 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivement pour les trois générations F0, F1 et F2 (tableau 23).

Le tableau 23 démontre aussi qu'il y a une réduction significative du nombre des hydrantes produites avec l'augmentation de la concentration du traitement pour les deux dernières générations F1 et F2. La LOEC basée sur la reproduction asexuée de l'hydre est de 500 pour la deuxième génération F1 et 250 pour la troisième génération F2 (tableau 24).

Les résultats du troisième paramètre biologique testé (la nutrition) ne sont pas notés dans le tableau 23 comme il n'y a pas de différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ) pour la capacité d'ingestion des Artémis entre les différentes concentrations de la même molécule au cours des trois générations d'hydres.

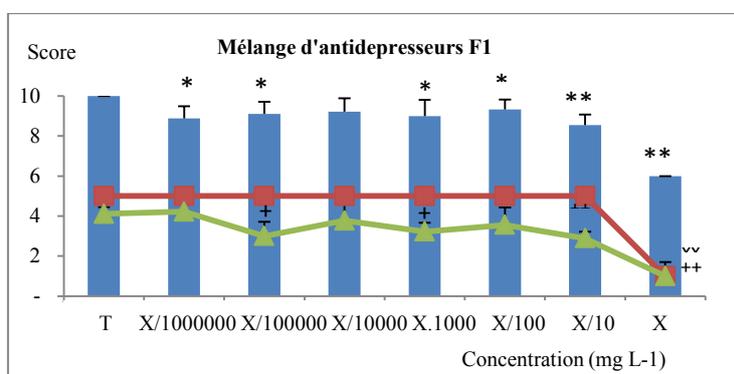
**VI.2. Effet du mélange d'antidépresseurs.**

Les résultats obtenus chez les adultes exposés au mélange d'antidépresseurs sont présentés dans le tableau 24.

**Tableau 24.** Valeurs des différentes LOECs basées sur le score, la reproduction et la nutrition des hydres exposées à la sertraline et au mélange d'antidépresseurs au cours des trois générations.

Génération	F0			F1			F2		
LOEC	Score	Reproduction	Nutrition	Score	Reproduction	Nutrition	Score	Reproduction	Nutrition
Sertraline	62,5	/	/	62,5	500	/	125	250	/
Mélange d'antidépresseurs	X/100000	X	/	X/100000	X/100000	X	X/10	/	/

L'effet du mélange sur la reproduction de la deuxième génération d'hydre est significativement négatif à partir d'une LOEC de X/100000 mg L<sup>-1</sup> (tableau 24). Cette concentration est 10<sup>5</sup> fois inférieure à celle de la première génération. Pour la plus forte concentration X mg L<sup>-1</sup> (figure 36), il y a un effet significativement négatif, non seulement sur la reproduction, mais aussi sur la nutrition (figure 36). A cette concentration on observe que les hydrantes n'achèvent pas leur développement, elles deviennent plus petites que leurs tailles normales, leur capacité de nutrition diminue et pour certains individus elles perdent totalement leur capacité de reproduction et deviennent stériles. Après les 10 jours du test, nous avons transférés ces hydres dans un milieu hydre non contaminé, nous avons observé qu'elles ont fini par mourir.



**Figure 36.** Effet du mélange d'antidépresseurs sur les différents paramètres biologiques testés sur la deuxième génération d'hydre F1.

(\*,\*\*), (<sup>x</sup>,<sup>xx</sup>) et (<sup>+</sup>,<sup>++</sup>) indiquent les seuils de signification du score, de la nutrition, du nombre de hydrantes, respectivement. (p<0,05 et p<0,001 ; tests paramétriques (ANOVA) et non paramétriques Kruskal Wallis et Mann Whitney).

## 2<sup>ème</sup> PARTIE. POTENTIEL ANDROGENIQUE ET CYTOTOXICITE DES PRODUITS PHARMACEUTIQUES.

L'objectif de cette deuxième étude a été d'évaluer *in vitro* le potentiel androgène et cytotoxique de quelques produits pharmaceutiques sur les lignées cellulaires MDA-Kb2.

Le modèle MDA-Kb2 utilisé au laboratoire est un outil efficace pour la détection des perturbateurs endocriniens du fait qu'il répond bien à l'agoniste principal du récepteur aux androgènes (la testostérone) et également à un antagoniste bien décrit dans la littérature scientifique : le flutamide.

### I. Effets androgéniques des composés testés

Dans le but de détecter une activité androgénique (AR) agoniste ou antagoniste des composés testés nous avons effectué une étude des effets androgéniques des différents composés en utilisant l'essai gène rapporteur des cellules MDA-Kb2.

#### I.1. Réponse du modèle MDA-Kb2 à la testostérone

Au vue de la figure 37, en absence de traitement à la testostérone, les cellules MDA-Kb2 émettaient une faible intensité de luminescence qui correspondait à leur niveau basal de luminescence de 50,5, après 24 heures de stimulation par la testostérone à 1 nM, l'intensité absolue de luminescence était significativement augmentée à 212,5. Cette augmentation correspondait à une intensité 3,4 fois supérieures à la luminescence des cellules témoin (contrôle DMSO, 62,2).

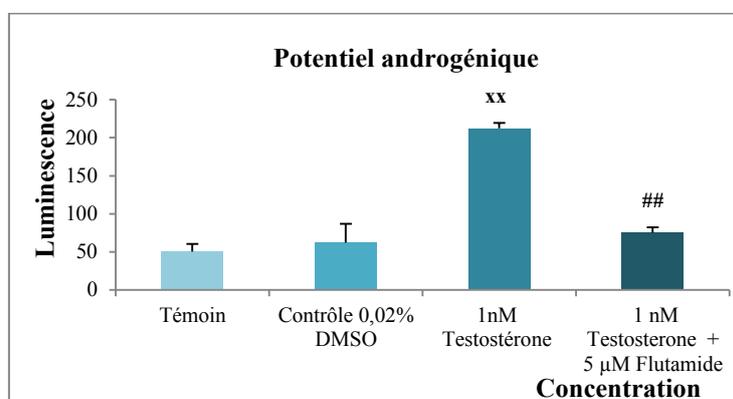


Figure 37. Essai agoniste et antagoniste du récepteur aux androgènes.

## **I.2. Réponse du modèle MDA-Kb2 à un antagoniste connu : le flutamide**

Dans cette partie nous avons voulu savoir si la réponse des cellules MDA-Kb2 à la testostérone était inhibée par le traitement avec un antagoniste des récepteurs aux androgènes. Nous avons utilisé la flutamide à 5  $\mu\text{M}$  comme témoin d'activité antagoniste et nous avons obtenu que cette molécule diminuait significativement l'intensité de luminescence induite par la testostérone de 127 à 50,5 pour le témoin 1 nM de testostérone.

5  $\mu\text{M}$  de flutamide permettait d'annuler l'induction de la luminescence par la testostérone (1 nM) générant la diminution. L'intensité de la luminescence produite par les cellules ainsi traitées (70) était alors proche de celle du niveau d'expression basal de la luminescence cellulaire (50,5).

## **II. Effet androgénique des produits pharmaceutiques testés utilisant le modèle MDA-Kb2**

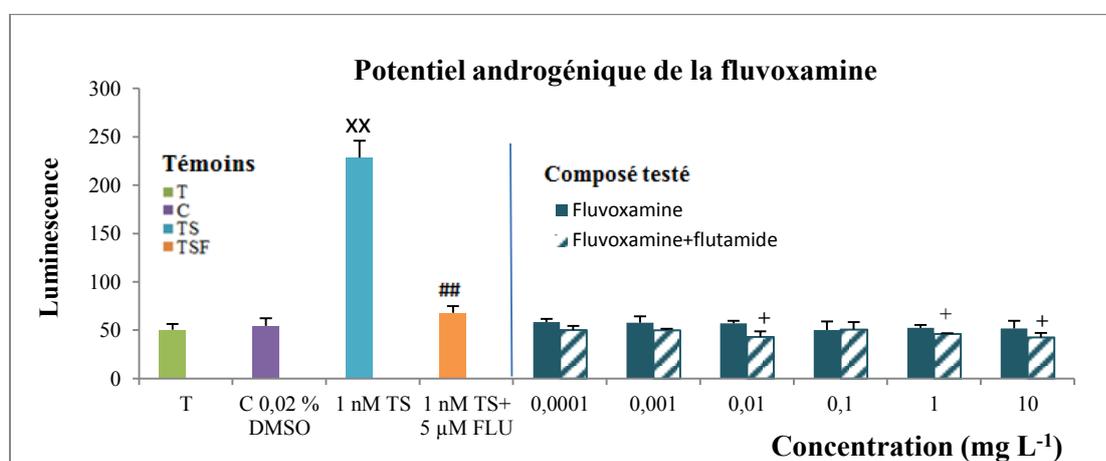
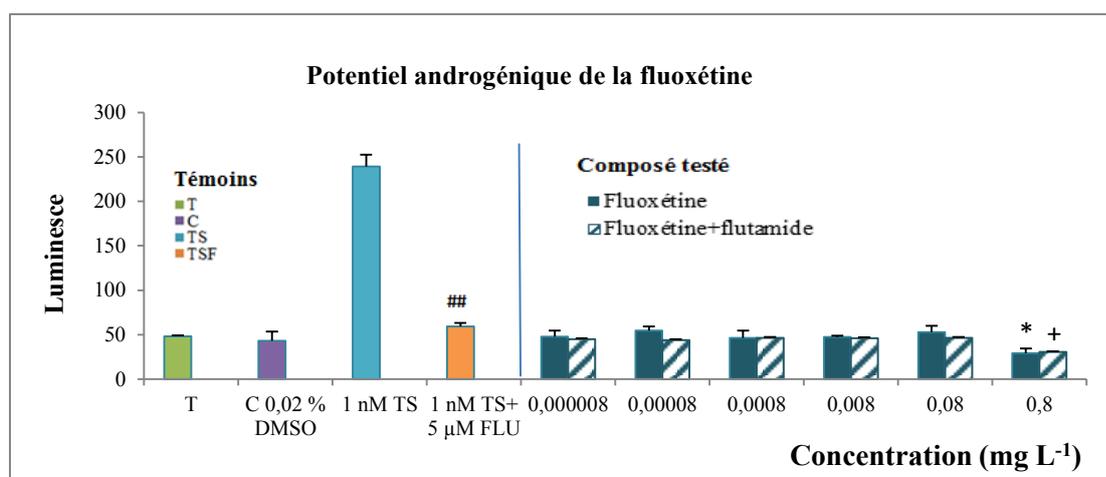
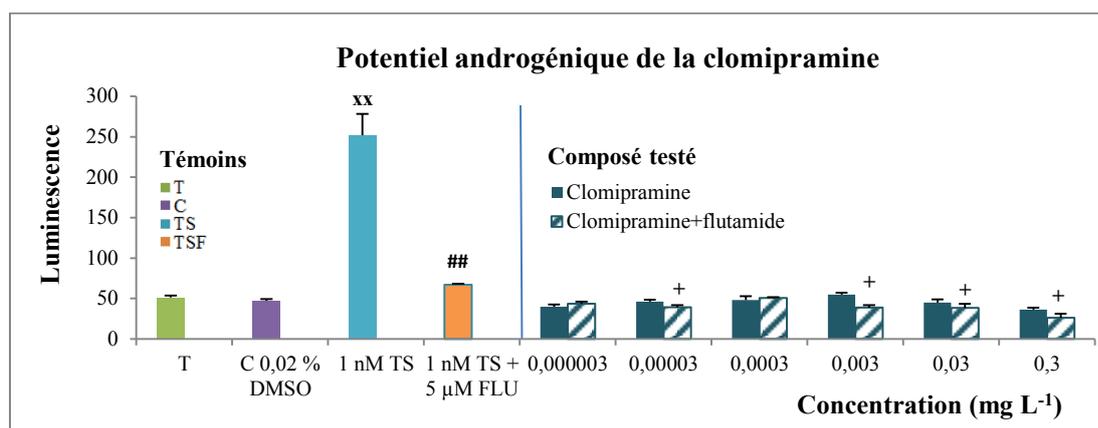
Pour la réalisation des essais MDA-Kb2 suivants, nous avons choisi de garder la concentration en testostérone de 1 nM comme témoin agoniste et une concentration en testostérone de 1 nM additionnée d'une concentration de flutamide à 5  $\mu\text{M}$  comme témoin antagoniste pour s'assurer que dans tous les tests les cellules répondent aux androgènes.

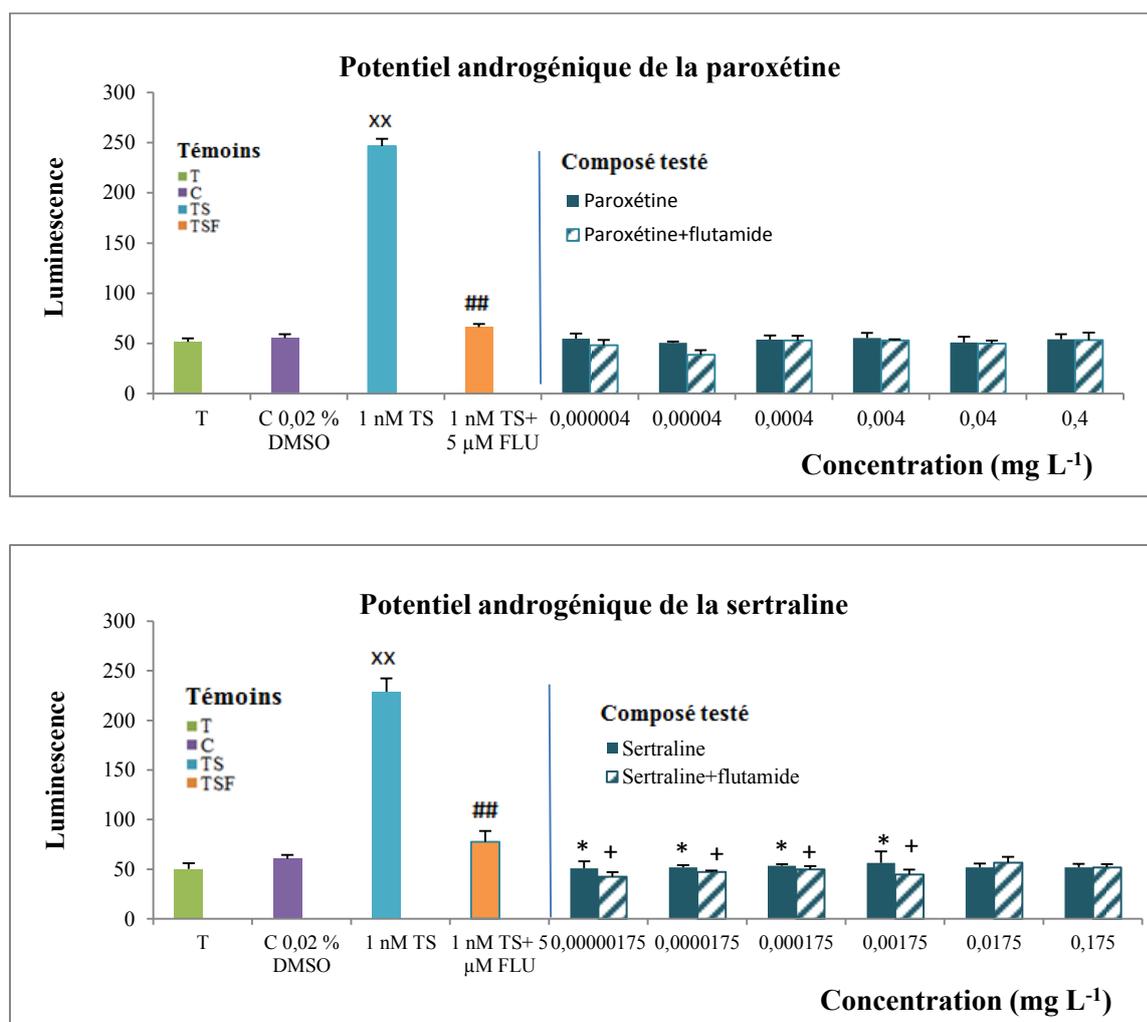
L'ensemble des résultats obtenus lors de ces essais montrent que les cellules sont sensibles à un traitement à la testostérone de 24 heures et que l'effet de cette dernière est inhibé par l'effet de la flutamide dans tous les tests.

### **II.1. Effets androgéniques des antidépresseurs testés**

Dans le but de détecter une activité AR agoniste de ces composés nous avons effectué une étude des effets androgéniques de ces molécules. Les composés pharmaceutiques ont été jugés androgènes lorsque leur luminescence est au-dessus de celle du contrôle de DMSO.

Les résultats présentés figure 38 indiquent que l'exposition des cellules à différentes concentrations de composés n'affectait pas le niveau d'expression de la luminescence. Seulement deux antidépresseurs sérotoninergiques induisent une diminution significative de la luminescence pour des concentrations de 0,8  $\text{mg L}^{-1}$  de la fluoxétine et de  $0,175 \cdot 10^{-2}$  ;  $0,175 \cdot 10^{-3}$  ;  $0,175 \cdot 10^{-4}$  et  $0,175 \cdot 10^{-5}$   $\text{mg L}^{-1}$  de la sertraline.



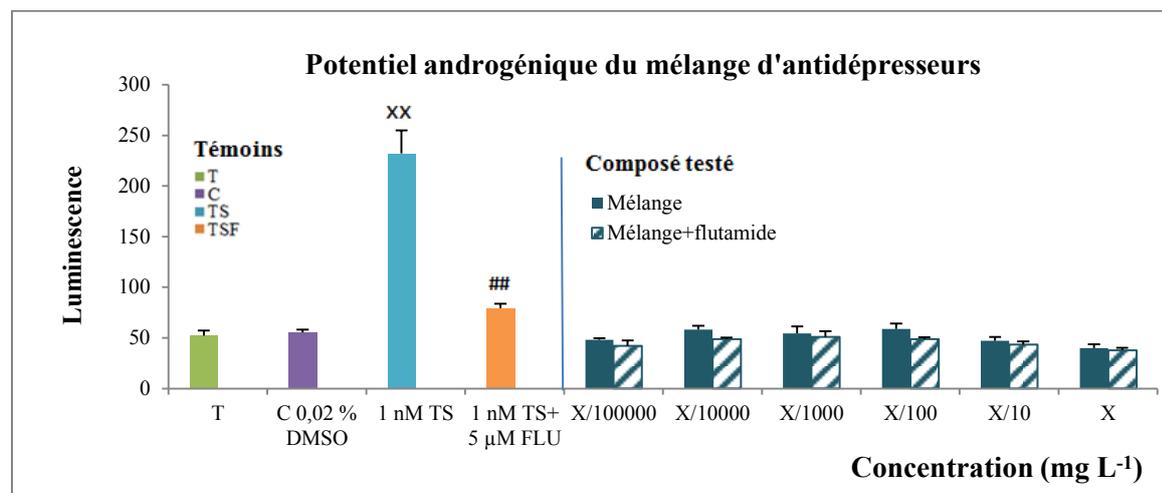


**Figure 38.** Evaluation du potentiel androgénique des différentes molécules d’antidépresseurs testées.

Ces mêmes essais sur ces molécules d’antidépresseurs ont été réalisés avec l’ajout de 5 μM de flutamide à chaque concentration. Les résultats de ces tests sont montrés dans les mêmes graphiques de la figure 38 et présente une réduction de la luminescence pour quelques concentrations de toutes les molécules d’antidépresseurs testées à l’exception de la paroxétine. Cette diminution est significative pour toutes les concentrations testées de la clomipramine par rapport au contrôle DMSO à 0,02 %, pour 0,01 ; 1 et 10 mg L<sup>-1</sup> de la fluvoxamine, pour 0,175.10<sup>-2</sup> ; 0,175.10<sup>-3</sup> ; 0,175.10<sup>-4</sup> et 0,175.10<sup>-5</sup> mg L<sup>-1</sup> de la sertraline et pour la plus forte concentration de la fluoxétine à 0,8 mg L<sup>-1</sup> (figure 38).

Les résultats de mélange d’antidépresseurs présentés dans la figure 36 montrent que seulement à la plus forte concentration testée X le mélange diminué significativement la

luminescence et que cette même concentration additionnée à 5  $\mu\text{M}$  du flutamide présente une légère diminution non significative par rapport au témoin solvant DMSO à 0,02 %.



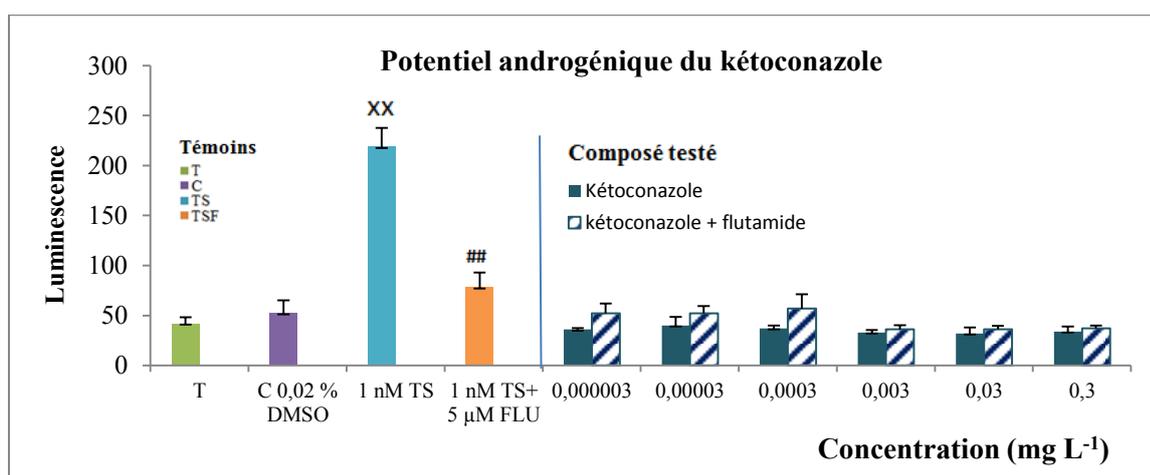
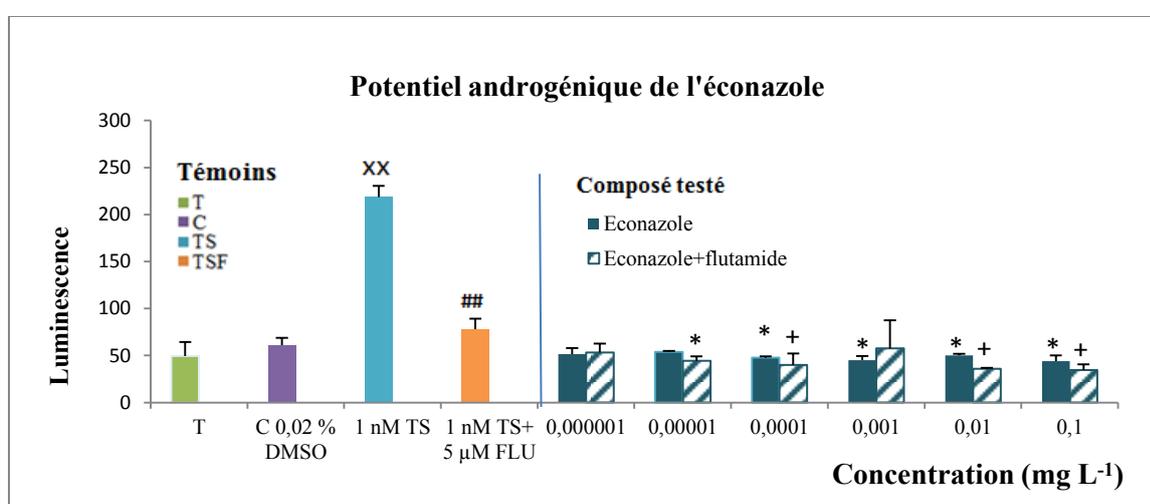
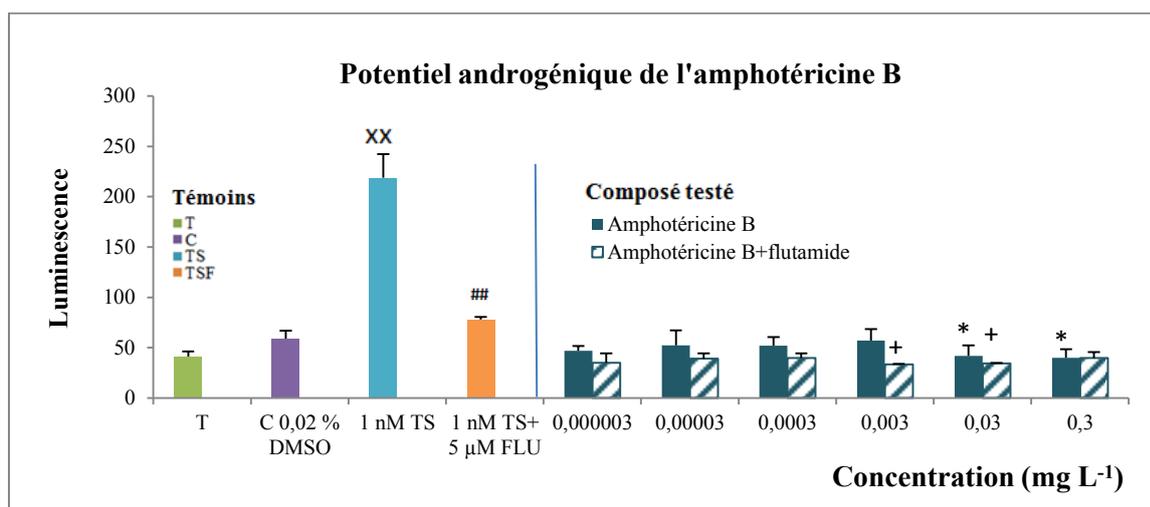
**Figure 39.** Evaluation du potentiel androgénique du mélange d'antidépresseurs.

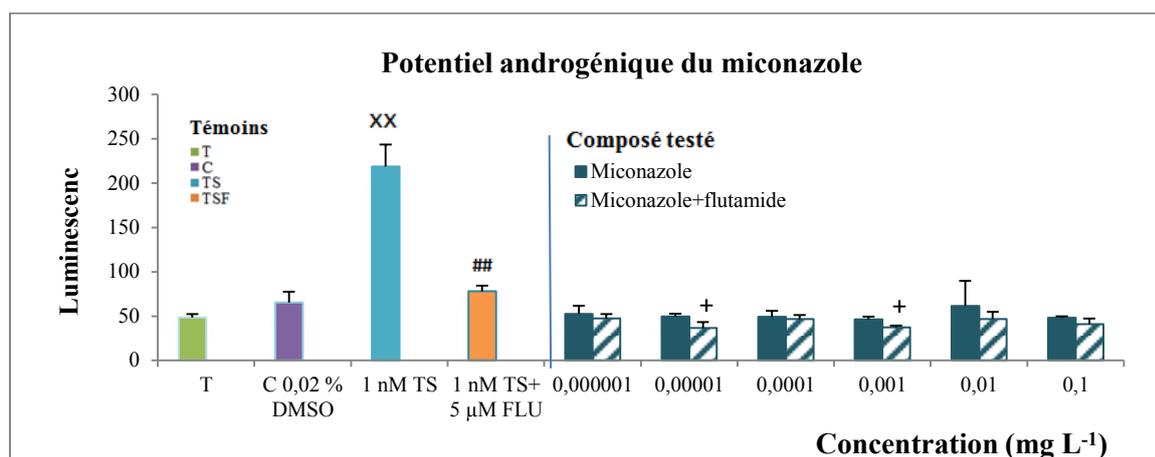
## II.2. Effets androgéniques des antifongiques testés

Comme pour les antidépresseurs, aucune de ces molécules d'antifongique n'a d'impact sur l'augmentation de l'intensité de luminescence. Parmi ces molécules, seul le miconazole ne présente pas d'impact significatif sur la diminution de luminescence pour toutes les concentrations testées. Pour le reste des molécules, nous observons que la réduction de l'intensité lumineuse est significative seulement pour les plus fortes concentrations testées.

L'ajout de 5  $\mu\text{M}$  de flutamide à des différentes concentrations de molécules d'antifongiques testées ne présente aucun effet sur l'augmentation de l'intensité de luminescence. Cependant, ce complexe (flutamide-antifongique) peut provoquer des diminutions significatives pour quelques concentrations de l'amphotéricine B, de l'éconazole et de la miconazole.

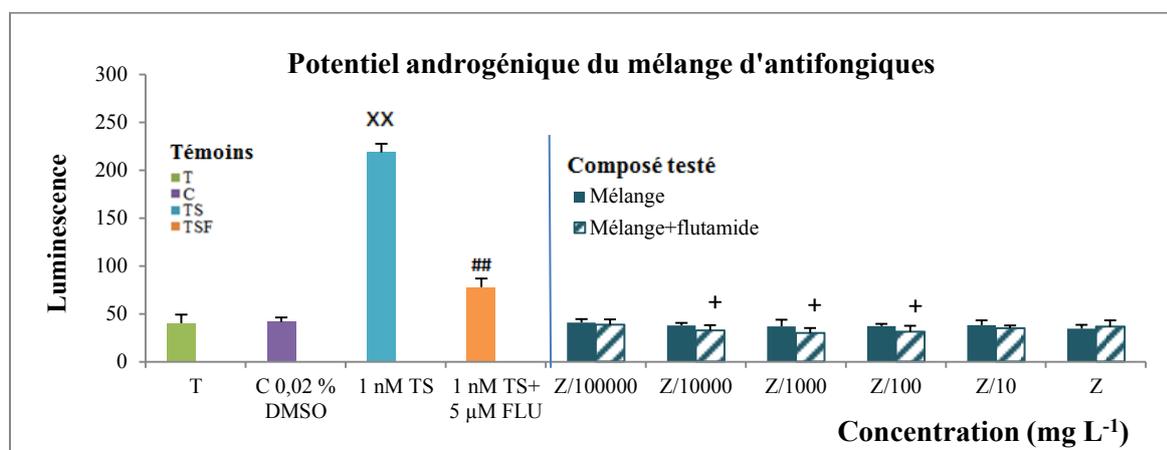
En comparant les résultats des molécules testées avant et après l'ajout de la flutamide dans la figure suivante, nous trouvons que le miconazole a un impact significatif sur la diminution de la luminescence mais seulement après l'ajout de la flutamide. Il est clair aussi que l'interaction de la flutamide avec l'éconazole induit à une réduction plus considérable que lorsqu'il est testé seul (figure 40).





**Figure 40.** Evaluation du potentiel androgénique des différentes molécules d'antifongiques testées.

La figure suivante nous montre que le mélange d'antifongiques n'a aucun effet sur l'augmentation ou la réduction de l'intensité lumineuse pour toutes les concentrations testées. L'addition de la flutamide aux différentes concentrations de ce mélange présente un effet significativement négatif seulement pour trois concentrations Z/10 ; Z/1000 et Z/10000.

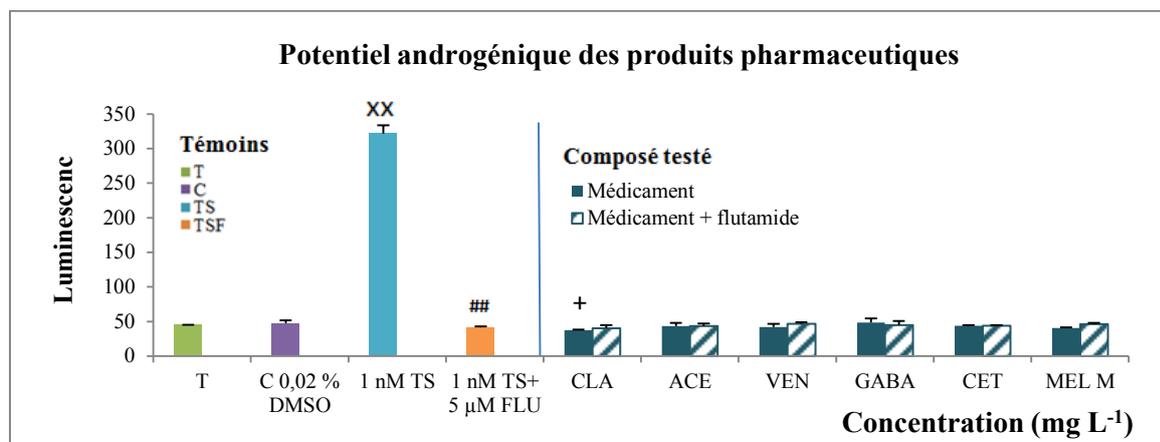


**Figure 41.** Evaluation du potentiel androgénique du mélange d'antifongique.

### II.3. Effets androgéniques des autres classes de médicament.

Nous avons étudié cinq molécules qui appartiennent aux différentes classes thérapeutiques à des concentrations environnementales. Ces molécules sont : la clarithromycine (CLA), l'acébutolol (ACE), la venlafaxine (VEN), la gabapentine (GABA) et la cétirizine (CET). Les résultats présentés dans la figure 42 nous montrent que la clarythromicine induit une

légère diminution de l'intensité de luminescence (statistiquement significative). Aucune des autres molécules n'affectent la production de lumière.



**Figure 42.** Evaluation du potentiel androgénique des différents produits pharmaceutiques testés seuls et en mélange.

Les résultats du mélange constitué de ces mêmes molécules à une concentration environnementale nommée M sont montrés dans la figure suivante. Nous observons que ces résultats sont les mêmes, avec ou sans l'ajout de la flutamide, et que ces résultats ne présentent aucun effet significatif. Ce mélange réagit comme la majorité des molécules qui le constituent.

### III. Cytotoxicité des composés testés.

L'adaptation de test MTT mesurant l'activité métabolique des cellules a permis de quantifier la cytotoxicité des composés chimiques dans le système de culture obtenu. Les résultats sont exprimés en unité luminescence puis ils sont transformés en pourcentage afin d'estimer le nombre de cellules mortes et vivantes pour chaque composé testé.

#### III.1. Cytotoxicité des témoins positifs « testostérone et flutamide ».

La cytotoxicité de la flutamide et la testostérone a été utilisée comme témoin agoniste et antagonistes aux androgènes dans les essais précédant. Les résultats montrent que la testostérone testée seule et la combinaison de la testostérone avec la flutamide n'affectent pas la viabilité cellulaire.

### III.2. Cytotoxicité des antidépresseurs.

La plupart des molécules d'antidépresseurs induisent une diminution significative de luminescence par rapport au témoin et au contrôle DMSO. Cette diminution de la viabilité est confirmée par une augmentation des taux de mortalités (figure 43). Les résultats montrent que la fluoxétine et la paroxétine ne sont toxiques pour les cellules aux concentrations maximales testées respectivement de 0,8 et 0,4 mg L<sup>-1</sup>. Ce taux de mortalité aussi sont enregistrés pour de faibles concentrations de la clomipramine (0,0003 mg L<sup>-1</sup>) et de de la fluvoxamine (0,0001 et 0,01 mg L<sup>-1</sup>).

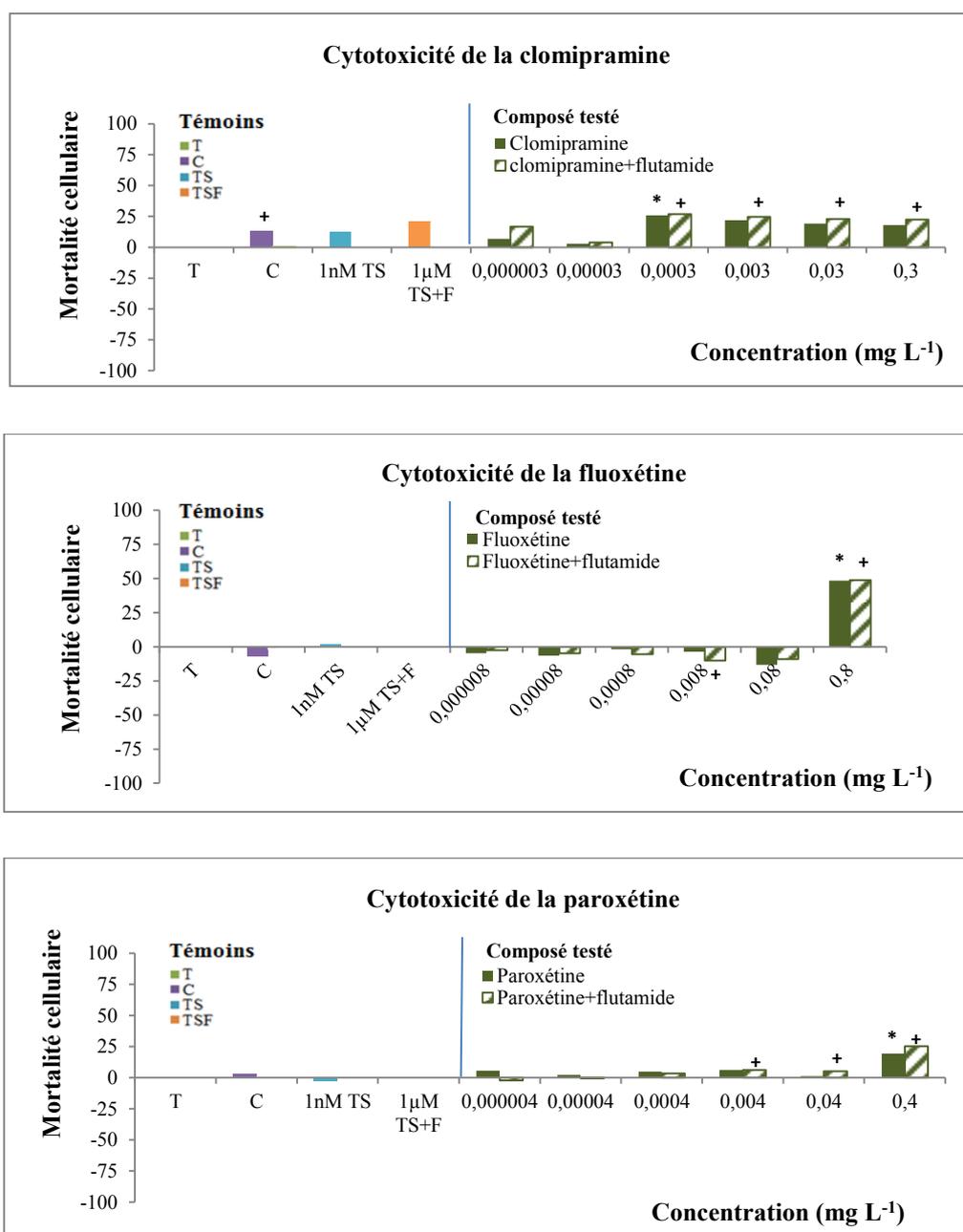
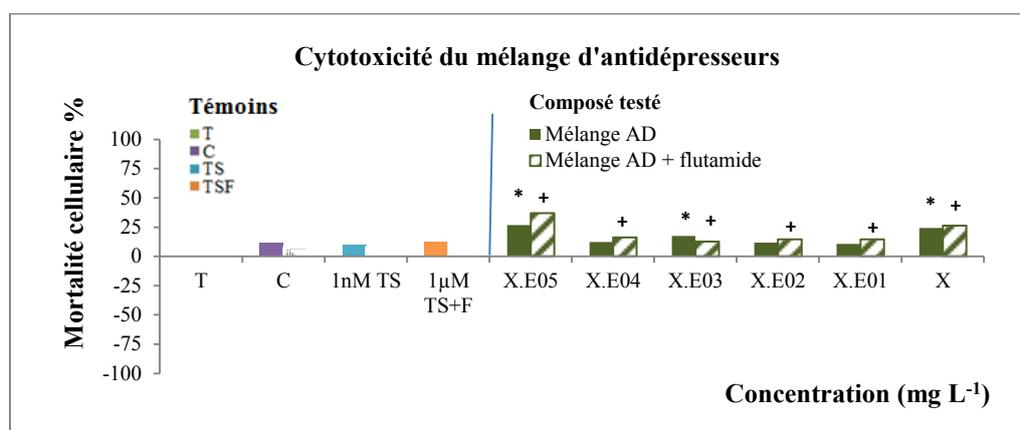


Figure 43. Cytotoxicité des différentes molécules testées d'antidépresseurs.

Pour l'ensemble de ces résultats nous observons que la fluoxétine est la seule molécule qui provoque un taux de mortalité de 50% à la plus forte concentration testée (0,8 mg L<sup>-1</sup>) et peut induire une faible prolifération cellulaire non significative pour le reste des concentrations testées.

Le graphe suivant (figure 44) nous montre que le mélange d'antidépresseurs induit à une mortalité des cellules. Les effets sont plus importants pour la plus faible et la plus forte concentration.



**Figure 44.** Cytotoxicité du mélange d'antidépresseurs.

En ce qui concerne le reste des molécules pharmaceutiques testées seules ou en mélange, les résultats montrent qu'aucun de ces molécules n'est cytotoxique. Seulement quelques concentrations d'éconazole et de kétoconazole peuvent provoquer une mortalité cellulaire à un taux faible que nous pourrions négliger.

# DISCUSSION

## **I. TOXICITE DE SUBSTANCES MEDICAMENTEUSES SUR LE MODELE HYDRE.**

Ce chapitre a pour objectif de replacer les résultats obtenus dans la problématique générale de cette thèse en montrant quels sont les effets toxiques, cytotoxiques et androgènes des différentes molécules médicamenteuses trouvées dans l'environnement. Il s'agira également de discuter de manière critique la démarche expérimentale, et enfin de montrer l'intérêt de ce travail.

*Hydra attenuata* est une espèce qui possède un système nerveux très primitif. Plusieurs études ont montré l'existence de plusieurs neurotransmetteurs dans les hydres, y compris la sérotonine et le GABA. Cette espèce possède un système immunitaire inné qui lui permet de survivre, se régénérer et de lutter contre les infections. Elle a une possibilité de développement complet qui persiste tout au long de la vie de l'animal et elle se reproduit principalement de façon asexuée par bourgeonnement, lorsque les conditions sont favorables et avec abondance de nourriture. Ce micro-invertébrés a déjà été utilisé avec succès pour évaluer la toxicité des produits pharmaceutiques sur la morphologie, la régénération et le développement des hydres (Pascoe et al, 2003 ; Blaise et al., 2006; Pachura-Bouchet et al., 2006 ; Quinn et al., 2009).

Notre protocole expérimental a été conçu pour permettre une comparaison directe entre la sensibilité des embryons et des hydres adultes exposés aux antidépresseurs testés seuls et en mélange, aux antifongiques testés seuls et en mélange et à un mélange de plusieurs molécules médicamenteuses représentatives de l'environnement en termes de familles de molécules et de concentrations testées.

### **I.1. Toxicité aiguë.**

#### **I.1.1. Sur les hydres adultes**

Les tests de la toxicité aiguë sur les hydres adultes et les embryons ont été réalisés en utilisant plusieurs gammes de concentrations pour neuf molécules médicamenteuses, cinq antidépresseurs et quatre antifongiques. Dans notre étude, la toxicité aiguë de ces molécules sur les hydres adultes et les embryons a montré un effet délétère sur la morphologie, la survie et le développement. Selon la directive européenne 93/67/CEE (UE, 2003), qui classe les substances en fonction de leurs valeurs de CE50 pour le cnidaire *Hydra attenuata* dans différentes classes: l'éconazole et le miconazole (0,84 et 0,94 mg L<sup>-1</sup>) seraient considérées comme très toxiques, l'amphotéricine B, la clomipramine, la fluoxétine, le kétoconazole, la paroxétine et la sertraline (1,75 à 8 mg L<sup>-1</sup>) toxiques et la fluvoxamine (supérieure à 100 mg L<sup>-1</sup>) non toxique pour les hydres adultes. En comparant le degré de toxicité de ces molécules

sur l'hydre, le miconazole, l'éconazole et la sertraline sont les plus toxiques et la fluvoxamine apparaît comme la molécule la moins sensible pour les adultes et les embryons. Cette différence peut s'expliquer par le mode d'action des molécules testées ou par leurs caractéristiques physico-chimiques (structure chimique, solubilité et  $\log K_{ow}$ ).

Etant donné que le mode d'action des substances médicamenteuses est mal connu chez les invertébrés d'eau douce et chez les hydres en particulier, la toxicité de ces molécules est expliquée par un coefficient de partage octanol-eau ( $\log K_{ow}$ ) traduisant une action en partie liée aux propriétés hydrophobes des composés. Ce coefficient rend compte de la tendance d'un polluant à se solubiliser et s'accumuler dans les membranes des organismes vivants.

Les antifongiques azolés sont très peu solubles dans l'eau surtout pour le kétoconazole ; ils sont lipophiles contrairement aux molécules d'antidépresseurs sérotoninergiques testées qui sont sous forme d'hydrochloride. Les antidépresseurs sérotoninergiques possèdent un faible  $\log K_{ow}$  qui varie entre 1,21 à 1,37 respectivement pour la fluvoxamine et la sertraline. Cette dernière est la molécule la moins hydrophile des ISRSs testés et qui présente la valeur la plus élevée du  $\log K_{ow}$ , ce qui pourrait expliquer sa forte toxicité. Des résultats similaires ont été trouvés par plusieurs chercheurs (Henry et al., 2004 ; Christensen et al., 2007 ; Minguez et al., 2014) et sur plusieurs organismes aquatiques *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia* et *Daphnia magna*. Minguez et al. (2014) ont conclu que la toxicité aiguë des antidépresseurs testés sur *Daphnia magna* est corrélée avec le coefficient  $\log K_{ow}$ . Les différences dans les valeurs de CE50 des tests aigus sur les hydres adultes et embryons dépendaient principalement des valeurs de  $\log K_{ow}$  des différentes molécules testées. Ainsi, la désintégration complète des hydres observées avec certains antifongiques serait corrélée avec les valeurs élevées de  $\log K_{ow}$ , comme pour le miconazole, l'éconazole et le kétoconazole dont les  $\log K_{ow}$  sont respectivement de 6,1 ; 5,5 et 4,31.

### **I.1.2. Sur les embryons**

Depuis le début des années quatre-vingt, les hydres ont été utilisées pour détecter le potentiel tératogène de produits chimiques en raison de leur capacité de régénération remarquable. Au début, les travaux ont été menés sur des cellules dissociées (Johnson et al., 1982) et plus tard Wilby (1988) a recommandé l'utilisation de sections gastriques disséqués à partir d'organismes adultes et constituées de cellules souches multipotentes actives pour étudier la régénération. Notre étude a permis d'évaluer l'impact de molécules

médicamenteuses sur le développement des sections gastriques de l'hydre et de suivre leur capacité à régénérer un organisme entier, pour en déduire les effets tératogènes.

Le développement de l'embryon en hydre adulte nécessite une durée de quatre jours. Certaines molécules comme la fluvoxamine montrent des toxicités assez faibles, avec des valeurs de  $CE_{50} > 29,13 \text{ mg L}^{-1}$ . Cette molécule est classée comme vulnérable pour les embryons comme la valeur de  $CE_{50}$  est comprise entre 10 et  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Cette classification est appliquée par la directive européenne en 2003. La plupart des composés testés perturbent la régénération et le développement des hydres, leurs  $CE_{50}$  sont de l'ordre de  $\text{mg L}^{-1}$ , sauf pour les deux molécules d'antifongiques azolés notamment le miconazole et l'éconazole qui sont de l'ordre du  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Ces seuils de concentrations sont au-dessus des niveaux de concentrations retrouvés dans l'environnement (de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  à quelques  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), donc le risque aigu lié à ces molécules apparaît par conséquent négligeable contrairement au risque chronique qui ne peut être exclu et doit être évalué de manière plus approfondie.

### **I.1.3. Sur l'indice de risque pour le développement (A/D)**

L'indice de risque pour le développement (A/D) a été calculé en divisant de la concentration efficace induisant 50% de mortalité ( $CE_{50}$ ) des adultes par celles obtenues pour les embryons, et ce pour chaque molécule testée. Si le ratio obtenu est inférieur à 1 la molécule n'est considérée comme toxique que pour les adultes. Lorsque le ratio obtenu est supérieur à 1, cela montre que la molécule testée perturbe le développement. Selon Johnson et al. (1987) si un ratio supérieur à 3 est obtenu, des essais sur vertébrés doivent être envisagés pour mieux caractériser le risque tératogène. Nos résultats conduisent à des ratios relativement élevés, compris entre 1,09 et 2,8 pour les molécules d'antifongiques et supérieurs à 3 pour la fluvoxamine, ce qui suggère que la substance interfère avec le développement de l'embryon sans exercer de toxicité chez l'adulte pour la même concentration (effet sélectif sur le développement). La clomipramine présente une toxicité à des concentrations équivalentes chez l'adulte et l'embryon, et la fluoxétine, la paroxétine et la sertraline sont plus toxiques sur les adultes.

## **I.2. Toxicité chronique**

### **I.2.1. Les antidépresseurs**

Les essais de toxicité chronique chez les adultes et les embryons montrent qu'il existe un effet dose-réponse. La réduction du score est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de chaque antidépresseur testé seul. Les hydres adultes réagissent à ces

composés en contractant leurs tentacules et leur corps. Ces antidépresseurs sont mesurés dans les écosystèmes aquatiques à des concentrations de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  (Santos et al., 2010) alors que les effets que nous avons mis en évidence conduisent à des valeurs de NOEC et de LOEC ( $\mu\text{g L}^{-1}$  à  $\text{mg L}^{-1}$ ) bien supérieures aux niveaux de concentrations environnementales. En effet, la concentration la plus faible qui affecte la morphologie des hydres adultes est de  $62,5\mu\text{g L}^{-1}$  pour la sertraline, ce qui est plus élevée que les concentrations retrouvées dans l'environnement.

Les résultats du test chronique montrent aussi que l'exposition des adultes aux différents antidépresseurs n'affecte pas la capacité d'ingestion des artémies contrairement aux embryons, la paroxétine par exemple, aux mêmes concentrations de 1,5 et 2  $\text{mg L}^{-1}$ . Seuls les embryons ont été incapables de se nourrir, ce qui démontre un effet des antidépresseurs sérotoninergiques et tricycliques sur la capacité de nutrition des embryons, mais toujours à des concentrations élevées, de l'ordre du  $\text{mg L}^{-1}$ . Le comportement alimentaire de l'hydre a attiré l'attention de plusieurs chercheurs depuis les années 50. Il est modulé par le glutathion (GSH) (Loomis, 1955 ; Lenhoff, 1981). En 1997, Colasanti et ses collaborateurs ont trouvé que la GSH peut s'altérer par l'oxyde nitrique (d'azote). Elle peut produire une augmentation de la production de NO dont l'effet inhibé par l'acide glutamique ou l'acide  $\alpha$ -aminoadipique, qui entre en compétition avec le GSH sur l'un des deux sites de liaison des récepteurs de glutamate (Bellis et al., 1991, 1992).

Il est connu que l'alimentation est le stimulus le plus important pour le bourgeonnement : plus l'individu se nourrit, plus le taux de bourgeonnement augmente. Shostak (1993) rapporte que quel que soit le régime alimentaire de l'hydre, la taille du corps reste constante, suggérant qu'elle régule son taux de bourgeonnement plutôt que d'ajuster sa taille. Ceci pourrait expliquer le lien que nous avons observé entre la réduction de la production d'hydrantes et la diminution de la nutrition chez les embryons exposés aux concentrations les plus élevées d'antidépresseurs.

Pourtant, pour les faibles concentrations testées qui sont supérieures ou égales à 0,280  $\text{mg L}^{-1}$  de fluoxétine, 0,625  $\text{mg L}^{-1}$  de fluvoxamine et de 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de sertraline, le nombre d'hydrantes produites est diminué alors que la capacité de nutrition des individus n'est pas affectée (pas de différence avec les témoins). Ces résultats peuvent s'expliquer par le stress que l'hydre a subi après son exposition à long terme aux antidépresseurs, il est possible qu'elle ait diminué son taux de reproduction afin de consacrer son énergie dans la détoxification de son organisme pour les fortes concentrations testées. Pour les plus faibles concentrations, il

est possible qu'elles s'accumulent dans le tissu de l'hydre et deviennent de plus en plus toxiques surtout que cette classe de médicaments présente un potentiel de bioaccumulation chez plusieurs organismes aquatiques.

Dans la littérature, la fluoxétine et la sertraline sont les molécules les plus documentées. Les études préoccupent plusieurs chercheurs en raison de leurs fortes toxicités par rapport aux autres antidépresseurs sérotoninergiques testés. Ces molécules peuvent perturber la reproduction sexuée et asexuée des espèces aquatiques appartenant aux différents maillons de la chaîne trophique et qui ont un rôle très important dans la structuration planctonique des écosystèmes aquatiques. La fluoxétine altère les taux de stéroïdes sexuels chez les invertébrés, en diminuant la fécondité de *Ceriodaphnia dubia* à  $14 \mu\text{g L}^{-1}$  (Brooks et al., 2003a) et en réduisant le nombre de nouveau-nés par femelle de cette espèce pour des concentrations minimales LOEC de  $0,44 \text{ mg L}^{-1}$  (Henry et al., 2004). Elle agit sur l'embryogenèse de *Daphnia magna* (Péry et al., 2008) par une amélioration de sa reproduction à une concentration de  $36 \mu\text{g L}^{-1}$  (Flaherty et Dodson, 2005) et elle inhibe la croissance des algues vertes *P. subcapitata* (Brooks et al., 2003a). La sertraline peut avoir les mêmes effets sur cette espèce ainsi que sur la survie des crustacés *Daphnia magna* (Christensen et al., 2007), la CL50 48 h pour laquelle cette molécule affecte la survie des cériodaphnie *C. dubia* est de  $120 \mu\text{g L}^{-1}$ , elle a aussi un effet négatif sur la reproduction en réduisant le nombre des nouveaux nés par femelle pour une LOEC de  $45 \mu\text{g L}^{-1}$  et une NOEC de  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  (Henry et al., 2004). Les tests d'écotoxicologie réalisés par Minagh et al., 2009 ont montrés que la sensibilité des différentes espèces vis-à-vis de cette molécule est différente et que le test de reproduction-21 jours de *Daphnia magna* est plus sensible que celui d'inhibition de la croissance-72h de *Pseudokirchneriella subcapitata*, de la survie- 96h de *Oncorhynchus mykiss* et du test de microtox. Une étude menée par Valenti et al., 2009 montre que les tests de toxicité aiguë 48h et chronique 7 jours sur *Pimephales promelas* exposés à la sertraline a un effet adverse sur la survie, la croissance et le taux de nutrition. Les effets sont plus prononcés lorsque les individus ont été exposés à la sertraline au pH 8,5 par rapport à pH 7,5 et 6,5. Ces auteurs ont bien montrés que la sertraline est la plus toxique des ISRSs testés. Ils ont montrés aussi que les seuils nécessaires de concentrations pour atteindre des effets toxiques de la fluoxétine et la sertraline chez ces organismes aquatiques sont élevés par rapport à ceux retrouvés dans l'environnement. La plus forte concentration par exemple de la fluoxétine qui a été trouvée jusqu'à présent dans le monde est seulement de  $3,65 \mu\text{g L}^{-1}$  dans les affluents des stations d'épurations en Portugal, cette valeur a été enregistrée par Salgado et al. (2011) dans les effluents des stations d'épurations en Portugal.

D'autres auteurs ont montrés que la sertraline peut induire des effets néfastes à des concentrations environnementales. Selon Connors et al., 2009 cette substance peut causer une toxicité sur le développement des têtards *Xenopus laevis* à 0,1 and 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . L'exposition chronique de 21 jours du mâle de *Pimephales promelas* à la sertraline cause sa mortalité à 5,2  $\text{ng L}^{-1}$  (Schultz et al., 2011).

Dans les masses d'eau, les substances pharmaceutiques sont présentes en mélange, avec plusieurs classes de médicament (Gros et al., 2007) qui peuvent avoir des modes d'actions similaires ou différents, conduisant à de possibles effets de synergie, d'additivité ou d'antagonisme sur les organismes aquatiques durant tout leur cycle de vie. Selon Cleuvers (2003 et 2004), un mélange de composés qui ont des modes d'action similaires peut résulter en un effet d'addition de concentrations. Cet effet est marqué pour le mélange des ISRSs dans certains tests d'écotoxicité sur *D. magna*, *P. subcapitata* (Christensen et al., 2007) et sur *C. dubia* (Henry et Black, 2007), ces derniers auteurs ont considéré que des effets de la toxicité aiguë chez les organismes aquatiques peuvent être additifs pour chaque ISRS dans un mélange. Dans cette étude, nous avons testé la toxicité du mélange des ISRSs et d'un antidépresseur tricyclique. La toxicité du mélange d'antidépresseurs composé de clomipramine, fluoxétine, fluvoxamine, paroxétine et sertraline sur les hydres est beaucoup plus importante que celle des composés testés séparément. La LOEC pour la substance la plus toxique (sertraline testée seule) est de 62,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  et passe à une centaine de  $\text{ng L}^{-1}$  ( $X \text{ ng L}^{-1}$ ) lors exposition conjointe aux autres molécules testées. Les effets du mélange, sont  $10^4$  fois supérieurs à ceux des molécules testées individuellement, ce qui suggère que ce mélange d'antidépresseurs peut exercer un effet synergétique.

L'exposition chronique au mélange d'antidépresseurs présente une toxicité plus élevée sur les adultes que sur les embryons, avec une concentration minimale pour le mélange de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  qui affecte la morphologie des adultes. Ce niveau de concentrations est proche de celles retrouvées dans l'environnement, il affecte aussi la reproduction des hydres chez les embryons durant les 14 jours du traitement ce qui représente un vrai danger pour la survie et la pérennité de l'espèce.

### **I.2.2. Essais multigénérationnels.**

Très peu d'études (limitées) ont été menées pour évaluer les effets chroniques de l'exposition de la sertraline sur certaines espèces dulçaquicoles. Selon notre connaissance, il existe deux études réalisées par Lamichhane et al. (2014) et Minguez et al. (2015) qui traitent de l'effet de cette molécule sur plusieurs générations en utilisant respectivement les deux crustacés

*Daphnia magna* et *Ceriodaphnia dubia* comme modèles pour ces tests. Nous sommes les premiers à avoir travaillé sur les générations des hydres. Selon la littérature, cette étude est la troisième qui teste l'effet de la sertraline sur plusieurs générations. Nous avons également testé l'effet du mélange d'antidépresseurs sur trois générations successives d'hydres à des concentrations environnementales.

Les valeurs des deux LOECs calculées pour les hydres adultes des deux premières générations F0 et F1 sont similaires. Ce qui suggère que les individus de ces deux générations ont la même sensibilité vis-à-vis de la sertraline et que ces valeurs sont loin de celles que nous trouvons dans l'environnement. Elles sont 100 à 1000 fois supérieures à la concentration trouvée (Batt et al., 2008; Schultz et Furlong, 2008) dans des effluents d'Amérique du nord et d'Europe et elle est presque de  $10^3$  fois supérieure à celle retrouvée dans les eaux de surfaces.

Cependant, les hydres de la troisième génération F2 sont les moins sensibles par rapport aux deux premières générations, leur LOEC est de  $125 \mu\text{g L}^{-1}$ . Nous supposons que les hydres de F2 peuvent acquérir un mécanisme de défense interne qui leur permet d'éliminer les toxines (détoxification de l'organisme) et deviennent moins sensibles et plus résistantes que les générations précédentes. Cet effet est inverse pour les fortes concentrations testées, les individus deviennent plus sensibles et le score 6 domine de plus en plus dans les deux générations F1 et F2. Ce qui nous laisse supposé que pour des fortes concentrations, la détoxification de l'organisme nécessite une grande énergie que l'hydre ne peut pas fournir et accumule le produit dans son organisme. De même que, les hydres exposées à la sertraline réduisent de plus en plus la production des hydrantes de générations en génération. Et l'effet sur la reproduction est plus sévère dans la troisième génération F2. Ces résultats concordent avec ceux de Lamichhane et al., 2014 sauf que le degré de toxicité n'est pas le même pour les hydres et les ceriodaphnie. En comparant ces deux études, nous trouvons que les LOECs qui affectent la reproduction de la deuxième et la troisième génération d'hydres F1 et F2 sont respectivement de 10 et 100 fois supérieures à celle des *C. dubia* ce qui prouve que les hydres sont beaucoup moins sensibles que les ceriodaphnies. Ces deux LOECs sont loin des concentrations de la sertraline trouvées dans l'environnement, ce qui signifie que cette molécule ne présente pas réellement un grand danger sur la population des hydres sur trois générations successives.

Les résultats de ce test indiquent qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ) pour la nutrition entre les différentes concentrations de la même molécule au cours des trois générations d'hydres. Donc quel que soit la morphologie de l'hydre et la concentration

de la sertraline testée, les hydres ne perdent pas leur capacité de nutrition des hydrantes ce qui n'est pas le cas pour la plupart des produits pharmaceutiques. Généralement, les hydres au score (8 et 6) réduisent leur taux de nutrition, cela nous laisse supposer que peut être la sertraline à une capacité de modifier le comportement alimentaire chez les hydres adultes en augmentant leur taux de nutrition.

Bien que la sertraline ait un effet indésirable sur la reproduction des hydres au cours de la deuxième et de la troisième génération. Ces résultats ne suffisent pas pour évaluer les risques sur ces organismes vivants, vu qu'en réalité, la sertraline ne se trouve pas seule dans l'environnement. Elle est en mélange avec d'autres molécules médicamenteuses qui appartiennent à plusieurs classes sur plusieurs générations. Dans cette partie, nous avons aussi évalué la toxicité à long terme du mélange de cinq molécules d'antidépresseurs sur trois générations d'hydres.

Dans notre précédente étude, nous avons montré que les hydres adultes, renommées F0 dans cette étude, sont plus sensibles au mélange d'antidépresseurs qu'aux molécules testées seules. Pour le mélange, la LOEC basée sur la morphologie des hydres de la première génération F0 est de l'ordre de  $\text{ng L}^{-1}$ , cette concentration est proche de celle que nous trouvons dans l'environnement contrairement à celle qui touche leur reproduction qui est de l'ordre de  $\text{mg L}^{-1}$ . Les résultats trouvés dans cette étude montrent que la LOEC basée sur la morphologie des hydres de la deuxième génération F1, exposées aux mêmes concentrations du mélange d'antidépresseurs, est similaire à celle de la première génération F0 (tableau 2), ce qui prouve que les hydres des deux premières générations ont la même sensibilité.

L'effet du mélange sur la reproduction de la deuxième génération d'hydres est plus sévère que sur la première génération. A une concentration très faible de  $X/100000 \text{ mg L}^{-1}$  les hydres diminuent leurs capacités de reproduction asexuée, cette concentration est  $10^5$  fois inférieure à celle de la première génération, ce qui nous laisse supposer que les hydres de la deuxième génération accumulent de plus en plus les antidépresseurs dans leurs organismes et que le mélange d'antidépresseurs peut agir d'une manière plus progressive sur la reproduction des hydres de la deuxième génération. Les résultats de la plus forte concentration de  $X \text{ mg L}^{-1}$  du mélange d'antidépresseurs confirment cette supposition. A cette concentration nous avons observé que les hydrantes de la deuxième génération n'achèvent pas leur développement, elles minimisent leur taille, diminuent leur capacité de nutrition pour certains individus et perdent totalement leur capacité de reproduction et deviennent stériles donc nous n'avons pas pu obtenu des hydrantes de la troisième génération. Cela est peut-être dû à la saturation de

l'organisme par le toxique au point de perdre toutes les activités physiologiques. Ce phénomène est irréversible pour tous les individus d'hydres exposés à cette concentration car elles ne résistent pas et elles finissent par mourir après 10 jours de tests même si elles sont transférées dans un milieu non contaminé. Ce qui signifie peut être que les biomarqueurs responsables de la détoxification de l'organisme et du contrôle de la nutrition telle que la glutathion sont bloqués.

Aucun des paramètres biologiques testés sur les hydres de la troisième génération n'est affecté à des concentrations environnementales. Ces hydres peuvent acquérir un mécanisme d'adaptation et deviennent plus tolérantes et résistantes au mélange d'antidépresseurs en renforçant leur mécanisme de défense par le biais d'activations de quelque enzymes de stress (antioxydants) tels que la catalase, le glucose-6-phosphate déshydrogénase, la glutathione peroxidase, la glutathione réductase, la glutathione S-transférase et la superoxide dismutase qui leur permettent de désintoxifier leurs organismes et d'acclimater le mélange d'antidépresseurs chez l'hydre, ou bien par des protéines impliquées dans la désintoxication et des réponses au stress comme le cytochrome P4501A et ubiquitin.

Nous pouvons suggérer que le mélange d'antidépresseurs testé ne présente pas un réel danger sur la population des hydres aux concentrations environnementales.

### **I.2.3. Les antifongiques**

L'étude des antifongiques est un peu particulière vu que ces molécules sont lipophiles. Plusieurs études de la littérature ont été menées dans le but de connaître l'effet des différents solvants nécessaires à la solubilisation de ces molécules. Bolzer et al. (1994) ont cherché à connaître les effets du DMSO sur l'intégrité et la morphologie des cellules. Ils ont noté qu'une brève exposition (1h) d'un polype *Hydra attenuata* à 2-5 % de DMSO (dans du milieu hydre à 4°C), cause des changements drastiques de la morphologie des cellules épithéliales avec production de cellules rondes et de nombreuses protubérances, bien que ce traitement n'ait aucune incidence sur la survie. Cependant, la membrane cellulaire en apparence n'est pas perturbée et les sites de pénétration des macromolécules ne sont pas détectés. Un lavage des hydres traitées avec du milieu hydre leur permet de revenir à une morphologie normale. Ces effets sont réversibles mais l'explication de la sensibilité au DMSO reste à prouver. Certains auteurs (Johnson et al., 1988; Davies et Freeman, 1995) déterminent cette limite spécifiquement pour le test hydre à 1% (v/v) pour l'éthanol et 0,5% (v/v) pour le DMSO.

L'utilisation d'un tiers solvant (DMSO à 0,3 %) dans les tests chroniques (10 et 14 jours) comme contrôle positif a montré qu'il n'existe aucun effet toxique sur la morphologie et la régénération et non pas sur la nutrition et la reproduction asexuée de l'hydre.

L'exposition chronique des hydres aux antifongiques et notamment l'éconazole et le miconazole a montré un effet délétère sur la morphologie et la reproduction des hydres adultes à des concentrations respectives de 16 et 13  $\mu\text{g L}^{-1}$ , qui sont très proches de celles que nous trouvons dans l'environnement aquatique. Cela est peut-être dû à l'inhibition de l'activation de la protéine kinase C (PKC) par un mitogène MAPK qui aboutit au blocage de la régénération de la tête et l'initiation du bourgeonnement (Cardenas et al., 2000 ; Fabila et al., 2002) ce qui est notre cas, vu que nous avons observé un développement incomplet de la tête avec absence de la formation de la bouche, associé à la réduction du nombre de tentacules. Ces dernières restent trop courtes, ce qui a pour conséquence l'impossibilité aux hydres de capter leurs proies et donc de se nourrir. L'étude de Fabila et al. (2002) a aussi montré que les inhibiteurs de la protéine kinase C, Src, PI3K et ERK bloquent la formation du bourgeon quand ils sont appliqués avant le stade 1 et une fois le bourgeon atteint le stage 3 il achève son développement normale. Ces auteurs ont ajouté aussi que ces inhibiteurs bloquent l'expression du gène *Budhead* et *CnOtx* spécifiques pour la formation des bourgeons.

Les molécules d'antifongiques sont beaucoup plus toxiques lorsqu'elles sont en mélange. A des concentrations environnementales de quelques  $\text{ng L}^{-1}$ , ces derniers diminuent le nombre d'hydrantes produites ce qui peut réduire la population des hydres et entraîne un déséquilibre dans la chaîne trophique.

### **I.2.3. Un exemple de mélange mimant les conditions environnementales**

Les concentrations testées des cinq produits pharmaceutiques sont faibles et n'affectent pas la morphologie et la reproduction des hydres adultes et des embryons, sauf pour la clarithromycine qui présente un effet significatif sur la reproduction des adultes. Ces résultats peuvent s'expliquer par les propriétés antimicrobiennes (antibactériennes) de cet antibiotique. Cette molécule peut agir indirectement sur les hydres en stérilisant le milieu hydre ce qui peut baisser le taux de reproduction des hydres adultes et embryons. Cette hypothèse est possible car il est connu que les antibiotiques ont des caractéristiques antibactériennes qui peuvent stériliser le milieu de culture des hydres. Ces résultats nous rappellent l'expérience de Rahat et Dimentman (1982) qui ont conclu que les hydres ne

peuvent pas proliférer de façon asexuée par bourgeonnement dans un milieu pourvu de bactéries (stérile).

L'étude des molécules testées en mélange affectent la reproduction des hydres, cela est peut-être dû à l'effet de la clarithromycine qui le compose.

### **I. 3. Malformation.**

L'exposition des embryons à long terme nous a permis d'identifier des malformations, confirmant la tératogénicité des antidépresseurs testés. L'exposition des embryons à la fluvoxamine, la paroxétine et la sertraline, induit des changements morphologiques et provoque la formation d'une tête dans la partie basale de l'hydre à la place du pied (des hydres à double têtes). Le mécanisme d'action de ces molécules n'est pas connu, mais plusieurs études ont suggéré que la morphogenèse et la structuration de l'hydre sont réglementées par des voies qui impliquent la protéine kinase C et que son activation induit la formation de plusieurs têtes (Muller, 1989).

L'exposition des hydres à la clomipramine et à la paroxétine provoque une augmentation du nombre de tentacules qui peut être doublé et l'apparition de quelques tentacules présentant des anomalies (bifides). A l'opposé, les azolés (éconazole et miconazole) provoquent une diminution du nombre de tentacules de moitié. Ces malformations sont peut-être dues à la perturbation de certains gènes régulateurs ou responsables à la formation des tentacules chez l'hydre tels que : *Cnox-3*(Martinez et al., 1997), *HyAlx* (Smith et al., 2000), *HyBMP5-8b* (Reinhardt et al., 2004).

Les malformations présentées par les antifongiques azolés ne sont pas similaires à celles des antidépresseurs. Chez les hydres adultes exposées à l'amphotéricine B, l'éconazole et le miconazole des malformations ont été observées : les hydres deviennent transparentes et gonflent, en raison d'une possible perte ou modification de l'osmorégulation. Ces antifongiques azolés, sont des inhibiteurs enzymatiques qui bloquent certaines isoenzymes des cytochromes P450 des mitochondries des cellules fongiques. Nous supposant que ces molécules peuvent agir sur d'autres composants lipidiques, autre que l'ergostérol, indispensables de la membrane plasmique de l'hydre. Ce cytochrome est connu par son implication directe dans le métabolisme des médicaments chez les mammifères et les organismes supérieurs.

En plus du gonflement on note chez ces hydres l'absence de bouche et la présence de bourgeons qui ne se détachent pas, ce qui nous laisse penser que les gènes codants responsables du détachement des bourgeons sont inactifs tel que le gène *msh* (Müller, 1996). Autre malformation observée comme la forme étendue de l'hydre est peut être expliquée par une modification dans le réseau de microtubule, qui est impliqué dans la régulation de la longueur de la colonne gastrique de l'hydre en modifiant la forme des cellules épithéliales (Takaku et al., 2011). Ces mêmes auteurs ont apporté que ce réseau se produit longitudinalement le long de l'axe du corps hydre dans des cellules de forme allongées et perpendiculaires à l'axe pour les cellules les plus courtes (Takaku et al., 2011).

Il est connu que l'altération des fonctions endocriniennes peut entraîner de graves effets négatifs chez un individu et/ou sa descendance. L'effet toxique de la plus part des molécules médicamenteuses testées dans cette étude indique que ces dernières induisent des malformations et altèrent la morphologie, le développement et la reproduction des hydres. Cet effet nous ne permet pas de déduire que ces molécules sont des perturbateurs endocriniens car nous ne connaissons pas le mécanisme d'action chez cette espèce. Nous ne pouvons pas prévoir si ces molécules altèrent la reproduction par action de toxicité directe sur les organes responsables du bon fonctionnement sexuel ou s'ils modèlent l'action des hormones endogènes (perturbateurs endocriniens, Mauduit et al., 2006).

## **II. EFFET ANDROGENIQUE ET CYTOTOXIQUE DES SUBSTANCES MEDICAMENTEUSES SUR LE MODELE MDA-Kb2.**

### **II.1. Effet androgénique**

Le modèle de culture cellulaire utilisé, les cellules MDA-Kb2, permet de travailler avec un système simplifié où les cellules sont directement au contact des contaminants. Il permet de déterminer spécifiquement l'activité androgénique des substances pharmaceutiques sur un récepteur aux androgènes qui régule le gène rapporteur (luciférase), ce dernier et facilement mesurable en luminescence ou fluorescence. La réponse génique mesurée est dépendante de la concentration en ligand effecteur, elle atteint un plateau lorsque tous les récepteurs intracellulaires sont saturés par les ligands.

Dans des essais préliminaires, nous avons montré qu'une concentration en testostérone de 1 nM était suffisante pour induire la transcription du récepteur aux androgènes des cellules MDA-Kb2 et nous avons montré qu'une concentration de 5 µM de flutamide était nécessaire

pour inhiber totalement la transcription du récepteur aux androgènes induite par la testostérone. A partir de là, nous avons testé des substances pharmaceutiques en vue d'identifier leurs activités androgéniques sur les cellules MDA-Kb2. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'aux concentrations testées, la testostérone induit la transcription du gène de la luciférase des cellules MDA-Kb2 qui se trouve être sous la dépendance du gène codant pour le récepteur aux androgènes. Et également que le modèle cellulaire présentait une bonne sensibilité à la testostérone.

Le gradient de concentrations des antidépresseurs testés ne semble pas avoir d'impact sur la croissance de luminescence, cela suggère que les composés n'exercent pas ces activités androgéniques pour les concentrations environnementales. Cependant que les lectures produites pour la fluoxétine et la sertraline sont au-dessous du contrôle DMSO, cette diminution de luminosité est peut être due à une réduction dans le nombre de cellule par un effet cytotoxique de ces médicaments.

Les essais de l'activité androgénique des antifongiques montrent que ces composés n'ont pas la capacité d'induire la transcription du gène de la luciférase. Ces composés n'exercent pas d'effet androgénique sur les cellules MDA-Kb2 en culture.

L'ajout de la flutamide pour les mêmes concentrations testées des molécules d'antifongiques diminue la luminescence induite par l'amphotéricine B, l'éconazole et la miconazole ce qui s'explique par une forte interaction de ces molécules avec la flutamide qui peut avoir un effet toxique plus important que lorsqu'elles sont testées seules.

Le fait que ces composés n'exercent pas d'effets androgénique sur les cellules MDA-Kb2 en culture n'implique pas qu'ils ne sont pas anti-androgéniques. L'étude de Christen et al. (2014) a montré que les antifongiques et notamment l'éconazole, le propiconazole et la vinclozoline possèdent une activité anti-androgénique sur le même type cellulaire. Ces molécules inhibent plus de 50% de l'activité de la 5 $\alpha$ - dihydrotestostérone (DHT). Donc, ces essais antagonistes en présence de la testostérone ont la capacité de diminuer la transcription du gène de la luciférase induite par la testostérone. Ces auteurs ont également montrés que tous les mélanges binaires qui comprennent l'éconazole (Econazole-Tebuconazole ; Econazole-Propiconazole ; Econazole-Vinclozolin) ont un effet synergique. Cependant, le mélange ternaire composé d'époxyconazole, d'éconazole et de tebuconazole présente un effet additif pour les CE25 et synergique pour les CE50.

## II.2. Effet cytotoxique.

En parallèle des essais de mesure d'activité androgénique, la cytotoxicité de chaque composé chimique testé a été mesurée en utilisant un test MTT qui mesure l'activité de la fonction réductase des enzymes succinate déshydrogénases mitochondriales des cellules en culture. Ce test de cytotoxicité est complémentaire est indispensable pour s'assurer que les effets de diminution d'intensité de luminescence observée lors des essais androgéniques ne sont imputables qu'à l'action anti-androgénique des composés testés et non pas à leur propriétés cytotoxiques éventuelles.

La concentration de 1 nM de testostérone et de 1 nM de testostérone combinée avec 5  $\mu$ M de flutamide n'affecte pas la viabilité cellulaire, ces composés ne sont pas cytotoxiques.

Les antidépresseurs diminuent la viabilité des cellules mais seulement à des concentrations sélectives, généralement les plus fortes, comme c'est le cas de la fluoxétine qui diminue 50 % de la viabilité cellulaire à 0,8 mg L<sup>-1</sup> donc il est considéré comme agent cytotoxique. Autres molécules ont aussi ce potentiel cytotoxique à un effet moindre seulement pour des concentrations de quelques centaines de  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Ce niveau de concentration est loin de celui que nous trouvons dans l'environnement. Ces antidépresseurs nous préoccupent plus lorsqu'ils sont testés en mélange, la plus faible concentration testée qui correspond à une concentration environnementale peut tuer 25 % des cellules. L'éconazole et la kétoconazole peuvent provoquer une mortalité cellulaire à certaines concentrations testées. Cette mortalité cellulaire est peut-être induite par une action directe ou indirecte sur l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'acide ribonucléique (ARN) ou des protéines nécessaires à la division cellulaire.

Parmi les protéines régulatrices des fonctions cellulaires importantes comme la mitose ou la mort programmée, nous citons le p53 (protéine facteur de transcription). Elle fonctionne en se fixant de manière spécifique sur les régions régulatrices de gènes dont elle contrôle l'expression.

Lorsque la cellule se trouve en situation de stress, l'association entre p53 et mdm2 est abolie ce qui conduit à une augmentation de la quantité de p53 dans la cellule, cette dernière activera la transcription d'un grand nombre de gènes tel que le *Bax*. La protéine Bax, en se dimérisant, va perforer la membrane mitochondriale pour permettre au cytochrome c d'en sortir. La sortie du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol est un événement central dans le processus

apoptotique intrinsèque. Ce processus est présentée par certains auteurs comme un indicateur précoce de toxicité, les dommages cellulaires pouvant commencer par de l'apoptose pour des concentrations en toxiques faibles, ou donner de la nécrose pour des concentrations importantes (Robertson et al., 2000).

Parmi les caspases, la caspase-3 joue un rôle important dans l'apoptose puisque son expression provoque la mort cellulaire et que c'est par elle que passe la voie apoptotique (Porter et Jänicke, 1999). Les caspases entraînent la plupart des changements morphologiques typiques des cellules apoptotiques. Elles activent une DNase en clivant leur inhibiteur, qui va couper l'ADN entre les nucléosomes, pour générer des fragments d'ADN dont la taille correspond à des multiples de 180-200 paires de bases (Willie, 1992).

L'ensemble des résultats révèlent que les 14 molécules pharmaceutiques testées individuellement ne sont pas cytotoxiques à des concentrations environnementales. Ces résultats concordent avec ce que nous avons trouvé dans la littérature et spécialement dans les deux revus synthétiques et récapitulatives de plusieurs travaux de recherche sur la génotoxicité et la carcinogénicité des centaines de produits pharmaceutiques commercialisés qui ont été publiées par Snyder et Green (2001) et Brambilla et al. (2009). Ces auteurs ont conclu qu'il n'y a pas de potentiel génotoxique (mutagène et/ou cytogénétique) pour les produits pharmaceutiques suivants : acébutolol, amphotéricine B, céritizine, clarithromycin, éconazole, gabapentine, kétoconazole, fluoxétine, fluvoxamine, paroxétine, sertraline et venlafaxine suite aux résultats des tests de génotoxicité (Ames (de mutagenèse bactérienne), cytogénétique *in vitro* (aberrations chromosomiques), MLA (lymphome de souris – test L5178Y TK +/-), cytogénétique *in vivo* (micronoyau / aberrations chromosomiques / échange de chromatides sœurs), synthèse non programmée de l'ADN *in vitro* (UDS), et d'autres (y compris les paramètres de la mutagenèse chez les mammifères tels que HGPRT, SCE *in vitro*, les essais de transformation *in vitro*, les analyses de cassures des brins d'ADN *in vitro* y compris les élution alcaline et test des comètes, et le test *in vitro* du micronoyau). Ces auteurs ont ajouté que parmi ces molécules pharmaceutiques, la céritizine, la gabapentine, la paroxétine et la sertraline ont le potentiel carcinogénique pour la souris et/ou le rat.

### **II.1. Effet androgénique-cytotoxique.**

En comparant l'effet toxique des molécules médicamenteuses sur les cellules avec leur potentiel d'induire un effet androgénique, nous suggérons que la diminution de la luminescence est due à la mortalité cellulaire de 50 % pour la plus forte concentration de la fluoxétine.

CONCLUSION  
GÉNÉRALE ET  
PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail doctoral consiste à évaluer les effets toxiques, cytotoxiques et androgènes des différentes molécules médicamenteuses trouvées dans l'environnement à l'aide de deux modèles biologiques *Hydra attenuata* et les cellules MDA-Kb2.

L'espèce *Hydra attenuata* très utilisée en écotoxicologie aquatique a été choisie comme modèle biologique pour notre étude puisqu'elle présente plusieurs avantages (faciles à cultiver et à entretenir en laboratoire, reproduction asexuée à l'origine d'une homogénéité génétique...) et permet de conduire des essais permettant de déterminer d'éventuels effets toxiques et tératogènes de résidus pharmaceutiques sur le développement et la régénération.

Des essais de toxicité aiguë (96h) et de toxicité chronique ont été conduits chez des hydres adultes (10 jours) et sur des embryons (14 jours) exposés seuls ou en mélange à différents produits pharmaceutiques notamment les antidépresseurs, les antifongiques, les antibiotiques, les  $\beta$ -bloquants, les antiépileptiques et les antihistaminiques. Les paramètres biologiques évalués sur les hydres lors des tests aigus et chroniques sont : le score, le nombre de bourgeons formés, la capacité de nutrition et la capacité d'attachement des organismes.

Les résultats d'écotoxicité à court terme (96h) sur le modèle biologique *Hydra attenuata* présente un effet délétère sur la survie de l'adulte ainsi que sur la morphologie, le développement et la régénération des embryons pour l'ensemble des antidépresseurs et des antifongiques testés. Ces molécules sont classées en fonction de leurs valeurs de CE50 selon la directive européenne 93/67/CEE (UE, 2004) comme suivant : l'éconazole et le miconazole (0,84 et 0,94 mg L<sup>-1</sup>) seraient considérées comme très toxiques, l'amphotéricine B, la clomipramine, la fluoxétine, le kétoconazole, la paroxétine et la sertraline (1,75 à 8 mg L<sup>-1</sup>) toxiques et la fluvoxamine (supérieure à 100 mg L<sup>-1</sup>) non toxiques pour les hydres adultes. Ces résultats nous permettent de conclure que les antifongiques azolés et notamment l'éconazole et le miconazole sont beaucoup plus toxiques que les polyènes (amphotéricine B) et les antidépresseurs.

Les tests chroniques ont montré que les deux paramètres biologiques majoritairement affecté par les produits pharmaceutiques testés, sont la morphologie et la reproduction. En comparant les LOEC des résultats d'écotoxicité chronique sur les hydres exposées aux différentes molécules d'antidépresseurs testées seules, nous avons mis en évidence que les hydres adultes sont beaucoup plus sensibles que les embryons et que la sertraline est la molécule la plus toxique avec des effets significatifs sur la morphologie à 62,5  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. La reproduction des hydres n'est pas affectée chez les adultes sauf à de fortes concentrations de 4 et 10 mg L<sup>-1</sup> pour fluoxétine et la fluvoxamine respectivement. Par contre, pour l'éconazole, le miconazole et la clarithromycine, la reproduction des hydres a été significativement altérée

à des concentrations proches de celles retrouvées dans l'environnement, à savoir 16 et 13  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour l'éconazole et le miconazole, et 4  $\text{ngL}^{-1}$  pour la clarithromycine.

Les résultats d'écotoxicité chronique sur les hydres adultes ont aussi révélé que les molécules d'antidépresseurs testées seules sont moins toxiques que lorsqu'elles sont testées en mélange, ce qui indique qu'ils peuvent agir de façon cumulative en mélange. De plus, l'exposition chronique au mélange d'antidépresseurs présente une toxicité plus élevée sur les adultes que sur les embryons, avec une concentration minimale pour le mélange de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  qui affecte la morphologie des adultes, niveau de concentrations proche de celles retrouvées dans l'environnement.

Les résultats d'écotoxicité chronique sur plusieurs générations d'hydres ont mis en évidence que les individus de la première (F0) et la deuxième génération (F1) ont la même sensibilité vis-à-vis de la sertraline et du mélange d'antidépresseurs testés. Par contre, les hydrantes (F2) issues de la deuxième génération sont moins sensibles à la sertraline. De plus, les hydres exposées à la sertraline réduisent de plus en plus le nombre d'hydrantes produites par adulte au cours des différentes générations et l'effet sur la reproduction des hydres devient plus marqué pour la troisième génération. Le mélange d'antidépresseurs affecte la reproduction des hydres de la deuxième génération à des concentrations environnementales. Cette étude a été la première à examiner l'effet des produits pharmaceutiques sur différentes générations d'hydres, et il serait intéressant de réaliser le dosage de l'activité enzymatique (biomarqueurs) pour tenter d'expliquer la différence de sensibilité entre les trois générations d'hydres pour les molécules médicamenteuses testées. Une étude au niveau génomique pourrait venir compléter ces travaux.

La plupart des molécules testées présentent des malformations différentes. Les antidépresseurs induisent des malformations chez les embryons, avec la formation d'individus à deux têtes, des bourgeons qui ne se détachent pas, des tentacules bifides et en augmentant le nombre de tentacules formés par chaque hydre, allant de 9 à 13 au lieu de 7 habituellement observés chez les témoins. Les antifongiques causent des anomalies chez les hydres adultes en modifiant leur perméabilité membranaire, réduisant le nombre de tentacules et disparition de la bouche pour certaines hydres.

Il serait intéressant de compléter ce travail en effectuant une étude génomique qui permettra de mieux comprendre les mécanismes d'action des substances médicamenteuses retenues sur l'hydre et cibler les gènes responsables de toutes les malformations retrouvées. Des essais préliminaires ont été réalisés afin de vérifier la quantité et la qualité des

ARN totaux que l'on peut obtenir en vue d'un séquençage, mais par manque de temps nous n'avons pas pu terminer ces travaux

Dans cette étude, nous avons choisi de travailler sur une lignée cellulaire MDA-kb2. Ces cellules permettent de cribler des produits chimiques et pharmaceutiques. Les résultats du potentiel tératogène et de cytotoxicité sur le modèle cellulaire MDA-Kb2 révèlent une bonne sensibilité des cellules à la substance de référence, la testostérone, nous permettant ainsi de valider le modèle utilisé. L'activité luciférase de l'essai gène rapporteur était hautement induite par cette molécule à une concentration de 1 nM. L'activité anti-androgénique de flutamide, antagoniste du récepteur aux androgènes, a été confirmée par l'ajout de 5  $\mu$ M à la solution de 1 nM de la testostérone. Les essais androgéniques des 14 produits pharmaceutiques montrent que ces composés n'ont pas la capacité d'induire la transcription du gène de la luciférase. Ces composés n'exercent pas d'effet androgénique et cytotoxique sur les cellules MDA-Kb2 en culture à des concentrations environnementales. Il serait indispensable de mesurer des activités anti-androgéniques des différentes molécules médicamenteuses testées et notamment la paroxétine, le mélange d'antidépresseurs et les antifongiques sur le système MDA-Kb2. Il serait également intéressant d'étudier les effets des composés pharmaceutiques sur les cellules exprimant les récepteurs aux œstrogènes, comme les cellules MELN afin de détecter chez ces composés des effets ostrogéniques. Ces cellules, aptes à proliférer en réponse aux œstrogènes, contiennent de la luciférase qui réagit de façon proportionnelle à la quantité d'hormone naturelle ou de perturbateurs endocriniens présents dans l'échantillon à analyser.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdellatef, H.E., El-Henawee, M.M., El-Sayed, H.M., Ayad, M.M. 2006. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for analysis of tramadol, acebutolol and dothiepin in pharmaceutical preparations. *Spectro. chim. Acta. A.* 65, 1087-1092.
- Abegglen, C., Böhrer, M., Hollender, J., Zimmermann, S., Zwickenpflug, B., von Gunten, U., Siegrist, H., Thonney, D. 2010. Mikroverunreinigungen in Kläranlagen. Technische Verfahren zur Elimination von organischen Spurenstoffen. *Gas Wasser Abwasser.* 7, 587-594.
- Académie nationale de Pharmacie. 2008. Médicaments et environnement. 103.
- Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K. 2004. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test. *Chemosphere.* 57, 505-512.
- Alonso, S.G., Catalá, M., Maroto, R.R., Rodríguez, J.L.G., Miguel, A.G., Valcárcel, Y. 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ. Int.* 36, 195-201.
- Andrae, M.O. 1980a. Determination of trace quantities of dimethyl sulfoxide in aqueous solutions. *Analyt. Chem.* 52,150-153.
- Andrae, M.O. 1980b. Dimethyl sulfoxide in marine and freshwaters. *Limnol Oceanogr.* 25, 1054-1063.
- Al-Rifai, J.H., Gabelish, C.L., Schafer, A.I. 2007. Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different wastewater recycling schemes in Australia. *Chemosphere.* 69, 803–815.
- Altundag, K., Ibrahim, N.K. 2006. "Aromatase inhibitors in breast cancer: An overview". *Oncologist.*11(6), 553-562.
- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M., Bonefeld-Jorgensen, E.C. 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179, 1-12.
- Anderson, P.A. 1985. Physiology of a bidirectional, excitatory, chemical synapse. *J. Neurophysiol.* 53, 821-835.
- Ankley, G.T. Jensen, K.M. Durhan, E.J. Makynen, E.A. Butterworth, B.C..Kahle, M.D Villeneuve D.L., Linnum, A. Gray, L.E. Cardon, M. Wilson, V.S. 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol.Sci.* 86(2): 300-308.
- Arzimanoglou, A., Ben-Menachem, E., Cramer, J., Glauser, T., Seeruthun, R., Harrison, M. 2010. The evolution of antiepileptic drug development and regulation. *Epileptic Disord.* 12(1): 3-15.
- Ayub, M, Levell, M. J. 1987. "Inhibition of Testicular 17-Alpha-Hydroxylase and 17,20-Lyase but Not 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase-Isomerase or 17-Beta-Hydroxysteroid Oxidoreductase by Ketoconazole and Other Imidazole Drugs." *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 28(5): 521-531.

- Bagnall, J.P., Evans, S.E., Wort, M.T., Lubben, A.T., Kasprzyk Hordern, B., 2012a. Using chiral liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface and wastewater at the enantiomeric level. *J. Chromatogr. A* 1249, 115-129.
- Bahlmanna, A., Carvalho, J.J., Wellera, M.G., Panneb, U., Schneidera, R.J. 2012. Immunoassays as high-throughput tools: Monitoring spatial and temporal variations of carbamazepine, caffeine and cetirizine in surface and wastewaters. *Chemosphere*. 89 (11), 1278–1286.
- Barbieri, M., Licha, T., Nödler, K., Carrera, J., Ayora, C., Sanchez-Vila, X. 2012. Fate of  $\beta$ -blockers in aquifer material under nitrate reducing conditions: batch experiments. *Chemosphere*. 89 (11), 1272-1277.
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B. 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States-I) Groundwater. *Sci. Total. Environ.* 402, 192-200.
- Baroody, F.M., Naclerio, R. 2000. Antiallergic effects of H1-receptor antagonists. *Allergy*. 55 Suppl. 64, 17-27.
- Batt, A.L., Kostich, M.S., Lazorchak, J.M. 2008. Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC/MS/MS. *Anal. Chem.* 80, 5021-5030.
- Beach, M.J., Pascoe, D. 1998. The role of *Hydra vulgaris* (Pallas) in assessing the toxicity of freshwater pollutants. *Water Res.* 32(1),101-106.
- Bellis, S.L., Kass-Simon, G., Rhoads, D.E. 1992. Partial characterization and detergent solubilization of the putative glutathione chemoreceptor from Hydra. *Biochemistry*. 31, 9838-9843.
- Bendz, D., Paxeus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J. 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.* 122, 195-204.
- Benotti, M.J., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., Holady, J.C., Stanford, B.D., Snyder, S.A. 2009. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ Sci. Technol.* 43, 597–603.
- Berenzen, N., Lentzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M.A. 2005. Comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere*. 58, 683-91.
- Berking, S. 1997. Pattern formation in hydrozoa. *Naturwissenschaften*. 84, 381-388.
- Besse, J.P., Garric, J. 2010. Environmental risk assessment and prioritization strategies for human pharmaceuticals review and discussion. In: Benoit R, editor. *Pharmaceuticals in the environment: current knowledge and need assessment to reduce presence and impact*. London: IWA Publishing. 137-168.

- Besse, J.P., Garric, J. 2008. Human pharmaceuticals in surface waters Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicol. Lett.* 176, 104-123.
- Birkhoj, M., Nellemann, C., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Andersen, H.R., Dalgaard, M., Vinggaard, A.M. 2004. The combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201, 10-20.
- Blaise, C., Gagne, F., Eullaffroy, P., Ferard, J-F. 2006. Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence river (Quebec, Canada): a review. *Braz. J. Aquat. Sci. Technol.* 10 (2), 29-59.
- Blaise, C., Kusui, T. 1997. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12, 53-60.
- Bode, H.R. 1996. The interstitial cell lineage of Hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J. Cell. Sci.* 109, 1155-1164.
- Bode, P.M., Awad, T.A., Koizumi, O., Nakashima, Y., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Bode, H.R. 1988. Development of the two-part pattern during regeneration of the head in *Hydra*. *Development.* 102, 223-235.
- Bode, P.M., Bode, H.R. 1980. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*. I. Head body proportion regulation. *Dev. Biol.* 78, 484-496.
- Bode, PM, Bode, H.R. 1984a. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*: III. The shaping of the body column. *Dev. Biol.* 106, 315-325.
- Bode, PM, Bode, H.R. 1984b. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuate*: II. Degree of proportion regulation is less in the hypostome and tentacle zone than in the tentacles and basal disc. *Dev. Biol.* 103, 304-312.
- Body, J.J., Lossignol, D.A., Plehiers, B. 2004. Gabapentin (Neurontin®) and cancer pain: a pilot study. *Revue Médicale de Bruxelles*. <http://archive.wikiwix.com/cache/?url=http://www.amub.be/rmb/article.php?id=132&title=Revue%20M%C3%A9dicale%20de%20Bruxelles>
- Bolzer, A., Melzer, R.R., Bosch, T.C.G. 1994. A SEM analysis of DMSO treated hydra polyps. *Biol. Cell.* 81, 83-86.
- Bosch, T.C.G., David, C.N. 1987. Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic cells and germ line cells. *Dev. Biol.* 121, 182-191.
- Bosch, T.C.G., Benitez, E., Gellner, K., Praetzel, G., Salgado, L.M. 1995. Cloning of a *ras*-related gene from *Hydra* which responds to head-specific signals. *Gene.* 167, 191-195.
- Bosch, T.C.G. David, C.N. 1987. Stem Cells of *Hydra magnipapillata* Can Differentiate into Somatic Cells and Germ Line Cells. *Developmental biology.* 121, 182-191.
- Bound, J.P., Voulvoulis, N. 2004. Pharmaceuticals in the aquatic environment-a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere.* 56, 1143-1155.

- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Hanson, M.L., Sanderson, H., Lam, M.W., Young, C., Mabury, S.A., Sibley, P.K., Solomon, K.R. 2004. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquat. Toxicol.* 70 (1), 23-40.
- Brambilla, G., Martelli, A. 2009. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 681, 209-229.
- Bromilow, R. H., Evans, A.A., Nicholls, P. H. 1999a. "Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. Laboratory incubations." *Pesticide Science* 55(12): 1129-1134.
- Bromilow, R. H., Evans, A.A., Nicholls, P. H. 1999b. "Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 2. Field studies." *Pest. Sci.* 55 (12), 1135-1142.
- Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 464-469.
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W. 2003a. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol. Lett.* 142, 169-183.
- Brooks, B.W., Turner, P.K., Stanley, J.K., Weston, J.J., Glidewell, E.A., Foran, C.M., Slattery, M., La Point, T.W., Huggett, D.B. 2003b. Waterborne and sediment toxicity of fluoxetine to select organisms. *Chemosphere.* 52, 135-142.
- Broun, M., Sokol, S., Bode, H.R. 1999. *Cngsc*, a homologue of goosecoid, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra*. *Development.* 126, 5245-5254.
- Brown, K.D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T.H., Mawhinney, D.B. 2006. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total. Environ.* 366, 772-783.
- Brun, G.L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P., Lee, H.B. 2006. Pharmaceutically active compounds in atlantic canadian sewage treatment effluents and receiving waters and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2163-2176.
- Bueno, M.J.M., Aguera, A., Gómez, M.J., Hernando, M.D., Reyes, J.F.G., Alba, A.R.F. 2007. Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal. Chem.* 79, 9372-9384.
- Bullock, T.H., Horridge, G.A. 1965. Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates, vol. 1. Freeman, Calif, San Francisco.
- Caillot, D., Bassaris, H., McGeer, A., Arthur, C., Prentice, H.G., Seifert, W., De Beule, K. 2001. Intravenous itraconazole followed by oral itraconazole in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies, chronic granulomatous disease, or AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 33, 83-90.

- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. 2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy, *Environ. Sci. Technol.* 37, 1241-1248.
- Campbell, R.D. 1967a. Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. I. Pattern of cell divisions. *Dev. Biol.* 15(5), 487-502.
- Campbell, R.D. 1967b. Growth of hydra pattern: Distribution of mitotic cells in *H. pseudooligactis*. *Trans. Am. Microscop. Soc.* 86, 169-173.
- Campbell, R.D., Marcum, B.A. 1980. Nematocyte migration in hydra: evidence for contact guidance in vivo. *J. Cell. Sci.* 41, 33-51.
- Cardenas, M., Fabila, Y.V., Yum, S., Cerbon, J., Bohmer, F.D., Wetzker, R., Fujisawa, T., Bosch T.C.G., Salgado, L.M. 2000. Selective protein kinase inhibitors block head-specific differentiation in hydra. *Cell. Signal.* 12, 649-658.
- Carlberg, M. 1992. Localization of dopamine in the freshwater hydrozoan *Hydra attenuata*. *Cell. Tissue. Res.* 270, 601-607.
- Carlsson, C., Johansson, A-K., Alvan, G., Bergman, K., Kuhler, T. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total. Environ.* 364, 67-87.
- Carlsson, G., Örm, S. Larsson, D.G.J. 2009. Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. *Env. Tox. Chem.* 28, 2656-2662.
- Carter, L.J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J.J., Kookana, R.S., Boxall, A.B.A. 2014. Fate and uptake of pharmaceuticals in soil plant systems. *J. Agr. Food Chem.* 62, 816-825.
- Castano, P., Rossi, S. 1978. Cytochemical ultrastructural and fluorescence study of the nervous net of *Hydra sp.* *J. Submicrosc. Cytol.* 10, 381-395.
- Castillo, G., Schäfer, L. 2000. Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: a Chilean experience. *Env. Tox.* 15, 331-337.
- CEC (Commission of the European Communities). Technical guidance document in support of commission directive 93/67/ EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, environmental risk assessment. Luxembourg: Office for official publication of the European Communities. 1996.
- Chapman, J.A., Kirkness, E.F., Simakov, O., Hampson, S.E., Mitros, T., Weinmaier, T., et al. 2010. The dynamic genome of *Hydra*. *Nature.* 464, 592-596.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., et al. 2009. Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev. Cell.* 17, 279-89.
- Christen, V., Crettaz, P., Fent, K. 2014. Additive and synergistic antiandrogenic activities of mixtures of azol fungicides and vinclozolin. *Toxicol. Appl. Pharm.* 279, 455-466.

Christensen, A.M., Faaborg-Andersen, S., Ingerslev, F., Baun, A. 2007. Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Environ. Toxicol. Chem.* 26(1), 85-91.

Chu, S., Metcalfe, C.D. 2007. Analysis of PAR, FLU and norFLU in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1163, 112–118.

Claessens, M., Vanhaecke, L., Wille, K., Janssen, CR. 2013. Emerging contaminants in Belgian marine waters: single toxicant and mixture risks of pharmaceuticals. *Mar. Pollut. Bull.* 71(1–2), 41-50.

Cleuvers, M. 2005. Initial risk assessment for three b-blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* 59, 199-205.

Cleuvers, M. 2004. Mixture toxicity of anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 309-315.

Cleuvers, M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142, 185-194.

Colasanti, M., Venturini, G., Merante, A., Musci, G., Lauro, G.M. 1997. Nitric oxide involvement in *Hydra vulgaris* very primitive olfactory-like system. *J. Neurosci.* 17, 493-499.

Concas, A., Pierobon, P., Mostallino, M.C., Porcu, P., Marino, G., Minei, R., Biggio, G., 1998. Modulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors and the feeding response by neurosteroids in *Hydra vulgaris*. *Neuroscience.* 85, 979-988.

Conley, J.M., Symes, S.J., Kindelberger, S.A., Richards, S.M. 2008. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. *J. Chromatogr. A* 1185, 206-215.

Conners, DE., Rogers, ED., Armbrust, KL., Kwon, JW., Black, MC. 2009. Growth and development of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and sertraline, throughout metamorphosis. *Environ. Toxicol.Chem.* 28, 2671-2676.

Cummings, S. G., Bode, H. R. 1984. Head regeneration and polarity reversal in *Hydra attenuata* can occur in the absence of DNA synthesis. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194, 79-86.

Cunningham, V.L., Constable, D.J.C., Hannah, R.E. 2004. Environmental risk assessment of paroxetine. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3351-3359.

Dannaoui, E. Présentation orale. Centre National de Référence de la Mycologie et des Antifongiques, Institut Pasteur, Paris.

Daughton, C.G., Ternes, T. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents or subtle change? *Environ. Health. Perspect.* 6, 907-938.

David, C.N., Murphy, S. 1977. Characterization of interstitial stem cells in hydra by cloning. *Dev. Biol.* 58, 372-383.

- David, C.N., Plotnick, I. 1980. Distribution of interstitial stem cells in *Hydra*. *Dev. Biol.* 76, 175-180.
- David, D.J. 2012. Mécanisme d'action des antidépresseurs : nouvelles approches. *L'Encéphale*. 38, S45-S48.
- Davies, W.J., Freeman, S.J. 1995. The *Hydra attenuata* assay. *Methods in molecular biology. In vitro toxicity testing protocols*. Eds, Atterwill. Humana Press Inc, Totowa, NJ. 43, 321-326.
- De Lange, H.J. Noordoven, W. Murk, A.J. Lurling, M. Peeters, E.T.H.M. 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.* 78, 209-216.
- De Liguoro, M., Fioretto, B., Poltronieri, C., Gallina, G. 2009. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim, *Chemosphere* 75, 1519-1524.
- Denning, D.W. 2002. Echinocandins: a new class of antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 881-889.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.G., Sumpter, J.P., Waldock, M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluents. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549-1558.
- Diamond, R. 1999. Atlas of fungal Infections. 67(9), 4732-4736.
- Drug Bank. 2013. Open data drug & drug target data base, DB01211 (APRD00181). <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01211>
- Dzialowski, E.M., Turner, P.K., Brooks, B.W. 2006. Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in *Daphnia magna*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 503-510.
- Eguchi, K. Nagase, H. Ozawa, M. Endoh, Y.S. Goto, K. Hirata, K. Miyamoto, K. Yoshimura, H. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*. 57, 1733-1738.
- Eil, C. 1992. "Ketoconazole Binds to the Human Androgen Receptor." *Horm. Metab. Res.* 24(8), 367-370.
- Ekins, S., Chang, C., Mani, S., Krasowski, M. D., Reschly, E. J., Iyer, M., Kholodovych, V., Ai, N., Welsh, W. J., Sinz, M., Swaan, P. W., Patel, R., Bachmann, K. 2007. "Human pregnane X receptor antagonists and Agonists define molecular requirements for different binding sites." *Mol. Pharmacol.* 72(3), 592-603.
- Elliott, J.K., Elliott, J.M., Leggett, W.C. 1997. Predation by hydra on larval fish: field and laboratory experiments with bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Limnol. Oceanogr.* 42 (6), 1416-1423.
- Errington, J. 2003 Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria. *Nat. Cell Biol.* 5, 175-178.

- Ewer, R.F. 1947. On the functions and mode of action of the nematocysts of Hydra. Proc. Zool. Soc. Lond. 117, 305-376.
- Fabila, Y., Navarro, L., Fujisawa, T., Bode, H.R., Salgado L.M. 2002. Selective inhibition of protein kinases blocks the formation of a new axis, the beginning of budding, in Hydra. Mech. Dev. 119,157-164.
- Feitosa-Felizzola, J., Chiron, S. 2009. Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France), J. Hydrol. 364, 50-57.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals, Aquat.Toxicol. 76, 122-159.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Frayse, B., Paxéaus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? Environ. Toxicol. Chem. 23, 1344-1354.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J. 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. Ecotoxicol. Environ. Saf. 55, 359-370.
- Flaherty, C.M., Dodson, S.I. 2005. Effects of pharmaceuticals on Daphnia survival, growth, and reproduction. Chemosphere. 61, 200-207.
- Fong, P.P. 2001. Antidepressants in aquatic organisms: a wide range of effects. In: Daughton, C.G., Jones-Lepp, T.L. (Eds.), Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues. American Chemical Society, Washington, D.C, pp. 264-281.
- Fong, P.P., Huminski, P.T., D'Urso, L.M. 1998. Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). J. Exp. Zool. 280, 260-264.
- Fong, P.P., Kyojuka, K., Abdelghani, H., Hardege, J.D., Ram, J.L. 1994. *In vivo* and *in vitro* induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). J. Exp. Zool. 269, 467-474.
- Fong, P.P., Wade, S., Rostafin, M. 1996. Characterization of serotonin receptor mediating parturition in fingernail clams *Sphaerium (Musculium)* spp. from eastern North America. J. Exp. Zool. 275, 326-330.
- Fong, P.P., Warner, M. 1995. Serotonin-induced parturition in the fingernail clam *Sphaerium (Musculium) transversum* (Say). J. Exp. Zool. 272, 163-166.
- Foran, CM, Weston, J, Slattery, M, Brooks, BW, Huggett, DB. 2004. Reproductive Assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Following a Four-Week Fluoxetine (SSRI) Exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46(4), 511-517.
- Frayse, B., Garric, J. 2005. Prediction and experimental validation of acute toxicity of  $\beta$ -blockers in *Ceriodaphnia dubia*. Environ. Toxicol.Chem. 24, 2470-2476.

- Galliot, B., Ghila, L. 2010. Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 837-855.
- Galliot, B., Quiquand, M., Ghila, L., De Rosa, R., Miljkovic-Licina, N.M., Chera, S. 2009. Origins of neurogenesis, a cnidarian view. *Dev. Biol.* 332, 2-24.
- Galliot, B., Schmid, V. 2002. Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 39-48.
- Galliot, B., Welschof, M., Schuckert, O., Hoffmeister, S., Schaller, H.C. 1995. The cAMP response element binding protein is involved in hydra regeneration. *Development.* 121, 1205-1216.
- Garcia-Valcarcel, A.L., Tadeo, J.I. 2011. Detremination of azoles in sewage sludge from Spanish wastewater treatment plants by liquid chromatography-tendem mass spectrometry. *Sci.* 34, 1228-1235.
- Garm, A., Poussart, Y., Parkefelt, L., Ekstrom, P., Nilsson, D.E. 2007. The ring nerve of the box jellyfish *Tripedalia cystophora*. *Cell. Tissue Res.* 329, 147-157.
- Garric, J., Ferrari, B., Fraysse, B., Mons, R., Vollat, B. 2006. Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce. *Environ. Ris. Santé.* 5(4), 290-295.
- Gasperi, J., Garnaud, S., Rocher, V., Moilleron, R. 2008. Priority pollutants in wastewater and combined sewer overflow. *Sci. Total. Environ.* 407, 263-272.
- Gauchat, D., Kreger, S., Holstein, T., Galliot, B. 1998. Prdl-a, a gene marker for hydra apical differentiation related to triploblastic paired-like head specific genes. *Development.* 125, 1637-1645.
- Gierer, A., Berking, S., Bode, H., David, CN., Flick, K., Hansmann, G., et al. 1972. Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nat. New. Biol.* 239, 98-101.
- Göbel, A., McArdell, C.S., Joss, A., Siegrist, H., Giger, W. 2007. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Sci. Total Environ.* 372, 361-371.
- Göbel, A., Thomsen, A., McArdell, C.S., Joss, A., Giger, W. 2005. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment, *Environ. Sci. Technol.* 39, 3981-3989.
- Gobet, I., Durocher, Y., Leclerc, C., Moreau, M., Guerrier, P. 1994. Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of Japanese clam *Ruditapes philippinarum*. *Dev. Biol.* 164, 540-549.
- Gómez, M.J., Malato, O., Ferrer, I., Aguera, A., Fernández-Alba, A.R. 2007. Solid phase extraction followed by liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *J. Environ. Monit.* 9, 718-729.
- Gómez, M.J., Petrović, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D. 2006. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid

chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1114, 224-233.

Grens, A., Shimizu, H., Hoffmeister, S.A., Bode, H.R., Fujisawa, T. 1999. The novel signal peptides, pedibin and Hym-346, lower positional value thereby enhancing foot formation in hydra. *Development*. 126, 517-524.

Grimmelikhuijzen, C.J., Williamson, M., Hansen, G.N. 2002. Neuropeptides in cnidarians. *Can. J. Zool.* 80, 1690-1702.

Grimmelikhuijzen, C.J.P., Westfall, J.A. 1995. The nervous systems of Cnidarians. *An: evolutionary and Comparative Approach*. Birkhäuser Verlag Basel Switzerland. 72, 7-24.

Grimmelikhuijzen, C.J.P., Dockray, G.J., Schot, L.P.C. 1982. FMRFamide like immunoreactivity in the nervous system of hydra. *Histochemistry*. 73, 499-508.

Gros, M., Petrović, M., Barceló, D. 2007. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (8), 1553-1562.

Gros, M., Petrovic, M., Barceló, D. 2009. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Anal. Chem.* 81, 898-912.

Gunnarsson, L., A., Kristiansson, E., Rutgersson, C., Sturve, J., Fick, J., Förlin, L., Larsson, D.G.J. 2009. Pharmaceutical industry effluent diluted 1:500 affects global gene expression, cytochrome P4501A activity, and plasma phosphate in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (12), 2639-2647.

Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R., Garric, J. 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environ. Pollut.* 157, 423-429.

Hager, G., David, C.N. 1997. Pattern of differentiated nerve cells in hydra is determined by precursor migration. *Development*. 124 (2), 569-76.

Halling-Sørensen, B., Holten Lützhof, H.-C., Andersen, H.R., Ingerslev, F. 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 53-58.

Halling-Sørensen, B., Nielsen, S.N., Lanrky, P.F., Ingerslev, F., Holten-Lützhof, H.C., Jorgensen, S.E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review. *Chemosphere*. 36, 357-393.

Hanai, K., Kitajima, M. 1984. Two types of surface amine receptors modulating the feeding response in *Hydra japonica*: the depressing action of dopamine and related amines. *Chem. Senses* 9, 355-367.

Harada, A., Komori, K., Nakada, N., Kitamura, K. 2008. Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment levels. *Water Sci. Technol.* 58, 1514-1546.

Hasselberg, L., Westerberg, S., Wassmur, B., Celander, M.C. 2008. Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol exposure. *Aquat. Toxicol.* 86, 256-264.

Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131 (1-2), 5-17.

Heeres, J., Backx, L.J., Mostmans, J.H. Van-Cutsem, J. 1979. Antimycotic imidazoles. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active broad-spectrum antifungal agent. *J. Med. Chem.* 22, 1003-1005.

Hecktoen, H. Berge, JA. Hormazabal, V. Yndestad, M.1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture.* 133, 175-184.

Helen Koenig.1995. Guide de Mycologie Médicale Ellipses (ed. Marketing S.A.). 22 - 27, 33 - 49, 74 - 75, 252-265.

Hemrich, G., Anokhin, B., Zacharias, H., Bosch, T.C.G. 2007. Molecular phylogenetics in *Hydra*, a classical model in evolutionary developmental biology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 281-290.

Henry, T.B., Black, M.C. 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 325-330.

Henry, T.B., Black, M.C. 2007. Mixture and single-substance acute toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1751-1755.

Henry, T.B., Kwon, J.W., Armbrust, K.L., Black, M.C. 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2229-2233.

Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernandez-Alba, A.R., Barcelo, D. 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta.* 69, 334-342.

Hignite, C., Azarnoff, D.L. 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life. Sci.* 20, 337-341

Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C.W. 2006. Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction. *Electrophoresis.* 27, 1220-1226.

Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A.L., Kanatani, H., Koide, S.S. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J. Exp. Zool.* 245, 318-321.

Holdway, DA., Lok, K., Semaan, M. 2001. The acute and chronic toxicity of cadmium and zinc to two *Hydra* species. *Environ. Toxicol.* 16, 557-565.

Holten-Lützhof, H.C., Halling-Sorensen, B., Jorgensen, S.E. 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in danish fish farming. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 1-6.

Hordern, B.K., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. 2007. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1161, 132-45.

Huang, Q., Yu, Y., Cui, J., Tang, C., Peng, X. 2010. Determination of commonly used azole antifungals in various waters and sewage sludge using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1217, 3481-3488.

Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M., Schlenk, D. 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-Blockers) on aquatic organisms, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 229-235.

Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F. 2011. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water. Res.* 45, 1432-1442.

INRIS. 2009. Outils bio-analytiques in vitro: principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique. Rapport d'étude N°DRC-08-95306-16732A. pp 26.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A. 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci. Total. Environ.* 346, 87-98.

Jiang, Z., Wang, Y., Wang, W., Wang, S., Xu, B., Fan, G., Dong, G., Liu, Y., Yao, J., Miao, Z., Zhang, W., Sheng, C. 2013. Discovery of highly potent triazole antifungal derivatives by heterocycle-benzene bioisosteric replacement. *Eur. J. Med. Chem.* 64, 16-22.

Jjemba, P.K. 2002. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 93, 267-278.

Johnson, E.M., Gorman, R.M., Gabel, B.E.G., George, M.E. 1982. The *Hydra attenuata* system for detection of teratogenic hazards. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 2, 263-276.

Johnson, M.D., Mohr, J. 2010. Echinocandins for prevention and treatment of invasive fungal infections. In: *Antifungal therapy. Informa. Healthcare.* 219-42.

Johnson, D.J., Sanderson, H., Brain, R.A., Wilson, C.J., Solomon, K.R. 2007. Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 128-139.

Johnson, D.J., Sanderson, H., Brain, R.A., Wilson, C.J., Bestari, K.J., Solomon, K.R. 2005. Exposure assessment and microcosm fate of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 42, 313-323.

Jolibois, B., Guerbet, M. 2005. Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the *Salmonella* fluctuation test and the SOS chromotest. *Mutat. Res.* 565, 151-162.

Jolibois, B., Guerbet, M., Vassal, S. 2003. Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS chromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere.* 5, 539-543.

- Kahle, M., Buerge, I.J., Hauser, A., Muller, M.D., Poiger, T. 2008. Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7193-7200.
- Karntanut, W., Pascoe, D. 2002. The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere*.47, 1059-1064.
- Kasahara, S., Bosch, T.C.G. 2003. Enhanced antibacterial activity in *Hydra* polyps lacking nerve cells. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 79-85.
- Kase, R., Eggen, R.I.L., Junghans, M., Götz, C., Hollender, J. 2011. Assessment of micropollutants from municipal wastewater – combination of exposure and ecotoxicological effect data for Switzerland. In: Einschlag, F.S.G. (Ed.), *Waste Water - Evaluation and Management*, ISBN: 978-953-307-233-3, InTech.
- Kasprzyk-Hordern, B., Baker, D.R. 2012. Enantiomeric profiling of chiral drugs in wastewater and receiving waters. *Environ. Sci. Technol.* 46, 1681-1691.
- Kass-Simon, G., Pierobon, P. 2007. Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146, 9-25.
- Kibbey, T.C.G., Paruchuri, R., Sabatini, D.A., Chen, L. 2007. Adsorption of beta blockers to environmental surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 41(15), 5349-56.
- Kim, J.W., Jang, H.S., Kim, J.-G., Ishibashi, H., Hirano, M., Nasu, K., Ichikawa, N., Takao, Y., Shinohara, R., Arizono, K. 2009a. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface water from Mankyung River, South Korea. *J. Health Sci.* 55, 249-258.
- Kim, J.W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M., Arizono, K. 2009b. Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J. Toxicol. Sci.* 34, 227-232.
- Kim, S.-C., Carlson, K. 2007. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environ. Sci. Technol.* 41, 50-57.
- Kim, S.D., Cho, J., Kim, I.S., Vanderford, B.J., Snyder, S.A. 2007a. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water. Res.* 41, 1013-1021.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.G., Park, J. 2007b. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environ. Int.* 33, 275-370.
- Klug, M., Weber, J., Tardent, P. 1989. Hemolytic and toxic properties of *Hydra attenuata* nematocysts. *Toxicon.* 27, 325-339.
- Koizumi, O. 2007. Nerve ring of the hypostome in hydra: is it an origin of the central nervous system of bilaterian animals? *Brain Behav. Evol.* 69, 151-159.

- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., et al. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211.
- Krantic, S., Dube, F., Quiron, R., Guerrier, P. 1991. Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes. *Dev. Biol.* 146, 491-498.
- Kreke, N., Dietrich, D.R. 2008. Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 215-247.
- Kuemmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V. 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere.* 40, 701-10.
- Kuznetsov, S., Lyanguzowa, M., Bosch, T.C.G. 2001. Role of epithelial cells and programmed cell death in *Hydra* spermatogenesis. *Zoology.* 104, 25-31.
- Kwon, J.W., Armbrust, K.L. 2008. Aqueous solubility, n-octanol-water partition coefficient, and sorption of five selective serotonin reuptake inhibitors to sediments and soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 128-135.
- Kwon, J.W., Armbrust, K.L. 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2561-2568.
- Kwon, J.W., Armbrust, K.L. 2004. Hydrolysis and photolysis of paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, in aqueous solutions. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1394-1399.
- Lajeunesse A, Gagnon C, Gagné F, Louis S, Čejka P, Sauve S. 2011. Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – evidence of biological effects. *Chemosphere.* 83, 564-571.
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauve, S. 2008. Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 80, 5325-5333.
- Lamichhane, K., Santos, N., Garcia, S.N., Huggett, D.B., De Angelis, D.L., La Point, T.W. 2014. Exposures to a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), sertraline hydrochloride, over multiple generations: Changes in life history traits in *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotox. Environ. Safe.* 101, 124-130.
- Larsson, D.G.J., Pedro, C.D., Paxeus, N. 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J. Hazard. Mater.* 148, 751-755.
- Lazzara, R., Blazquez, M., Porte, C., Barata, C. 2012. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 106-107, 123-130.
- Le, T.X., Munekage, Y. 2004. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. *Marine. Pollut. Bull.* 49, 922-929.

- Lemaire, G., Terouanne, B., Mauvais, P., Michel, S., Rahmani, R. 2004. Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 235-246
- Lenhoff, H.M. 1981. Biology and physical chemistry of the feeding response in hydra. In: Cagan, R. (Ed.), *Biochemistry of Taste and Olfaction*. Academic Press, New York, pp. 475-497.
- Leontovich, A.A., Zhang, J., Shimokawa, K., Nagase, H., Sarras, Jr.M.P. 2000. A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development.* 127, 907-920.
- Leurs, R., Church, M.K., Taglialatela, M. 2002. H1-antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin. Exp. Allergy.* 32, 489-498.
- LfU, 2009. Arzneimittelwirkstoffe und ausgewählte Metaboliten – Untersuchungen in bayerischen Gewässern 2004-2008. Bayerisches Landesamt für Umwelt, Umwelt Spezial. [http://www.lfu.bayern.de/wasser/gewaesserqualitaet\\_fluesse/karten\\_berichte\\_veroeffentlichungen/index.htm](http://www.lfu.bayern.de/wasser/gewaesserqualitaet_fluesse/karten_berichte_veroeffentlichungen/index.htm).
- Liang, B., Moussaif, M., Kuan, C.J., Gargus, J.J., Sze, J.Y. 2006. Serotonin targets the DAF-16/FOXO signalling pathway to modulate stress response. *Cell. Metabolism.* 4, 429-440.
- Lin, A.Y.C. Tsai, Y.T. 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Sci. Total Environ.* 407, 3793-3802.
- Lin, A.Y.C., Yu, T.H., Lateef, S.K. 2009. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *J. Hazard. Mater.* 167, 1163-1169.
- Lindberg, R.H., Fick, J., Tysklind, M. 2010. Screening of antimycotics in Swedish sewage treatment plants-waters and sludge. *Water. Res.* 44, 649-57.
- Liu, Q.T., Cumming, R.I., Sharpe, A.D. 2009. Photo-induced environmental depletion processes of beta-blockers in river waters. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8(6), 768-777.
- Liu, Q.T., Williams, H. E. 2007. Kinetics and Degradation Products for Direct Photolysis of  $\beta$ -Blockers in Water. *Environ. Sci. Technol.* 41 (3), 803-810.
- Loomis, W.F. 1955. Glutathione control of the specific feeding reactions of Hydra. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 62, 211-227.
- Lortholary, O., Tod, M., Dupont, B. 1999. Antifongiques. *Encycl. Med. Chir. (Elseviren, Paris). Maladies infectieuses.* 8- 004-M-o, 21.
- MacLeod, S.L., Sudhir, P., Wong, C.S. 2007. Stereoisomer analysis of wastewater-derived  $\beta$ -blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1170, 23-33.
- Mackie, G.O. 2004. Central neural circuitry in the jellyfish *Aglantha*: a model 'simple nervous system'. *Neurosignals.* 13, 5-19.

- Martinez, D.E., Dirksen, M.L., Bode, P.M., Jamrich, M., Steele, R.E., Bode, H.R. 1997. Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra. *Dev. Biol.* 192, 523-536.
- Mascotti, M.R., Enriz, R.D., Giannini, F.A. 2008. Acute toxicity study of commercial antifungal drugs using *Poecilia reticulata*. *Lat. Am. J. Pharm.* 27 (6), 904-905.
- Mason, J. I., Murry, B. A., Olcott, M. and Sheets, J. J. 1985. "Imidazole Antimycotics - Inhibitors of Steroid Aromatase." *Biochem. Pharmacol.* 34 (7), 1087-1092.
- Maszkowska, J., Stolte, S., Kumirska, J., Łukaszewicz, P., Mioduszevska, K., Puckowski, A., Caban, M., Wagil, M., Stepnowski, P., Białk-Bielińska, A. 2014. Beta-blockers in the environment: Part I. Mobility and hydrolysis study. *Sci. Total. Environ.* 493, 1112-1121.
- Mauduit, C., Florin, A., Amara, S., Bozec, A., Siddeek, B., Cunha, S., Meunier, L., Selva, J., Albert, M., Vialard, F., Bailly, M., Benahmed, M. 2006. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on male fertility. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 34(10), 978-984.
- Maurer, M., Escher, B.I., Richle, P., Schaffner, C., Alder, A.C. 2007. Elimination of beta-blockers in sewage treatment plants. *Water. Res.* 41(7), 1614-1622.
- McArdell, C.S., Molnar, E., Suter, M.J.F., Giger, W. 2003. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt valley watershed. Switzerland. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5479-5486.
- McCauley. 1997. Serotonin plays an early role in the metamorphosis of the hydrozoan *Phialidium gregarium*. *Dev. Biol.* 190, 229-240.
- Metcalf, C., Chu, S., Judt, C., Li, H., Ken, D.O., Servos, M.R., et al. 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 79-89.
- Metcalf, C.D., Miao, X.S., Koenig, B.G., Struger, J. 2003. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2881-2889.
- Miao, X.S., Bishay, F., Chen, M., Metcalfe, C.D. 2004. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3533-3541.
- Miljkovic-Licina, M., Gauchat, D., Galliot, B. 2004. Neuronal evolution: analysis of regulatory genes in a first-evolved nervous system, the hydra nervous system. *Biosystems.* 76, 75-87.
- Mills, D.S. 2003. Medical paradigms for the study of problem behaviour: a critical review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81, 265-277.
- Minagh, E., Hernan, R., O'Rourke, K., Lyng, F.M., Davoren, M. 2009. Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 434-440.
- Minguez, L., Ballandonne, C., Rakotomalala, C., Dubreule, C., Kientz-Bouchart, V., Halm-Lemeille, M.P. 2015. Transgenerational Effects of Two Antidepressants (Sertraline and

Venlafaxine) on *Daphnia magna* Life History Traits. *Environ. Sci. Technol.* 49 (2), 1148-1155.

Minguez, L., Farcy, E., Ballandonne, C., Lepailleur, A., Serpentine, A., Lebel, J-M., Bureau, R., Halm-Lemeille, M-P. 2014. Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? *Chemosphere*. 108, 314-319.

Moldovan, Z. 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania, *Chemosphere*. 64, 1808-1817.

Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O. 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803-814.

Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* 48, 549-559.

Müller, W.A. 1989. Diacylglycerol-induced multihead formation in *Hydra* Development. 105, 309-316.

Müller, W.A. 1996. Competition-based head versus foot decision in chimeric *Hydras*. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 1133-1139.

Nakagawa, Y., Itai, S., Yoshida, T., Nagai, T. 1992. Physicochemical properties and stability in the acidic solution of a new macrolide antibiotic, clarithromycin, in comparison with erythromycin. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 725-728.

Nentwing, G. 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 163-170.

Noda, K. 1971. Reconstitution of dissociated cells of hydra. *Zool. Mag.* 80, 99-101.

OECD. 2011. Available at [http://www.oecd-ilibrary.org/sites/health\\_glance-2011-en/04/11/index.html?contentType=&itemId=/content/chapter/health\\_glance-2011-39-en&containerItemId=/content/serial/19991312&accessItemIds=/content/book/health\\_glance-2011-en&mimeType=text/html](http://www.oecd-ilibrary.org/sites/health_glance-2011-en/04/11/index.html?contentType=&itemId=/content/chapter/health_glance-2011-39-en&containerItemId=/content/serial/19991312&accessItemIds=/content/book/health_glance-2011-en&mimeType=text/html) 2011.

Otto J.J., Campbell R.D. 1977. Tissue economics of *hydra*: regulation of cell cycle, animal size and development by controlled feeding rates. *J. Cell. Sci.* 28, 117-132.

Oxford, A.E., Raistrick, H., Simonart, P. 1939. Studies in the biochemistry of microorganisms: Griseofulvin, C(17)H(17)O(6)Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum*. *Dierckx. Biochem. J.* 33(2), 240-248.

Pachura, S., Blaise, C., Vasseur, P. 2006. Toxicity of nonylphenol on the cnidarian *Hydra attenuata* and environmental risk assessment. *Environ. Toxicol.* 21, 388-394.

Pachura, S., cambon, J-P., Blaise C, Vasseur, P. 2005. 4-Nonylphenol induced toxicity and apoptosis in *Hydra attenuata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(12), 3001-3182

Pailler, J.Y., Pfister, K.L., Hoffmann, L., Guignard, C. 2009. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines,

analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Sci. Total Environ.* 407, 4736-4743.

Pal, S. 2006. A journey across the sequential development of macrolides and ketolides related to erythromycin. *Tetrahedron.* 62, 3171–3200.

Pardos, M., Benninghoff, C., Gueguen, C., Thomas, R., Dobrowolski, J., Dominik, J. 1999. Acute toxicity assessment of Polish (waste)water with a microplate-based *Hydra attenuata* assay: a comparison with the Microtox® test. *Sci. Total Environ.* 243/244, 141-148.

Park, J.W., Heah, T.P., Gouffon, J.S., Henry, T.B., Sayler, G.S. 2012. Global gene expression in larval zebrafish (*Danio rerio*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine and sertraline) reveals unique expression profiles and potential biomarkers of exposure. *Environ. Pollut.* 167, 163-170.

Park, S., Choi, K. 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology.* 17, 526-538.

Parrott, J.L. Bennie, D.T. 2009. Life-cycle exposure of fathead minnows to a mixture of six common pharmaceuticals and triclosan. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 72, 633-641.

Pascoe, D., Karntanut, W., Muller, C.T. 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere.* 51, 521-528.

Pascoe, D, Carroll, K, Karntanut, W, Watts, MM. 2002. Toxicity of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris*. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 43, 56-63.

Paterson, G., Metcalfe, C.D. 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere.* 74, 125-130.

Pedersen, J.A., Soliman, M., Suffet, I.H. 2005. Human pharmaceuticals, hormones and personal care product ingredients in runoff from agricultural fields irrigated with treated wastewater. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 1625-1632.

Pedersen, J. A., Yeager, M. A., Suffet, I. H. 2003. Xenobiotic organic compounds in runoff from fields irrigated with treated wastewater. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1360-1372.

Pélissolo, A., Boyer P., Lépine, J.P., Bisserbe, J.C. 1996. Epidemiology of the use of anxiolytic and hypnotic drugs in France and in the world. *L'encephale.* 22(3), 187-196.

Peng, X., Huang, Q., Zhang, K., Yu, Y., Wang, Z., Wang, C. 2012. Distribution, behavior and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China. *Science of the Total Environment.* 426, 311-317.

Perret, D., Gentili, A., Marchese, S., Greco, A., Curini, R. 2006. Sulphonamide residues in Italian surface and drinking waters: a small scale reconnaissance, *Chromatographia.* 63, 225-232.

Péry, A.R.R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., Garric, J. 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere.* 73, 300-304.

Peschka, M., Roberts, P.H., Knepper, T.P. 2007. Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 959-968.

Pfaller, M.A., Diekema, D. J., Gibbs, D.L. et al. 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1366-77.

Pfeifer, T., Tuerk, J., Bester, K., Spiteller, M. 2002. Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 16, 663-669.

Philippe, H., Derelle, R., Lopez, P., Pick, K., Borchiellini, C., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Renard, E., Houliston, E., Queinnec, E., Da Silva C, Wincker P, Le Guyader H, Leys S, Jackson DJ, Schreiber F, Erpenbeck D, Morgenstern B, Wörheide G, Manuel M. 2009. Phylogenomics revives traditional views on deep animal relationships. *Curr. Biol.* 19, 706-712.

Pierobon, P., Concas, A., Santoro, G., Marino, G., Minei, R., Pannaccione, A., Mostallino, M.C., Biggio, G. 1995. Biochemical and functional identification of GABA receptors in *Hydra vulgaris*. *Life Sci.* 56, 1485-1497.

Piram, A., Salvador, A., Verne, C., Herbreteau, B., Faure, R. 2008. Photolysis of b-blockers in environmental waters. *Chemosphere.* 73, 1265-1271.

Pomati, F., Netting, A.G., Calamari, D., Neilan, B.A. 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*, *Aquat.Toxicol.* 67, 387-396.

Ponsoda, X., Jover, R., Castell, J.V., Gómez- Lechón, M.J. 1991. Measurement of intracellular LDH activity in 96-well cultures: A rapid and automated assay for cytotoxicity studies. *J. Tissue. Cult.Meth.* 13, 21-24.

Porter, A.G, Jänicke, R.U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 99-104.

Purdum, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.A., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8, 275-285.

Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C. 2009. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. of the tot. environ.* 407, 1072-1079.

Quinn, B. Gagne, F. Blaise, C. 2008a. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*, *Sci. Total Environ.* 389, 306-314.

Quinn, B., Gagné, F. and Blaise, C. 2008b. The effects of pharmaceuticals on the regeneration of the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci. Tot. Environ.* 402, 62-69.

- Rahat, M., Dimentman, C. 1982. Cultivation of bacteria-free *Hydra viridis*: missing budding factor in no symbiotic hydra. *Science* 216, 67-68.
- Ram, J.L., Crawford, G.W., Walker, J.U., Mojares, J.J., Patel, N., Fong, P.P., Kyojuka, K. 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *J. Exp. Zool.* 265, 587-598.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. 1999. *Pharmacology*, fourth ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Reddersen, K., Heberer, T. 2003. Multi-compound methods for the detection of pharmaceutical residues in various waters applying solid phase extraction (SPE) and gas chromatography with mass spectrometric (GC-MS) detection. *J. Sep. Sci.* 26, 1443-1450.
- Redshaw, C.H., Cooke, M.P., Talbot, H.M., McGrath, S., Rowland, S.J. 2008. Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *J. Soils. Sediments.* 8, 217-230.
- Reinhardt, B., Broun, M., Blitz, I.L., Bode, H.R. 2004. *HyBMP5-8b*, a BMP5-8 orthologue, acts during axial patterning and tentacle formation in hydra. 267, 43-59.
- Reiter, S., Crescenzi, M., Galliot, B., Buzgariu, W. 2012. Hydra, a versatile model to study the homeostatic and developmental functions of cell death. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 593-604.
- Renner, R. 2002. Drug mixtures prove harmful. *Environ. Sci. Technol.* 36, 268A-269A.
- Richards, S.M., Cole, S.E. 2006. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology.* 15, 647-656.
- Roberts, P.H., Thomas, K.V. 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment, *Sci. Total Environ.* 356, 143-153.
- Robertson, J.D., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. 2000. Review: Nuclear events in apoptosis. *J. Struct. Biol.* 129, 346-358.
- Robinson, P.F., Liu, Q.T., Riddle-Andrew, M., Murray-Smith, R. 2007. Modeling the impact of direct photo transformation on predicted environmental concentrations (PECs) of propranolol hydrochloride in UK and US rivers. *Chemosphere.* 66, 757-766.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559-1565.
- Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.J., Blankenhorn, I. 2001. Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany, *J. Chromatogr. A* 938, 199-210.
- Salgado, R., Marques, R., Noronha, J.P., Mexia, J.T., Carvalho, G., Oehmen, A., et al. 2011. Assessing the diurnal variability of pharmaceutical and personal care products in a full-scale activated sludge plant. *Environ. Pollut.* 159, 2359-2367.

Sánchez-Argüello, P., Fernández, C., Tarazona, J.V. 2009. Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water-sediment test. *Sci. Total Environ.* 407, 1937-1946.

Sanderson H, Thomsen, M. 2009. Comparative analysis of pharmaceuticals versus industrial chemicals acute aquatic toxicity classification according to the United Nations classification system for chemicals. Assessment of the (Q)SAR predictability of pharmaceuticals acute aquatic toxicity and their predominant acute toxic mode- of-action. *Toxicol. Lett.* 187, 84-93.

Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GW, van den BM. 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 44-54.

Sanglard, D. 2003. Mécanisme de résistance. In : Infections fongiques : Résistances et nouvelles modalités thérapeutiques, JIDIF : Optimed ED. 29-46.

Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachinia, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45-95.

Sarras, Jr.M.P. 2012. Components, structure, biogenesis and function of the *Hydra* extracellular matrix in regeneration, pattern formation and cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 567-576.

Schlünzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., Franceschi, F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature.* 413, 814-821.

Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L. 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 104, 38-47.

Schultz, M.M., Furlong, E.T., Kolpin, D.W., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., Barber, L.B., et al. 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1918-1925.

Schultz, M.M., Furlong, E.T. 2008. Trace analysis of antidepressant pharmaceuticals and their select degradates in aquatic matrices by LC/ESI/MS/MS. *Anal. Chem.* 80, 1756-1762.

Schwartz, S.S., Hann, B.J., Hebert, P.D.N. 1983. The feeding ecology of *Hydra* and possible implications in the structuring of zooplankton communities. *The Biol. Bull.* 164, 136-142.

Segal, A.Z., Rordorf, G. 1996. Gabapentin as a novel treatment for post herpetic neuralgia. *Neurology.* 46(4), 1175-1176.

Senta, I., Terzic, S., Ahel, M. 2013. Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water Res.* 47, 705-714.

Setzer, R.W., Rogers, J.M. 1991. Assessing developmental hazard: the reability of the A/D ratio. *Teratology.* 46(2), 103-107.

- Sheffer, A.L., Samuels, L.L. 1990. Cetirizine: antiallergic therapy beyond traditional H1 antihistamines. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 86, 1040-1046.
- Shenk, M.A., Gee, L., Steele, R.E., Bode, H.R. 1993a. Expression of *Cnox-2*, a HOM/HOX gene, is suppressed. during head formation in *Hydra*. *Dev. Biol.* 160, 108-118.
- Sher, D., Zlotkin, E. 2009. A hydra with many heads: Protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. *Toxicon.* 54, 1148–1161.
- Shimizu, H., Zhang, X., Zhang, J., Leontovich, A., Fei, K., Yan, L., et al. 2002. Epithelial morphogenesis in hydra requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. *Development.* 129, 1521-1532.
- Shimizu, H., Sugiyama, T. 1993. Suppression of head regeneration by accelerated wound healing in *Hydra*. *Dev. Biol.* 160, 504-511.
- Shostak, S. 2002. Cnidaria (Coelenterates). In: *Encyclopedia of Life Science.*
- Shostak, S. 1993. Cnidaria. In *Reproductive biology of invertebrates (KG Adiyodi and RG Adiyodi, eds), Vol VI, Part A, Asexual propagation and reproductive strategies, pp 45-105.* John Wiley, Chichester.
- Shostak, S. 1979. Digestive cell and tentacle number in freshly detached buds of *Hydra viridis*. *Int. J. Inver. Repr.* 1, 167-178.
- Sills, G.J. 2006. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6, 108-113.
- Simons, F.E.R. 2004. Advances in H1-antihistamines. *N. Engl. J. Med.* 351, 2203-2217.
- Smith, K.M., Gee, L., Bode, H.R. 2000. HyAlx, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in hydra. *Development.* 127, 4743-4752.
- Snyder, R.D., Green, J.W. 2001. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat. Res.* 488, 151-169.
- Sousa MA, Gonçalves C, Cunha E, Hajšlová J, Alpendurada MF. 2011. Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapeutic classes of pharmaceuticals in wastewater samples by SPE–LC–MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 807-822.
- Spanakis, E.K., Aperis, G., Mylonakis, E. 2006. New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage, *Clin. Infect. Dis.* 43, 1060-1068.
- Spongberg, A.L., Witter, J.D. 2008. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Sci. Total Environ.* 397, 148-157.
- Stamatis, N., Hela, D., Konstantinou, I. 2010. Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant. *J. Hazard. Mater.* 175, 829-835.
- Stanley, J.K., Ramirez, A.J., Mottaleb, M., Chambliss, C.K., Brooks, B.W. 2006. Enantiospecific toxicity of the  $\beta$ -blocker propranolol to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1780-1786.

- Steele, R.E. 2002. Developmental signaling in Hydra: what does it take to build a “simple” animal? *Dev. Biol.* 248, 199-219.
- Stumm-Zollinger, E., Fair, G.M. 1965. Biodegradation of steroid hormones. *J. Water Pollut. Control. Fed.* 37, 1506-1510.
- Sugiyama, T. 1994. Spontaneous loss of interstitial stem cells from *Hydra* tissue. *Dev. Biol.* 163, 302-308.
- Sun, G., Thai, S.F., Tully, D.B., Lambert, G.R., Goetz, A.K., Wolf, D.C., et al. 2005. Propiconazole induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver. *Toxicol. Lett.* 155 (2), 277-287.
- Takaku, Y., Shimisu, H., Fujisawa, T. 2011. Microtubules are involved in regulating body length in hydra. *Dev. Biol.* 350(1), 228-237.
- Takeda, N., Svendsen, C.N. 1991. Monoamine concentrations in *Hydra magnipapillata*. *Hydrobiologia*.216/217, 549-554.
- Technau, U., Holstein, T.W. 1995. Head formation in Hydra is different at apical and basal levels. *Development.* 121, 1273-1282.
- Teragawa, C.K., Bode, H.R. 1995. Migrating interstitial cells differentiate into neurons in Hydra. *Dev. Biol.* 171, 286-293.
- Ternes, T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water. Res.* 32, 3245-3260.
- Ternes, T., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.-J., Haist-Glude, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulei-Seibert, N. 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3855-3863.
- Ternes, T.A., Bonerz, M., Schmidt, T. 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewaters and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 938, 175-185.
- Thomas, K.V., Hilton, M.J. 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 436-444.
- Tixier, C., Singer, H.P., Oellers, S., Muller, S.R. 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surface waters, *Environ. Sci. Technol.* 37, 1061-1068
- Tomlin, C.D.S. 2002. *The e-Pesticide Manual*. British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Tolls J. 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environ. Sci. Tech.* 35(17), 3397-3406.
- Trembley, A. 1744. *Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, à bras en forme de cornes*. (Leiden).
- Triebkorn, R., Casper, H., Scheil, V., Schwaiger, J. 2007. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*), Anal. Bioanal. Chem. 387, 1405-1416.

Trosken, E. R., Scholz, K., Lutz, R. W., Volkel, W., Zarn, J. A. and Lutz, W. K. 2004. "Comparative assessment of the inhibition of human recombinant CYP19 (aromatase) by azoles used as fungicides in agriculture and as antimycotic agents and antitumor drugs in humans." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 369, R115-R115.

Trottier S, Blaise C, Kusui T, Johnson EM. 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. Environ. Toxicol. Water. Qual. 12, 265-271.

UBA. 2010. Zusammenstellung des Umweltbundesamtes nach Angaben der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA). Umweltbundesamt, Berlin.

Valenti, T.W., Gould, G.G., Berninger, J.P., Connors, K.A., Keele, N.B., Prosser, K.N., Brooks, B.W. 2012. Human therapeutic plasma levels of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) sertraline decrease serotonin reuptake transporter binding and shelter-seeking behavior in adult male fathead minnows. Environ. Sci. Technol. 46 (4), 2427-2435. <http://dx.doi.org/10.1021/es204164b>.

Valenti, Jr., T.W., Perez-Hurtado, P., Chambliss, C.K., Brooks, B.W. 2009. Aquatic toxicity of sertraline to *Pimephales promelas* at environmentally relevant surface water pH. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2685-2694.

Van de Steene, J.C., Stove, C.P., Lambert, W.E. 2010. "A field study on 8 pharmaceuticals and 1 pesticide in Belgium: Removal rates in waste water treatment plants and occurrence in surface water." Sci. Total Environ. 408(16), 3448-3453.

Van De Steene, J.C., Lambert, W.E. 2008. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. J. Chromatogr. A. 1182, 153-160.

Van der Ven, K., Keil, D., Moens, L.N., Hummelen, P.V., van Remortel, P., Maras, M., De Coen, W. 2006. Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: molecular markers of endocrine disruption. Chemosphere. 65, 1836-1845.

Vannini, C., Domingo, G., Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Castiglioni, S., Bracale, M. 2011. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs on unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. 101(2), 459-465.

Vasskog, T., Anderssen, T., Pedersen-Bjergaard, S., Kallenborn, R., Jensen, E. 2008. Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. J. Chromatogr. A. 1185, 194-205.

Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P.J., Kallenborn, R., Jensen, E. 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. J. Chromatogr. A. 1115, 187-195.

Venkatakrishnan, K. von Moltke, L.L. Greenblatt, D.J. 2000. Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance. Clin. Pharmacokinet. 38, 111-180.

- Venturini, G., Carolei, A. 1992. Dopaminergic receptors in Hydra. Pharmacological and biochemical observations. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 C,39–43.
- Venturini, G., Silei, O., Palladini, G., Carolei, A., Margotta, V. 1984. Aminergic neurotransmitters and adenylate cyclase in *Hydra*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78 C, 345–348.
- Vermes, A., Guchelaar, H.J, Dankert, J. 2000. Flucytosine: A review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 171-179.
- Vieno, N.M., Tuhkanen, T., Kronberg, L. 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* 1134, 101-111.
- Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., Makynen, E.A., Blake, L.S., Greene, K.J., Higley, E.B., Newsted, J.L., Giesy, J.P., Hecker, M. 2007. Comparison of fathead minnow ovary explant assay and H295R cell-based steroidogenesis assays for identifying endocrine active chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 20-32.
- Villigas-Navarro, A., Rosas-L, E., Reyes, J.L. 2003. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Toxicol. Pharmacol.* 136(2), 127-134.
- Vione, D., Feitosa-Felizzola, J., Minero, C., Chiron, S. 2009. Photo transformation of selected human-used macrolides in surface water: kinetics, model predictions and degradation pathways. *Water Res.* 43, 1959-1967.
- Wagner, C., Graninger, W., Presterl, E., Joukhadar, C. 2006. The Echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. *Pharmacology* 78 (4), 161-177.
- Wang, L., Xu, H., Cooper, W.J., Song, W. 2012. Photochemical fate of beta-blockers in NOM enriched waters. *Sci. Total. Environ.* 426, 289-295.
- Weinziger, R., Salgado, L.M., David, C.N., Bosch, T.C.G. 1994. *Ks1*, an epithelial cell-specific gene, responds to early signals of head formation in *Hydra*. *Development.*120, 2511-2517.
- Weissenbacher, S., Ring, J., Hofmann, H. 2005. Gabapentin for the symptomatic treatment of chronic neuropathic pain in patients with late-stage lyme borreliosis: a pilot study. *Dermatology.* 211(2), 123-127.
- Wenger, Y., Buzgariu1, W., Reiter, S. Galliot, B. 2014. Injury-induced immune responses in *Hydra*. *Semin. Immunol.* 26, 277-294.
- Wilby, O.K. 1988. The Hydra regeneration assay. Proceedings of workshop organised by Association Francaise de Teratologie. 108-124.
- Wilby, O. K. and Tesh, J. M. 1990. The Hydra assay as an early screen for teratogenic potential. *Toxicology In Vitro*, vol. 4-5, p. 582-583.
- Wilde, M.L., Mahmoud, W.M.M., Kümmerer, K., Martins, A.F. 2013. Oxidation–coagulation of  $\beta$ -blockers by K<sub>2</sub>FeVIO<sub>4</sub> in hospital wastewater: assessment of degradation products and biodegradability. *Sci. Total. Environ.* 452-453, 137-147.

Wyllie, A.H. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. *Cancer and Metastasis Rev.* 11, 95-103.

Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., Gray Jr., L.E. 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol. Sci.* 66, 69-81.

Winter, M.J., Lillicrap, A.D., Caunter, J.E., Schaffner, C., Alder, A.C., Ramil, M., Ternes, T.A., Giltrow, E., Sumpter, J.P., Hutchinson, T.H. 2008. Defining the chronic impacts of atenolol on embryo-larval development and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 86, 361-369.

Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kusk, K.O. 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 40, 723-730.

Woolley, D. W. 1944. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *J. Biol. Chem.* 152, 225-232.

Wood, J.G., Barnett, R.J. 1965. Histochemical demonstration of norepinephrine at a fine structural level. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 197-209.

Wood, J.G., Lentz, T.L. 1964. Histochemical localization of amines in Hydra and in the sea anemone. *Nature.* 201, 88-90

Wood, J.G., 1963. Identification of and observations on epinephrine and norepinephrine containing cells in the adrenal medulla. *Am. J. Anat.* 112, 285-304.

Wu, C., Witter, J.D., Spongberg, A.L., Czajkowski, K.P. 2009. Occurrence of selected pharmaceuticals in an agricultural landscape, western Lake Erie basin. *Water. Res.* 43, 3407-3416.

Yamashita, N., Yasojima, M., Miyajima, K., Suzuki, Y., Tanaka, H. 2006. Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms, *Water Sci. Technol.* 53, 65-72.

Yamamoto, H., Nakamura, Y., Nakamura, Y., Kitani, C., Imari, T., Sekizawa, J., Takao, Y., Yamashita, N., Hirai, N., Oda, S., Tatarazako, N. 2007. Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan. *Environ. Sci.* 14, 177-193.

Yang, J., Liao, M., Shou, M., Jamei, M., Yeo, K.R., Tucker, G.T., Rostami-Hodjegan, A. 2008. Cytochrome p450 turnover: regulation of synthesis and degradation, methods for determining rates, and implications for the prediction of drug interactions. *Curr. Drug. Metab.* 9, 384-394.

Yasuhiro, M. Toshiharu, H. 2007. Toxicological significance of mechanism-based inactivation of cytochrome p450 enzymes by drugs. *Crit. Rev. Toxicol.* 37(5), 389-412.

Yu, J.T. Bisceglia, K.J., Bouwer, E.J, Roberts, A.L., Coelhan, M. 2012. Determination of pharmaceuticals and antiseptics in water by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry: analysis via pentafluorobenzoylation and stable isotope dilution. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 583-591.

Yu, J.T., Bouwer, Edward, J., Coelhan, M. 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agr. Water Manage.* 86, 72-80

Zacharias, H., Anokhin, B., Khalturin, K. Bosch, T.C.G. 2004. Genome sizes and chromosomes in the basal metazoan *Hydra*. *Zoology.* 107, 219-227.

Zarn, J.A. Bruschweiler, B.J., Schlatter, J.R. 2003. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 $\alpha$ -demethylase and aromatase. *Environ. Health. Perspect.* 111, 255-261.

Zega, G., Pennati, R., Fanzago, A., and DE Bernardi, F. 2007. Serotonin involvement in the metamorphosis of the hydroid. *Eudendrium racemosum*. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 307-313.

Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Melis, M., Fanelli, R. 2010. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 179, 1042-1048.

Zhang W, Ramamoorthy Y, Kilicarslan T, Nolte H, Tyndale RF, Sellers EM. 2002. Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug. Metab. Dispos.* 30 (3), 314-318.

Zurita, J.L., Repetto, G., Jos, A., Salguero, M., Lopez-Artigues, M., Camean, A.M. 2007. Toxicological effects of the lipid regulator gemfibrozil in four aquatic systems. *Aquat. Toxicol.* 81, 106-115.

### **Ecotoxicité, cytotoxicité et potentiel androgène des résidus pharmaceutiques sur les deux modèles biologiques : *Hydra attenuata* et les cellules MDA-Kb2.**

**RESUME :** L'objectif de ce travail a consisté à évaluer différents effets écotoxiques, cytotoxique et le potentiel androgénique de 14 produits pharmaceutiques: la clomipramine, la fluoxétine, la fluvoxamine, la paroxétine, la sertraline et la venlafaxine (antidépresseurs), l'amphotéricine B, l'éconazole, le kétoconazole et le miconazole (antifongiques), la clarithromycine (antibiotique), l'acébutolol ( $\beta$ -bloquants), le gabapentine (antiépileptiques) et la cétirizine (antihistaminiques), à l'aide d'études *in vivo* et *in vitro*. Les tests d'écotoxicité aiguë (96h) sur le cnidaire d'eau douce *Hydra attenuata* ont montré un effet délétère sur la survie des hydres adultes, la morphologie et le développement des embryons pour l'ensemble d'antidépresseurs et des antifongiques testés. Les valeurs de CE50 calculées ont révélé que l'éconazole, le miconazole et la sertraline sont les molécules les plus toxiques. Les tests d'écotoxicité chronique sur les hydres adultes (10 jours) et les embryons (14 jours) ont mis en évidence que la plus part des molécules d'antidépresseurs testées sont des embryotoxiques et tératogènes puisque ils induisent des malformations chez les embryons contrairement aux antifongiques qui présentent des anomalies seulement chez les adultes. Ces tests ont montré aussi que les molécules d'antidépresseurs testées seules sont moins toxiques que lorsqu'elles sont testées en mélange. En effet, le mélange de molécules antidépresseurs testées présente une toxicité plus élevée sur les adultes que sur les embryons, avec une concentration minimale induisant des effets significatifs de l'ordre de  $\text{ng L}^{-1}$ , concentrations proches de celles retrouvées dans l'environnement. De plus, les résultats d'écotoxicité chronique sur plusieurs générations d'hydres ont montré que la morphologie des individus de la première génération (F0) ainsi que ceux de la deuxième génération (F1) été affectée de la même manière, démontrant une sensibilité du même ordre vis-à-vis de la sertraline ou du mélange d'antidépresseurs, tandis que les individus issus de la troisième génération (F2) apparaissent moins sensibles lors de l'exposition à la sertraline. Par contre, la reproduction des hydres exposées à la sertraline est diminué de plus en plus dans chaque génération, avec une toxicité plus importante pour les individus de la troisième génération. Le mélange d'antidépresseurs affecte la reproduction des hydres de la deuxième génération F1 à des concentrations environnementales. Les essais *in vitro* conduits sur les mêmes molécules pharmaceutiques, testées seules et en mélange, sur les cellules MDA-Kb2 n'ont révélé aucun effet androgénique et cytotoxique sur les cellules à des concentrations environnementales.

Mots clés : Ecotoxicologie, composés pharmaceutiques, *Hydra attenuata*, MDA-Kb2, Potentiel androgénique.

### **Ecotoxicity, cytotoxicity and androgenic potential pharmaceutical residues on two biological models: *Hydra attenuata* and MDA-KB2 cells.**

**ABSTRACT:** The objective of this work was to evaluate different ecotoxic, cytotoxic and androgenic effects of 14 pharmaceutical compounds: clomipramine, fluoxetine, fluvoxamine, paroxetine, sertraline and venlafaxine, amphotericin B, econazole, ketoconazole and miconazole, clarithromycin, the acebutolol, gabapentin and cetirizine, using *in vivo* and *in vitro* studies. The acute ecotoxicity tests (96h) on the freshwater cnidarian *Hydra attenuata* showed deleterious effects on adult survival, morphology and embryo development for all tested antidepressants and antifungals drug. The values of EC50 concentrations revealed that econazole, miconazole and sertraline are the most toxic molecules. The chronic ecotoxicity tests on hydras adults (10 days) and embryos (14 days) revealed that most of the molecules tested antidepressants are embryotoxic and teratogenic as they cause malformations in embryos contrary to antifungal which display abnormalities in adults only. These tests also showed that antidepressants tested individually are less toxic than when tested as a mixture. This mixture has a higher toxicity on adults than on embryos, with significant effects concentrations around  $\text{ng L}^{-1}$  which are close to measured environmental concentrations. In addition, chronic ecotoxicity results over several generations of hydras have shown identical sensitivity of both first and second generation on morphology of individuals. No more toxicity was observed on the third generation of hydra. Concerning the reproduction of hydras, this parameters was strongly decreased in all generations with an increasing sensitivity of individuals along the generations. Moreover, the mixture of antidepressants affect reproduction of hydras for the second generation at environmental concentrations. *In vitro* tests conducted on MDA-KB2 cells with the same pharmaceuticals revealed that these compounds tested did not exert any androgenic and cytotoxic effect on cells in culture at environmental concentrations.

Key words: Ecotoxicology, pharmaceutical compounds, *Hydra attenuata*, MDA-Kb2, androgenic potential.

