



Évaluation de la toxicité de molécules médicamenteuses par une étude des réponses comportementales, physiologiques et transcriptomiques d'un mollusque dulçaquicole (*Radix balthica*) et d'un plathelminthe (*Schmidtea polychroa*)

Jean-Yves Mazzitelli

► To cite this version:

Jean-Yves Mazzitelli. Évaluation de la toxicité de molécules médicamenteuses par une étude des réponses comportementales, physiologiques et transcriptomiques d'un mollusque dulçaquicole (*Radix balthica*) et d'un plathelminthe (*Schmidtea polychroa*). Biologie moléculaire. Université Toulouse le Mirail - Toulouse II, 2017. Français. NNT : 2017TOU20014 . tel-02042344

HAL Id: tel-02042344

<https://theses.hal.science/tel-02042344>

Submitted on 20 Feb 2019

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse - Jean Jaurès

Présentée et soutenue par :

Jean-Yves MAZZITELLI

Le : Jeudi 16 Mars 2017

Titre :

Évaluation de la toxicité de molécules médicamenteuses par une étude des réponses comportementales, physiologiques et transcriptomiques d'un mollusque dulçaquicole (*Radix balthica*) et d'un plathelminthe (*Schmidtea polychroa*)

École doctorale :

ED TESC : Études rurales en géographie, environnement

Unité de recherche :

BTSB (Laboratoire d'accueil, EA 7417, INU Champollion, Albi)

GEODE (Laboratoire de rattachement, UMR 5602, Université Jean-Jaurès, Toulouse)

Directeurs de thèse :

Florence GERET – Professeur des universités (Pr.), INU Champollion, Albi

Elsa BONNAFE – PRAG Docteur (Dr.), INU Champollion, Albi

Jury :

Alain GEFFARD – Professeur des universités (Pr.), Université de Reims Champagne Ardenne, Reims (Rapporteur)

Jérôme CACHOT – Professeur des universités (Pr.), Université de Bordeaux, Bordeaux (Rapporteur)

Marie-Agnès COUTELLE – Chargée de Recherche (CR), INRA de Rennes, Rennes (Examineur)

Wilfried SANCHEZ – Directeur de la Fondation Rovaltain (Dr., HDR) (Examineur)



ALLOCATIONS DE RECHERCHE SOUTIEN AUX DOCTORANTS 2013

Par délibération de l'assemblée du conseil régional, une subvention régionale a été attribuée à l'INU Champollion dans le cadre de la politique régionale d'aide à la recherche (dossier numéro 13050218). Cette mesure est destinée à soutenir la valorisation des connaissances et le transfert du savoir-faire au bénéfice notamment des laboratoires par la formation des jeunes docteurs.

L'objectif est de permettre à des étudiants préparant une thèse en Midi-Pyrénées d'effectuer un travail de recherche dans un des établissements du site. Dans le cadre de cette thèse, le complément de financement a été apporté par l'INU Champollion.

Nous tenons à remercier la Région Occitanie Pyrénées Méditerranée (ex Midi-Pyrénées) et l'INU Champollion de leur soutien dans le cadre de ce travail de recherche.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, Alain GEFARD et Jérôme CACHOT d'avoir accepté de lire, examiner et critiquer mon travail dans le but d'approfondir la discussion autour du sujet. Je remercie également les autres membres du jury, Marie-Agnès COUTELLE et Wilfried SANCHEZ d'avoir apporté un regard extérieur à mon travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse Florence GERET, sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce doctorat, qui est pour moi l'aboutissement de 8 ans de formation. Je la remercie d'avoir su accepter mes remarques (parfois sans trop de formes) et de m'avoir laissé suffisamment de libertés pour faire évoluer le sujet, mais aussi d'avoir su discuter mes décisions lorsqu'il le fallait. Je remercie aussi immensément ma codirectrice de thèse Elsa BONNAFE qui m'a accompagné au plus près de mes expérimentations, notamment en biologie moléculaire. Je la remercie également d'avoir su apporter ses remarques avec beaucoup de souplesse. Je la remercie également pour toutes les corrections pertinentes qu'elle a pu apporter tout au long de ma thèse. Malgré ses 384 heures d'enseignement annuel, elle a su se montrer disponible aussi bien à la paillasse qu'en réunion. Étant la codirectrice d'une autre thèse et n'ayant aucune décharge d'enseignement, cela relève de la prouesse, merci encore.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse Marie-Agnès COUTELLE, Philippe ROUSSEAU et Patrice GONZALEZ qui ont su m'apporter leurs points de vue extérieurs et de nous avoir aidé à prendre les bonnes décisions. Merci également à mes stagiaires, Laurie VERGNE et particulièrement Claire BOSCUS pour avoir produit de nombreux résultats en peu de temps.

Merci également aux autres membres de la nouvelle équipe d'accueil BTSB, Michel TREILHOU le directeur de l'équipe et du laboratoire pour toutes ses anecdotes, ses histoires et ses repas toujours bien arrosés pour fêter une arrivée, un article ou un départ, un départ, un départ, un départ.. Oui à Albi on arrose beaucoup les départs (n'est-ce pas Axel). Merci aussi à l'ensemble des techniciens pour leur présence et leur disponibilité, Nathan TENE, Jean-Luc CARAYON et tout particulièrement Jean-Michel MALGOUYRES pour la maintenance des élevages, pour sa curiosité et surtout de m'avoir accompagné de très nombreuses fois récolter planaires et gastéropodes, parfois même avec une température de l'eau à 5°C. Merci à Laetitia CHARRON de m'avoir apporté une aide précieuse sur l'étude de la planaire, notamment pour le point biblio et l'aide pour le développement des méthodes d'expositions. Merci également d'être venue les week-ends compter les cocons pondus et les cocons éclos. (Désolé pour cette fameuse soirée où je t'ai lâché en pleine décapitation de planaire, je sais que tu m'en veux encore ^^)

Enfin, merci à mes compagnons de galère, Vincent PIOU pour son accent du Nord !!, ses blagues mal tournées (ressemblant parfois aux miennes), ses chansons d'arrière-arrière-grand-père, son aide précieuse sur le logiciel R, ses corrections en anglais, de m'avoir appris les bases du fonctionnement d'une ruche, pour les tennis entre 12h et 14h, pour sa compagnie les week-ends, jours fériés et vacances scolaires passées au labo et bien sûr pour son aide à chaque fois que je me posais des questions de stats ou d'anglais. Merci encore mon PIOU PIOU ça a été un plaisir de

partager mon bureau avec toi. Merci également à Marion ALLAOUA, initialement stagiaire M2, puis maintenant dans l'aventure de la thèse et maintenant doctorante et compagne de Vincent PIOU (le labo ça rapproche ^^). Merci à elle pour son aide en manip qui a pu me faire gagner parfois beaucoup de temps, merci aussi pour les discussions scientifiques et relectures de mails et CV, merci également pour les infos journalières du temps du jour et de la semaine, de l'actu people et de vidéos et sites trash. Cela a été un plaisir de partager mon bureau avec toi. Merci également à Axel, le petit homme à poils guyanais, myrmécologue et scientifique brillant et talentueux. Merci pour tes conseils et tes relectures avant la soumission de mon article. Merci également pour tes soirées, accompagnées de Vincent et Marion, dans les rues d'Albi sous l'emprise du Rhum !!! Merci de m'avoir donné l'envie d'en savoir plus sur les fourmis, un monde dans un monde. Merci également pour ton invitation à découvrir la Guyane, j'espère pouvoir y faire honneur au plus vite.

Enfin un grand merci à tous mes amis qui m'ont soutenu psychologiquement tout au long de ces trois ans. Merci à Romain MARGUERON, mon Marin Pompier breton préféré, frère d'escalade et de sport en général, j'espère te revoir bientôt et merci d'avoir pris de mes nouvelles régulièrement. Merci également à Anthony PERRIER, Lucas PLY, Fabien LONJON, Léa MARIE et Pierre DUPUY pour toutes les soirées que l'on a faites ensemble. Merci également à Nicolas MATER, qui m'a mis le pied à l'étrier pour le doctorat et avec qui j'ai eu de nombreux échanges en compagnie de Marion DARIET au cours de nos pauses café pendant mes stages de Master 1 et 2. Merci à toi pour tes conseils tout au long de la thèse et pour les soirées et les sorties en voilier (merci aussi à toi Gaëlle) !!!! Merci à tous mes amis Maxime DENQUIN, Thomas MACARIO, Nicolas CHAUVIN, Lionel NOUGUIER, Cedric MIMRAN-ALAIN que je revois souvent en coup de vent sur Avignon, merci à tous mes amis des classes préparatoires TB, et merci à tous ceux que j'oublie et à tous les anciens de ma promo de Master 2 MABBS.

Enfin, un immense merci à Severine DUCHE qui partage ma vie depuis maintenant 6 ans. Merci de m'avoir soutenu, écouté, conseillé tout au long du doctorat. Merci pour toute la bonne cuisine que tu me prépares et merci de partager ma passion du vin. Merci pour toute la chaleur que tu apportes dans ma vie et tout l'amour que tu me portes. Merci aussi pour les sacrifices que tu as faits afin de me permettre de réaliser mon doctorat. Merci de me supporter surtout pendant cette longue phase de rédaction.

Je voulais également remercier tout particulièrement ma famille. Merci à mes parents pour tous les sacrifices qu'ils ont faits pour me permettre d'en arriver là. Merci de m'avoir écouté et soutenu tout au long de ma thèse, je vous en suis très reconnaissant. Merci également à ma sœur et à mon frère ainsi que ma belle-sœur et mon beau-frère pour m'avoir soutenu et écouté expliquer pendant des heures ce que je fais au laboratoire. Merci tout particulièrement à mon frère et à ma belle-sœur pour leurs corrections express de l'orthographe. Merci également à Hibiki qui, elle, profite de ma chaleur plus qu'elle ne m'en apporte...

Un simple merci n'est pas suffisant pour exprimer toute ma gratitude et ma fierté d'être votre fils et votre frère. Nous partageons un patrimoine génétique ainsi que mon environnement et vous constituez donc une grande part de la personne que je suis devenu, ce travail de thèse est aussi

le vôtre. Je me sens chanceux chaque jour de vous avoir comme parents, frère et sœur. Même si je me suis éloigné géographiquement pour cette thèse et que je serais peut-être amené à m'éloigner encore à l'avenir, vous êtes toujours présents avec moi et vous donnez du sens à ma vie. Merci pour tout ça...

Résumé

Les médicaments sont fréquemment retrouvés dans les effluents de STEP, eux-mêmes rejetés dans l'environnement aquatique. Dans le but de prévenir et de mieux comprendre les impacts des médicaments sur les écosystèmes aquatiques, il semble pertinent d'évaluer les perturbations comportementales, physiologiques et transcriptomiques des psychotropes sur les organismes aquatiques. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude a été d'évaluer les perturbations induites par 4 psychotropes (oxazépam, carbamazépine, cyamémazine et sertraline) chez deux organismes d'eau douce, *Radix balthica* et *Schmidtea polychroa*. Pour ce faire, des embryons de *Radix* au stade trochophore et des planaires adultes ont été exposés à chaque psychotrope (du $\mu\text{g/L}$ jusqu'à $100 \mu\text{g/L}$). Il en ressort que les psychotropes allongent la durée du développement embryonnaire du *Radix* et perturbent le déplacement, la reproduction et la digestion de la planaire. D'un point de vue fonctionnel, après analyse transcriptomique, nous avons observé chez le *Radix* un impact des psychotropes sur la voie de signalisation Notch, connue pour intervenir dans la morphogénèse des organes (système nerveux, tube digestif, mésoderme, hypoderme). Les psychotropes perturbent également les voies de biosynthèse des polyamines (rôle dans la différenciation cellulaire et la croissance) et des catécholamines (neurotransmetteurs impliqués notamment dans le contrôle des fonctions cardiaque et ciliaire). Chez la planaire, les psychotropes perturbent le déplacement, la reproduction et la digestion des planaires. L'étude transcriptomique montre que les 4 psychotropes modulent l'expression de gènes impliqués dans la mobilité ciliaire et musculaire, dans les systèmes nerveux, reproducteur, excréteur et digestif. Globalement, les travaux de thèse ont mis en évidence une perturbation des principales grandes fonctions physiologiques des organismes étudiés en présence de psychotropes laissant envisager des effets similaires pour des organismes phylogénétiquement proches. Ces résultats, tant macroscopiques que transcriptomiques, peuvent nous amener à imaginer une perturbation de la fitness des populations et donc un impact sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes d'eau douce exposés à ces médicaments.

Abstract

Pharmaceuticals are often found in WWTP effluents released in surface water. In order to warn and to understand the pharmaceuticals impact on aquatic ecosystems, it seems relevant to evaluate physiological, behavioural and transcriptomic disturbances of psychotropic on freshwater organisms. The aim of this study was thus to analyse disturbances of four psychotropic (oxazepam, carbamazepine, cyamemazine and sertraline) on two freshwater organisms, *Radix balthica* and *Schmidtea polychroa*. In our experiments, both *Radix* embryos at the trochophore stage and mature planarian were exposed to each psychotropic (from 1 to 100 µg/L). This psychotropic exposure results in increasing the duration of *Radix* embryonic development and in a disturbance of the mobility, the reproduction and the digestion but not the regeneration of planarian. Regarding the functional impact, we observed that psychotropic disturb genes involved in Notch signalling pathways, known to be involved in organ morphogenesis (nervous system, digestive tube, mesoderm and hypoderm), but also the biosynthetic pathways of polyamines (involved in growth and cell differentiation) and catecholamines (neurotransmitters inducing physiological disturbances, notably in the management of cardiac and cilia function). In planarian study, psychotropic disturb the planarian mobility, reproduction and digestion. The transcriptomic study shows that the four psychotropic module expressions of genes involved in ciliary and muscular motility and in the nervous, reproductive and excretory systems. Globally, this work has highlighted the impacts on main physiological functions of the organisms physiologically close. These results both macroscopic and transcriptomic, let us imagine a disturbance of the population fitness and so on the structure and state of the freshwater ecosystem exposed to pharmaceuticals.

Sommaire

<u>Liste des travaux</u>	i
<u>Liste des figures</u>	ii
<u>Liste des tableaux</u>	vi
<u>Liste des abréviations</u>	vii
Introduction Générale	1
Chapitre 1 : État de l’art	5
I. Les médicaments et leur devenir dans l’environnement	5
a. Genèse et cycle de vie du médicament.....	5
b. Le marché des médicaments et mode de consommation	7
c. L’entrée des produits pharmaceutiques dans l’environnement.....	9
i. Les sources de pollutions atmosphériques	10
ii. Les sources de pollutions des sols.....	11
iii. Les sources de pollutions aquatiques.....	11
d. Efficacité des Stations d’épurations envers les médicaments	14
e. Occurrence des médicaments dans les compartiments aquatiques.....	16
f. Hiérarchisation et évaluation des risques de la présence de résidus de médicaments rejetés dans le compartiment aquatique	18
II. Les médicaments psychotropes, intérêt, effets et cibles thérapeutiques	24
a. Les différentes classes thérapeutiques de psychotropes.....	25
b. L’oxazépam.....	26
i. Effet(s) thérapeutique(s) contre la ou les pathologie(s) ciblée(s).....	26
ii. Les effets secondaires du traitement	28
iii. Toxicité de l’oxazépam	28
c. La carbamazépine.....	30
i. Effet(s) thérapeutique(s) contre la ou les pathologie(s) ciblée(s).....	30
ii. Les effets secondaires du traitement	32
iii. Evaluation de la toxicité	33
d. La cyamémazine	35
i. Effet(s) thérapeutique(s) contre la ou les pathologie(s) ciblée(s).....	35
ii. Les effets secondaires du traitement	37
iii. Toxicité de la cyamémazine.....	37
e. La sertraline	39

i.	Effet(s) thérapeutique(s) contre la ou les pathologie(s) ciblée(s)	39
ii.	Les effets secondaires du traitement	41
iii.	Toxicité de la sertraline	42
III.	La toxicité environnementale des médicaments psychotropes	43
a.	Toxicité environnementale des 4 psychotropes d'intérêts	44
i.	L'oxazépam	44
ii.	La carbamazépine	45
iii.	La cyamémazine	47
iv.	La sertraline	48
IV.	Les modèles biologiques de notre étude	50
a.	L'organisme modèle <i>Radix balthica</i>	50
i.	Systématique, répartition et écologie	50
ii.	Morphologie et clé de détermination	52
iii.	Cycle de reproduction et développement.....	53
b.	L'organisme modèle <i>Schmidtea polychroa</i>	55
i.	Systématique, répartition et écologie	55
ii.	Morphologie de <i>S. polychroa</i>	57
iii.	Cycle de reproduction et développement.....	59
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes		63
I.	Échantillonnage et mise en place des élevages	63
a.	Échantillonnage et mise en stabulation des mollusques	63
b.	Échantillonnage et mise en stabulation des planaires	63
II.	Évaluation des impacts phénotypiques de quatre médicaments	63
a.	Préparation des solutions d'exposition utilisées pour les tests sur le <i>R. balthica</i>	63
b.	Test d'embryotoxicité sur le <i>R. balthica</i>	64
c.	Préparation des solutions d'exposition utilisées pour les tests sur <i>S. polychroa</i>	65
d.	Étude de la capacité de régénération de la partie céphalique en présence de médicaments sur <i>S. polychroa</i>	65
e.	Étude de l'impact des médicaments sur la mobilité de <i>S. polychroa</i>	66
f.	Étude de la fécondité de <i>S. polychroa</i> et de la fertilité des cocons pondus en présence de médicaments	67
III.	Évaluation de l'impact transcriptomique et biochimique des médicaments.....	67
a.	Extraction d'ARN total et traitements bioinformatiques pour le séquençage du transcriptome en conditions différentielles sur le <i>R. balthica</i>	67
b.	Extraction d'ARN total pour l'étude transcriptomique du <i>R. balthica</i> en RT-qPCR	68

c. Méthodologie de l'amplification en RT-qPCR et des traitements statistiques de l'étude transcriptomique du <i>R. balthica</i>	69
i. Le principe de la RT-qPCR	69
ii. Vérification de l'efficacité des amorces en plaque à 384 puits	71
d. Localisation de l'expression de cinq gènes par Hybridation In Situ (HIS) sur embryon de <i>R. balthica</i> ..	72
i. Clonage des ADNc des gènes sélectionnés.....	73
ii. Synthèse des sondes par transcription in vitro	74
iii. Hybridation In Situ in toto sur embryons de <i>R. balthica</i>	74
e. Extraction de l'ARN total de <i>S. polychroa</i> et traitement statistique pour l'étude de la réponse transcriptomique par RT-qPCR.....	76
f. Dosage de l'activité hydrolytique de la trypsine	77

Chapitre 3 : Les psychotropes perturbent-ils le développement embryonnaire du *R. balthica* ?

I. Cinétiques de dégradation des psychotropes.....	81
II. Étude de l'embryotoxicité de quatre psychotropes sur le <i>R. balthica</i>	82
a. Étude des perturbations du développement embryonnaire du <i>R. balthica</i> exposé à l'oxazépam (OXZ)	82
b. Étude des perturbations du développement embryonnaire du <i>R. balthica</i> exposé à la carbamazépine (CBZ)	83
c. Étude des perturbations du développement embryonnaire du <i>R. balthica</i> exposé à la cyamémazine (CYZ).....	83
d. Étude des perturbations du développement embryonnaire du <i>R. balthica</i> exposé à la sertraline (SRT).....	84
e. Bilan et discussion de l'embryotoxicité des 4 médicaments sur le <i>R. balthica</i>	85
i. Oxazépam	85
ii. Carbamazépine	86
iii. Cyamémazine	87
iv. Sertraline	87
v. Bilan	88
III. Séquençage du transcriptome et analyse en différentiel de la réponse transcriptomique du <i>R. balthica</i> exposé à l'oxazépam	89
a. Analyse du séquençage	89
i. Description.....	89
ii. Bilan	91
b. Analyse de l'assemblage et du réalignement (mapping) des reads.	91
i. Assemblage.....	91
ii. Le mapping des reads.....	92

iii.	Détection des Insertions, Délétions (INDEL) et des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP)	93
iv.	Bilan	93
c.	Annotation des contigs.....	93
d.	Résultats de l'analyse de l'expression en différentiel	95
i.	Les contigs différentiellement exprimés	95
ii.	Annotation fonctionnelle des contigs DE	100
iii.	Bilan de l'analyse de l'expression différentielle du RNASeq	102
IV.	Les psychotropes impactent-ils le transcriptome du <i>R. balthica</i> ?	106
a.	Impacts de l'oxazépam évalués sur 94 gènes par RT-qPCR.....	108
b.	Impacts de la carbamazépine évalués sur 94 gènes par RT-qPCR.....	109
c.	Impacts de la cyamémazine évalués sur 94 gènes par RT-qPCR	111
d.	Impacts de la sertraline évalués sur 94 gènes par RT-qPCR.....	113
e.	Bilan et discussion de l'impact transcriptomique des psychotropes sur le <i>R. balthica</i>	114
i.	Effets spécifiques de l'oxazépam.....	116
ii.	Effets spécifiques de la carbamazépine	117
iii.	Effets spécifiques de la cyamémazine	118
iv.	Effets spécifiques de la sertraline	119
f.	Comparaison de l'étude du RNAseq en différentielles de l'étude en RT-qPCR	120
V.	Etude fonctionnelle de quelques gènes impactés par l'oxazépam	121
Chapitre 4 : Résultats et discussions des expérimentations menées sur <i>S. polychroa</i>		
125		
I.	Les psychotropes perturbent-ils la mobilité de la planaire <i>S. polychroa</i> ?	125
a.	Étude de la mobilité de <i>S. polychroa</i> exposée à l'oxazépam (OXZ).....	125
b.	Étude des perturbations de la mobilité de la planaire <i>S. polychroa</i> exposée à la carbamazépine (CBZ)	126
c.	Étude de la mobilité de la planaire <i>S. polychroa</i> exposée à la cyamémazine (CYZ).....	126
d.	Étude de la mobilité de la planaire <i>S. polychroa</i> exposée à la sertraline (SRT).....	127
e.	Bilan et discussion des perturbations de la mobilité de la planaire par une exposition aux psychotropes	128
i.	Oxazépam	128
ii.	Carbamazépine	129
iii.	Cyamémazine	130
iv.	Sertraline	131
II.	Les psychotropes impactent-ils la fécondité de la planaire <i>S. polychroa</i> ?	131
a.	Étude des perturbations de la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i> exposée à l'oxazépam (OXZ)	131

b.	Étude des perturbations de la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i> exposée à la carbamazépine (CBZ)	132
c.	Étude des perturbations de la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i> exposée à la cyamémazine (CYZ).....	133
d.	Étude des perturbations de la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i> exposée à la sertraline (SRT)	133
e.	Bilan et discussion des perturbations de la fécondité de la planaire par une exposition aux psychotropes	134
i.	Oxazépam	135
ii.	Carbamazépine	135
iii.	Cyamémazine	136
iv.	Sertraline	136
v.	Bilan	137
III.	L'exposition de la planaire <i>S. polychroa</i> aux psychotropes impacte-t-elle la fertilité des cocons pondus ?	137
IV.	La régénération des planaires est-elle perturbée par une exposition aux psychotropes pendant la régénération ?	138
a.	Étude des perturbations de la régénération de la planaire au cours d'une exposition aux psychotropes et après 21 jours d'exposition	138
V.	Les psychotropes impactent-ils les fonctions digestives de la planaire <i>S. polychroa</i> ?	140
VI.	Les psychotropes ont-ils un impact sur le transcriptome de <i>S. polychroa</i> ?	142
a.	Les impacts de l'oxazépam évalués sur 87 gènes par RT-qPCR.....	143
b.	Les impacts de la carbamazépine évalués sur 87 gènes par RT-qPCR.....	144
c.	Les impacts de la cyamémazine évalués sur 87 gènes par RT-qPCR	146
d.	Les impacts de la sertraline évalués sur 87 gènes par RT-qPCR.....	149
e.	Bilan et discussion des perturbations transcriptomiques de la planaire exposée aux psychotropes..	151
i.	Mobilité de la planaire.....	151
ii.	Reproduction de la planaire	157
iii.	Digestion protéique et métabolisme énergétique	160
iv.	Détoxification	162
v.	Développement du système nerveux.....	164
vi.	Bilan	165
	Bilan et perspectives	167
	Annexes	203

Liste des travaux

Publication:

- Mazzitelli J-Y, Bonnafe E, Klopp C, *et al.* (2016) De novo transcriptome sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover genes and pathways affected by exposure to oxazepam. *Ecotoxicol Lond Engl*. doi: 10.1007/s10646-016-1748-1

Congrès scientifiques:

2016

- Congrès français ECO-TOX porté par la fondation Rovaltain à Alixan (Communication orale)
- Congrès international ICRAPHE à Paris (Communication orale)

2015

- Congrès français CEPA à La Rochelle (Présentation d'un poster)
- Congrès international SETAC à Nantes (Présentation d'un poster)
- Congrès français ECO-TOX porté par la fondation Rovaltain à Alixan (Présentation d'un poster)

2014

- Congrès français Effervescence à Montpellier (Présentation d'un poster)
- Congrès international SETAC à Barcelone (Présentation d'un poster)
- Congrès français APTEN à Poitiers (Présentation d'un poster)

Vulgarisation scientifique :

- Ma thèse en 180 secondes (2015)
- Nuit européenne des chercheurs (2015)
- Nuit européenne des chercheurs (2014)
- Conférencier pour l'Agence de l'eau Adour-Garonne (2013-2016)

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des différentes pollutions au cours de l'histoire.....	1
Figure 2 : Le développement d'une nouvelle substance pharmaceutique	6
Figure 3 : Le cycle de vie du médicament, de 1980 à nos jours	6
Figure 4 : principaux marchés des médicaments par zone géographique.....	7
Figure 5 : Évolution de la consommation d'antidépresseurs et d'anxiolytiques (2000 - 2013) (.....	9
Figure 6 : Les différentes sources d'entrée des médicaments dans les compartiments aquatiques	13
Figure 7 : Processus d'élimination des polluants organiques et inorganiques de l'eau.....	16
Figure 8 : Schéma de la procédure d'évaluation du risque environnemental de l'EMA.....	20
Figure 9 : Molécule d'oxazépam.....	26
Figure 10 : Récepteur GABA de type A couplé à un canal chlorure	27
Figure 11 : Mode d'action de l'oxazépam	27
Figure 12 : Métabolisation de l'oxazépam	28
Figure 13 : Molécule de carbamazépine	30
Figure 14 : Schéma d'un canal sodium voltage dépendant.....	31
Figure 15 : Mode d'action de la carbamazépine chez les vertébrés	32
Figure 16 : Les étapes de la métabolisation de la carbamazépine	32
Figure 17 : Formule de la cyamémazine.....	35
Figure 18 : Les deux types de récepteurs à la dopamine	36
Figure 19 : Mode d'action de la cyamémazine.....	37
Figure 20 : Molécule de sertraline.....	39
Figure 21 : Mode d'action de la sertraline	40
Figure 22 : Métabolisme de la sertraline.....	41
Figure 23 : Schéma des différents types de paramètres mesurables à différents niveaux d'organisation biologique.....	43
Figure 24 : Distribution de <i>S. polychroa</i>	52
Figure 25 : Clé de détermination du genre <i>Radix</i>	53
Figure 26 : Photographies du <i>Radix balthica</i>	54
Figure 27 : Organisation du système reproducteur endocrinien femelle de <i>Lymnaea stagnalis</i>	54
Figure 28 : Distribution de <i>S. polychroa</i>	56
Figure 29 : Représentation de la corrélation entre la taille et la ressource alimentaire des planaires.	58
Figure 30 : Photographie de la face dorsale de <i>Schmidtea polychroa</i>	58
Figure 31 : Organisation des cils d'une planaire.....	59
Figure 32 : Organisation du système reproducteur chez <i>Dugesia</i> sp.....	60

Figure 33 : Stades de régénération de la planaire.....	66
Figure 34 : Répartition en arènes de dix planaires pour étudier le déplacement et la giration.	66
Figure 35 : Représentation de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles au cours d'une amplification en qPCR.	70
Figure 36 : Puce Biomark 96x96	72
Figure 37 : Carte de restriction du vecteur "PCRII TOPO Vector".	73
Figure 38 : Position des sites de restrictions et des sites d'initiations de transcription	74
Figure 39 : Réaction de l'hydrolyse du BAPNA en N α -BA et pNA par la trypsine.	77
Figure 40 : Cinétique de dégradation de l'oxazépam.....	81
Figure 41 : Évaluation de la toxicité embryonnaire de l'oxazépam sur le mollusque <i>R. balthica</i>	82
Figure 42 : Évaluation de la toxicité embryonnaire de la carbamazépine sur le mollusque <i>R. balthica</i>	83
Figure 43 : Évaluation de la toxicité embryonnaire de la cyamémazine sur le mollusque <i>R. balthica</i>	84
Figure 44 : Évaluation de la toxicité embryonnaire de la sertraline sur le mollusque <i>R. balthica</i>	84
Figure 45 : Représentation du nombre de reads obtenus après le séquençage de chaque librairie	90
Figure 46 : Représentation de la contamination moyenne de chaque librairie.....	90
Figure 47 : Graphique représentant le nombre de reads après "nettoyage" des fragments trop courts, trop longs ou redondants.....	91
Figure 48 : Diagramme représentant le nombre de contigs en fonction de leur taille (en nt)	92
Figure 49 : Représentation de l'efficacité du réalignement des reads.....	92
Figure 50 : Résultat de l'annotation des séquence	94
Figure 51 : Représentation graphique obtenue par le classement des GO-term de chaque contig séquencé	95
Figure 52 : Représentation graphique de la classification des GO-term des contigs différentiellement exprimés en présence d'oxazépam.....	100
Figure 53 : Représentation de la classification des K numbers selon les trois ontologies KEGG, "Métabolism", "Genetic Information Processing" et "Signalling and cellular Processes".	101
Figure 54 : Dendrogramme du profil d'expression des 91 gènes (représentés par le heatmap) en fonction des conditions d'exposition.	107
Figure 55 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour chaque condition d'exposition	108
Figure 56 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à l'oxazépam.....	108
Figure 57 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la carbamazépine.....	110
Figure 58 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gènes pour les deux conditions d'expositions à la cyamémazine.	112
Figure 59 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la sertraline	113

Figure 60 : Photographie de la localisation de la B-tubuline sur des embryons de <i>Radix</i> (10 jours post fécondation).	122
Figure 61 : Représentation graphique de l'impact de l'oxazépam sur la mobilité de la planaire <i>S. polychroa</i> . ..	125
Figure 62 : Représentation graphique de l'impact de la carbamazépine sur la mobilité de la planaire <i>S. polychroa</i>	126
Figure 63 : Représentation graphique de l'impact de la cyamémazine sur la mobilité de la planaire <i>S. polychroa</i>	126
Figure 64 : Représentation graphique de l'impact de la sertraline sur la mobilité de la planaire <i>S. polychroa</i> ..	127
Figure 65 : Représentation graphique de l'impact de l'oxazépam sur la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i>	132
Figure 66 : Représentation graphique de l'impact de la carbamazépine sur la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i>	132
Figure 67 : Représentation graphique de l'impact de la cyamémazine sur la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i>	133
Figure 68 : Représentation graphique de l'impact de la sertraline sur la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i>	134
Figure 69 : Représentation graphique de la fertilité	138
Figure 70 : Illustration des 5 stades de régénération de la partie céphalique	139
Figure 71 : Régénération de la partie céphalique de la planaire en présence de psychotropes.	140
Figure 72 : Représentation graphique de l'activité de la trypsine chez <i>S. polychroa</i> après 30 jours d'exposition à chaque médicament.....	141
Figure 73 : Dendrogramme du profil d'expression des 87 gènes (représentés par le heatmap) en fonction des conditions d'exposition.	142
Figure 74 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à l'oxazépam.....	143
Figure 75 : Représentation graphique des GOterm des gènes impactés par l'oxazépam.	144
Figure 76 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la carbamazépine.....	145
Figure 77 : Représentation graphique des GOterm des gènes impactés par la carbamazépine	146
Figure 78 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la cyamémazine.	147
Figure 79 : Représentation graphique des GOterm des gènes impactés par la cyamémazine.....	148
Figure 80 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la sertraline.....	149
Figure 81 : Représentation graphique des GOterm des gènes impactés par la sertraline.	150
Figure 82 : Structure d'un axonème	152
Figure 83 : Schéma du détail d'un sarcomère	154
Figure 84 : Schéma détaillé de l'organisation d'une cellule musculaire	155

Figure 85 : Schéma bilan des effets des 4 médicaments sur la planaire <i>S. polychroa</i> ..	168
Figure 86 : Schéma bilan des effets des 4 médicaments sur le gastéropode <i>R. balthica</i> .	169
Figure 87 : Échelles de sensibilité aux pollutions des espèces, genres et familles de mollusques définies à partir de la classification ascendante hiérarchique.....	171

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux marchés pharmaceutiques dans le monde en 2013 et 2003.....	8
Tableau 2 : Les 5 classes de médicaments les plus vendues en France en 2013.....	9
Tableau 3 : Abattement des concentrations de médicament en entrée et en sortie de STEP.....	15
Tableau 4 : Facteurs de sécurité à appliquer lors du calcul des PNEC.....	21
Tableau 5 : Liste des quotients de risques de quelques molécules médicamenteuses.....	23
Tableau 6 : Systématique de l'espèce non modèle <i>R. balthica</i>	51
Tableau 7 : Systématique de l'espèce non modèle <i>S. polychroa</i>	56
Tableau 8 : Concentration des solutions d'exposition.....	64
Tableau 9 : Concentration des solutions d'exposition.....	65
Tableau 10 : Couples d'amorces utilisées pour la construction des sondes.....	70
Tableau 11 : Bilan des perturbations du développement embryonnaire du <i>Radix</i> par les psychotropes.....	85
Tableau 12 : Résultat du nettoyage des contigs.....	92
Tableau 13 : Fold Change and putative function of the differential expressed contigs from <i>R. balthica</i> under oxazepam exposure.....	95
Tableau 14 : Les voies KEGG les plus enrichies par les contigs différentiellement exprimés.....	101
Tableau 15 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à l'oxazépam.....	108
Tableau 16 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la carbamazépine.....	110
Tableau 17 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la cyamémazine.....	111
Tableau 18 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la sertraline.....	113
Tableau 19 : Bilan des perturbations de la mobilité de la planaire par les psychotropes.....	128
Tableau 20 : Bilan des perturbations de la reproduction de la planaire par les psychotropes.....	134
Tableau 21 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à l'oxazépam.....	143
Tableau 22 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la carbamazépine.....	145
Tableau 23 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la cyamémazine.....	147
Tableau 24 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la sertraline.....	149
Tableau 25 : Synthèse des effets des psychotropes sur le déplacement de la planaire <i>S. polychroa</i>	152
Tableau 26 : Synthèse des effets des psychotropes sur la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i>	157
Tableau 27 : Synthèse des effets des psychotropes sur la digestion de la planaire <i>S. polychroa</i>	160
Tableau 28 : Synthèse des effets des psychotropes sur le système de détoxification de la planaire.....	162
Tableau 29 : Synthèse des effets des psychotropes sur le système nerveux de la planaire <i>S. polychroa</i>	164

Liste des abréviations

5-HT : 5-Hydroxytryptamine (appelé Sérotonine)

A : Adréraline

A.A. : Acides Aminés

Ach : Acétylcholine

AChE : AcétylcholinEstérase

ADAM : Désintégrine et Métalloprotéase (A Disintegrin And Metelloprotesase)

ADC : Arginine DéCarboxylase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

Afssa : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

Afssaps : Agence Française de Sécurité Snitaire des Produits de Santé

AGMAT : Agmatinase

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdien

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

ARN : Acide RiboNucléique

ATC : Antidépresseurs Tricycliques

ATP : Adénosine Tri-phosphate

BAPNA : N-alpha-Benzoyl-DL-arginine 4-pNitronilide hypochloride

BCIP : 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate

BlastKOALA : KEGG Orthology And Links Annotation Blast

BSA : Serum Albumine Bovine

CA : Catécholamine

CAT : Catalase

CBZ : Carbamazépine

CCP : Certificat Complémentaire de Protection

CE50 : Concentration à 50 % des effets

CI50 : Concentration à 50 % de l'Inhibition

CL50 : Concentration à 50 % des effets Léthaux

CTP : Cytidine Tri-phosphate

CYP : Cytochrome P 450

CYZ : Cyamémazine

DA : Dopamine

DAT : Dopamine Transporteur

dATP : Désoxyadénosine Tri-phosphate

DBH : Dopamine- β -Hydroxylase

dCTP : DésoxyCytidine Tri-phosphate

DE : Différentiellement Exprimé

DEPC : Di-Ethyl-PyroCarbonate

dGTP : DésoxyGuanosine Tri-phosphate

DL50 : Dose à 50 % des effets Léthaux

DMSO : DiméthylSulfOxyde

dNTP : Désoxyribonucléotides Tri-Phosphate

DSPP : Dentine Sialophosphoprotéine

dTTP : DésoxyThymidine Tri-phosphate

E1 : Estrone

E2 : 17- β -estradiol

ECM ou MEC : Matrice Extracellulaire

EDTA : Ethylène Di-Amine Tétracétique

EE2 : 17- α -éthynylestradiol

EGF : Facteur de Croissance Epidermique

EMA : Agence Européenne du Médicament

ENA : Archive Européenne des Nucléotides

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

EROD : 7-Ethoxy-Résorufin-O-Dééthylase

ES : Souche Embryonnaire

FBC : Facteur de BioConcentration

FC : Ratio du nombre moyen de contigs de la condition d'exposition / nombre moyen de contigs de la condition témoin

FDA : Food and Drug Administration

GABA : Acide Gamma-AminoButyrique

GO : Gene Ontology

GPx : Glutathionne Péroxydase

GSH : Glutathion

GST : Glutathion-S-Transférase

GTP : Guanosine Tri-phosphate

HIS : Hybridation In Situ

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Pression

IBGN : Indice Biologique Global Normalisé

IMAO : Inhibiteur de la MonoAmine-Oxydase

INDEL : Insertion et Déletion

IRSNa : Inhibiteur de la Recapture de la Sérotonine-Noradrénaline

ISRS : Inhibiteur Sélectif de la Recapture de la Sérotonine

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes

KOBAS : KEGG Orthology Based Annotation Server

LB : Lutheria Broth

LDLO : Dose minimal entraînant la léthalité

LOAEL : Plus faible concentration induisant un effet

LOEC : Concentration la plus faible induisant un effet

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MDA : MalonDiAldéhyde

MDR : Résistance MultiMédicaments (MultiDrugs)

M-MLV : Moloney Murine Leukemia Virus

MN : Micronoyaux

MORC : Membre des protéines conservées de la famille de Microrchidia

MXR : Résistance MultiXénobiotique

NA : Noradrénaline

N-alpha BA : N-alpha-Benzoyl-DL-arginine

NAT : Noradrénaline Transporteur

NBT : Nitro-blue tetrazolium

NICD : Domaine IntraCellulaire Notch

NOEC : Concentration sans effet observable

NT : Neurotransmetteur

OCT : Organic Cation Transporteur

ODC1 : Ornithine DéCarboxylase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Cadre Ouvert de Lecture (Open Reading Frame)

OXZ : Oxazépam

PA : Potentiel d'Action

pb : Paire de Base

PBS : Tampon Salin Phosphate

PBST : Tampon Salin Phosphate Tween

PC : Produit de Contraste

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PEC : Concentration environnementale prédite

PFA : ParaFormAldéhyde

PIC : Psychiatrie Information Communication

PMAT : Transporteur à la Membrane Plasmique

pNA : pNitroAniline

PNEC : Concentration prédite sans effet

PPCP : Pharmaceutiques et Produits de soins Corporels

PTPRT : Récepteur de type Tyrosine Phosphatase T

QR : Quotient de Risque

R et D : Recherche et Développement

RCPG : Récepteur Couplé au Protéine G

REVIGO : Reduce Visualize Gene Ontology

ROS : Espèces Réactives à l'oxygène

RPL 18 : Protéine Ribosomique L 18

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RT : Transcritpion Réverse

RT-qPCR : PCR qunatitative après Transcription Réverse

RyR : Récepteur à la Ryanodine

SDAGE : Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SN : Système Nerveux

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Polymorphisme d'un Seul Nucléotide

SOD : SuperOxyde Dismutase

SRT : Sertraline

SSC : Sodium Citrate Salin

STEP : Station d'Epuration

Taq Polymérase : Thermus aquaticus Polymérase

TFA : Acide TriFluoroacétique

TFP : Trifluopérazine

TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale α

TOC : Trouble Obsessionnel Compulsif

TR : Temps de Rétention

UGT1 : UDP-Glucuronosyltransférase 1

UTP : Uracile Tri-phosphate

UTR : Région non Traduites

VTG : Vitéllogénine

WEGO : Web Gene Ontology Annotation Plot

INTRODUCTION GENERALE

L'émergence des phénomènes de pollution est souvent associée au développement des civilisations humaines et remonte au développement de la Rome Antique (Nriagu 1983; Hong *et al.* 1996). La définition de la pollution a évolué au cours du temps et est décrite aujourd'hui comme une dispersion volontaire ou involontaire de certaines substances (micropolluants, hydrocarbures, etc.) ou éléments (métaux, matière organique, etc.) susceptibles de contaminer les divers compartiments de la biosphère (atmosphère, hydrosphère, lithosphère). De ce fait, il n'existe pas à ce jour d'écosystèmes exempts de traces d'activité humaine, puisque même les zones éloignées de toute civilisation sont contaminées par des polluants transportés par les mouvements des masses atmosphériques ou encore par les courants marins.

Dès le XVI^e siècle, l'Homme a commencé à s'intéresser à la qualité de son environnement, non pas en termes de protection des milieux, mais plutôt pour répondre à des questions relevant de la santé humaine. L'environnement, longtemps considéré comme une simple ressource exploitable, ne faisait pas l'objet d'étude d'impact ou de protection vis à vis des différentes activités humaines. Depuis le XIX^e siècle, les impacts des activités humaines sur l'environnement se sont amplifiés. Comme le montre C. Lévêque dans son ouvrage "Écosystèmes aquatiques" (Lévêque 1996), la diversité des types de contaminants n'a cessé de croître et d'évoluer au fil des décennies (Figure 1).

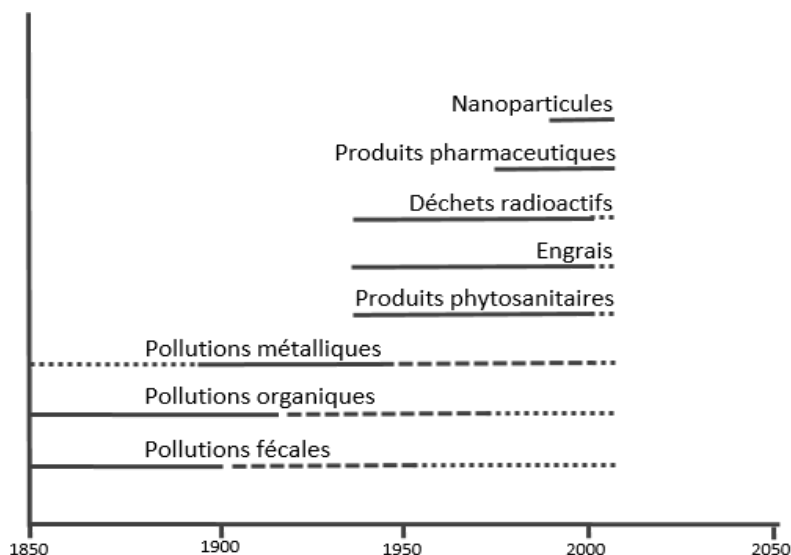


Figure 1 : Représentation schématique des différentes pollutions au cours de l'histoire (adapté de Thèse Charron L. 2013, modifié de Lévêque C. 1996)

Il a fallu attendre la fin du XX^e siècle, pour que la préservation de la qualité de l'environnement devienne un enjeu majeur. Le rejet de substances d'origine naturelle ou de synthèse constitue l'un des plus importants facteurs de dégradation de la biosphère par l'Homme. Les sources de rejet de ces molécules sont nombreuses. On peut citer les rejets liés aux pratiques agricoles (élevage intensif,

utilisation de phytosanitaires), au secteur industriel, aux activités d'extraction de minerais, de combustibles fossiles, aux transports... L'accroissement des densités de population a également amplifié directement ou indirectement les pollutions.

Afin de mieux comprendre et de traiter les émissions de polluants, en décembre 1964 la première loi sur l'eau est transcrite dans le code de l'environnement. La Loi n° 64-1245, définit des instances de bassin en charge de la gestion de la ressource en eau à l'échelle des bassins hydrographiques. Ces instances regroupent les agences de l'eau et les comités de bassin. On compte aujourd'hui 6 agences de l'eau qui sont des établissements publics ayant pour mission de calculer, établir et percevoir les redevances selon le principe pollueur-payeur, soutenir financièrement et techniquement les travaux d'amélioration des milieux aquatiques et de réduction des pollutions, contribuer à la production des données qualitatives sur l'eau, assister les comités de bassin dans l'élaboration des Schémas Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SDAGE) et de mettre en œuvre la gestion intégrée de la ressource. Les 7 comités de bassin sont des instances de concertation qui élaborent les SDAGE, donnent un avis sur les aménagements et orientent les politiques d'intervention des agences de l'eau. La politique de l'eau au niveau local est directement dépendante des directives européennes et notamment de la Directive Cadre sur l'eau qui définit des exigences en termes de qualité chimique et biologique des eaux souterraines et de surfaces.

Malheureusement, de nouveaux polluants font continuellement leur apparition. L'amélioration des outils et des méthodes analytiques a permis de caractériser récemment une nouvelle catégorie de contaminants nommée polluants émergents (INERIS 2015). On peut les définir comme des substances retrouvées dans l'environnement, pour lesquelles on dispose de peu, voire pas de connaissances sur leur toxicité et ayant pour principales caractéristiques d'avoir un impact potentiel à long terme sur la santé (Rivollet et Serre 2013). Parmi les polluants émergents on distingue trois classes de molécules : les substances pharmaceutiques et les produits de soins corporels (PPCPs), les produits chimiques domestiques et industriels et les produits de dégradation des substances pharmaceutiques, domestiques et industrielles (Rivollet and Serre 2013). Toutes ces molécules appartiennent également à la catégorie des micropolluants. Or, en septembre 2016, le premier plan "micropolluants" (2016-2021) a vu le jour en France. Les objectifs de ce dernier sont de réduire les émissions de micropolluants présents dans les eaux et les milieux aquatiques, de consolider les connaissances pour adapter la lutte contre la pollution des eaux et préserver la biodiversité, de dresser des listes de polluants sur lesquels agir en priorité, de réduire l'utilisation des produits phytosanitaires de 50% sur dix ans (et donc de réduire les risques et leurs impacts sur la santé humaine et sur l'environnement) et finalement de faire évoluer les pratiques.

Les médicaments qui trouvent leur place dans le plan "micropolluants" mais également dans le Plan National Santé-Environnement 3 (2015-2019) et qui sont retrouvés dans tous les milieux

aquatiques constituent une classe de micropolluants qui attire toutes les attentions. Dans ce contexte, le travail proposé s'est tourné vers l'étude d'impact de quatre molécules médicamenteuses de type psychotropes, la carbamazépine, l'oxazépam, la cyamémazine et la sertraline sur deux organismes, un escargot d'eau douce le *Radix balthica* et une planaire d'eau douce *Schmidtea polychroa*. L'étude a été menée selon deux axes de travail représentant une étude sur deux niveaux biologiques différents.

Le premier axe de travail a été dédié à l'étude des réponses macroscopiques des deux organismes exposés aux quatre molécules citées ci-dessus. Pour le mollusque (*R. balthica*), le travail a porté sur l'étude de l'impact des médicaments sur son développement embryonnaire. Les résultats ont été exprimés par le pourcentage d'embryons arrivant à l'éclosion, ainsi que le pourcentage d'embryons présentant un retard de développement. Pour la planaire (*S. polychroa*), l'objectif était d'étudier l'impact de ces quatre mêmes molécules sur différentes fonctions physiologiques de l'animal : mobilité, régénération et reproduction.

Le deuxième axe de travail a été une étude des réponses transcriptomiques des organismes après une exposition aux médicaments. Pour le mollusque, les séquences disponibles étaient trop fragmentaires pour la réalisation d'une étude ciblée des réponses transcriptomiques. De ce fait, la première étape de l'étude a été de réaliser le séquençage du transcriptome en conditions différentielles dans le but, d'une part de disposer du transcriptome de l'animal et d'autre part d'identifier les gènes dont l'expression est impactée par l'exposition aux médicaments. Ces résultats ont été complétés par une approche en qPCR afin d'affiner la caractérisation de la réponse transcriptomique de l'organisme. Pour l'étude des réponses transcriptomiques de la planaire, une étude en PCR quantitative ciblée a été réalisée. Les gènes étudiés ont été sélectionnés selon leur fonction en correspondance avec les phénotypes observés.

Ce manuscrit se structure en cinq chapitres. Le chapitre 1 présente l'état de l'art axé sur les problématiques abordées par ce sujet de thèse. La première partie fait le point sur les médicaments et leur devenir dans l'environnement. La deuxième partie est une synthèse des différentes classes thérapeutiques de psychotropes et se focalise ensuite sur les 4 molécules sélectionnées pour l'étude. La troisième partie dresse un bilan des méthodes d'évaluations de la toxicité des molécules en détaillant plus particulièrement celles dévolues aux 4 molécules sélectionnées pour notre étude. La quatrième partie est consacrée à la description des deux modèles biologiques utilisés pour l'étude (*R. balthica* et *S. polychroa*). Après la présentation des différents protocoles utilisés (Chapitre 2), le chapitre 3 présente les résultats de la cinétique de dégradation des molécules et les résultats des études phénotypiques et transcriptomiques menées sur le mollusque *R. balthica* et le chapitre 4 celles menées sur la planaire *S. polychroa*. La dernière partie, présente un bilan composé d'une comparaison des réponses des deux organismes envers les quatre molécules étudiées.

CHAPITRE 1 : ÉTAT DE L'ART

I. Les médicaments et leur devenir dans l'environnement

Les médicaments sont des substances ou des formulations de substances utilisées en santé humaine et animale en vue de restaurer, corriger ou modifier les fonctions physiologiques des organismes cibles. La prescription, l'administration et les processus de fabrication des médicaments participent au relargage involontaire de molécules médicamenteuses dans les divers compartiments environnementaux tels que les compartiments aquatiques, terrestres et atmosphériques. Les médicaments sont retrouvés dans différents compartiments d'un écosystème à de faibles concentrations de l'ordre du ng/L jusqu'à des µg/L (Halling-Sørensen *et al.* 1998; Daughton and Ternes 1999; Heberer *et al.* 2002 a; Heberer 2002 b; Besse *et al.* 2008; Phillips *et al.* 2010; Silva *et al.* 2012). La présence de ces molécules dans l'environnement peut être toxique à court ou à long terme pour les organismes.

a. Genèse et cycle de vie du médicament

La mise sur le marché d'un médicament est une procédure longue et coûteuse pour les industries pharmaceutiques. On estime en moyenne que sur 10 000 molécules criblées, seule une passe tous les tests de validation pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (Figure 2). La mise au point d'un médicament coûte aujourd'hui environ 1 milliard d'euros et passe par plusieurs phases. La première dure environ 10 ans durant laquelle un pool d'environ 10 000 substances actives est étudié. À l'issue des 10 ans, les 100 plus intéressantes sont sélectionnées pour les tests précliniques. Après cette phase de recherche et de développement menée sur les 100 molécules (tolérance, innocuité, efficacité du produit sur de petites populations, mise en place des doses et tests sur 100 à 1000 patients), 10 font l'objet d'un brevet. Cette procédure dure en moyenne 10 ans. À partir de ces 10 médicaments brevetés, un seul fait généralement l'objet d'une autorisation de mise sur le marché (A.M.M) délivrée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), avec définition du prix de la matière première et des conditions de remboursement. A la suite de cette étape prenant 3 à 5 ans, le médicament est commercialisé et fait l'objet d'une pharmacovigilance et d'une étude de risque.

Une fois l'autorisation de mise sur le marché délivrée, le médicament est fabriqué, commercialisé puis consommé. Aujourd'hui, le cycle de vie du médicament est plus court qu'en 1980, mais largement plus coûteux. Lorsque l'on s'intéresse aux bénéfices engendrés par cette commercialisation, on constate qu'un médicament est rentable moins longtemps qu'il y a 20 ans (Figure 3). Dès la fin du certificat complémentaire de protection (CCP), les médicaments génériques entrent en concurrence avec le médicament initial. Le coût du générique étant plus faible que celui

du médicament, il devient plus attractif pour le consommateur qui débourse moins pour le même principe actif.

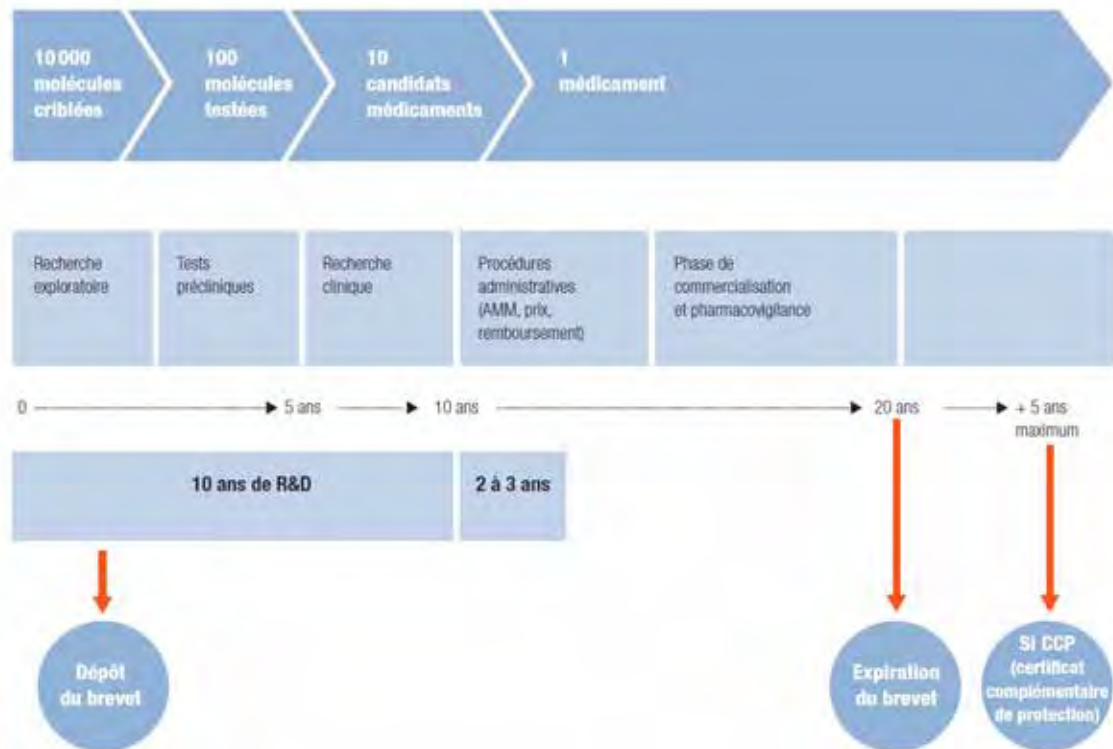


Figure 2 : Le développement d'une nouvelle substance pharmaceutique (Leem 2014, Les Entreprises du Médicament)

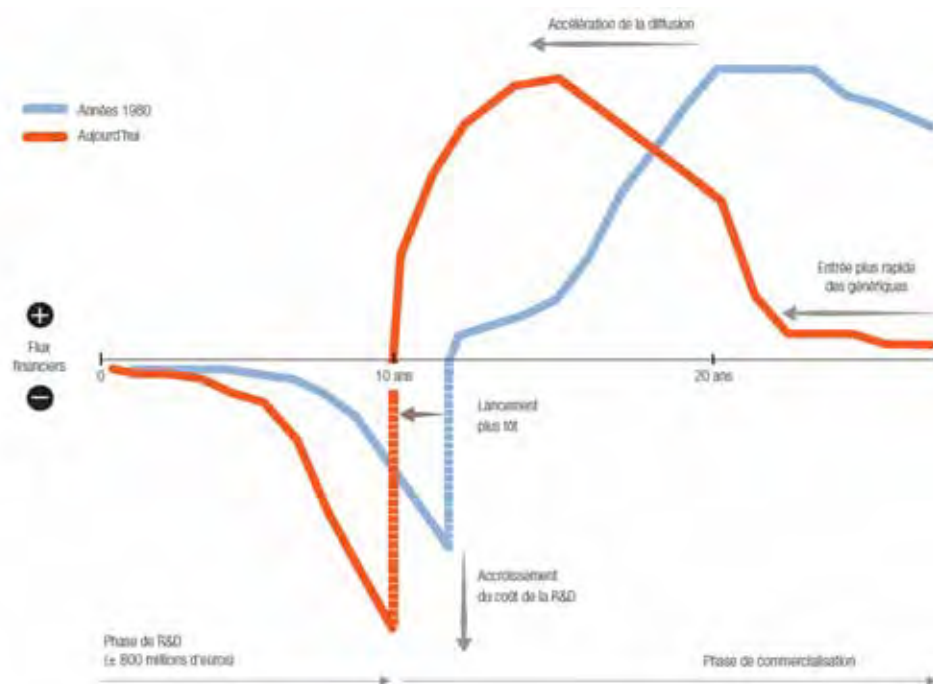


Figure 3 : Le cycle de vie du médicament, de 1980 à nos jours (Leem 2014, Les Entreprises du Médicament)

Aujourd'hui, les médicaments sont consommés sur une période approximative de 10 ans alors qu'ils l'étaient sur plus de 20 ans dans les années 80. Les médicaments rapportent donc moins aux entreprises pharmaceutiques (Leem 2014).

b. Le marché des médicaments et mode de consommation

En 2013, le marché mondial du médicament a dégagé un chiffre d'affaires de 639 milliards d'euros, soit 4,5% d'augmentation par rapport à 2012. Les États unis se positionnent comme les leaders du marché en concentrant 38% du chiffre d'affaires. Au niveau mondial, l'Europe se positionne avec 24,9% des parts de marchés, comme la troisième zone géographique la plus productrice de médicaments, derrière l'Amérique du Nord et l'Afrique/Asie/Australie/Pacifique (Figure 4).

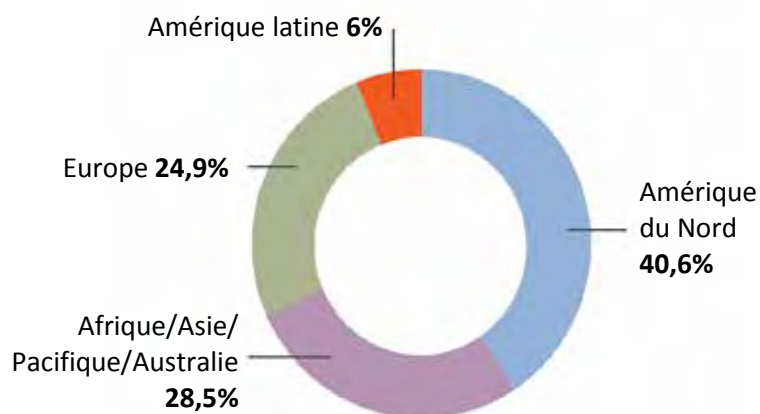


Figure 4 : principaux marchés des médicaments par zone géographique (Leem 2014, Les Entreprises du Médicament en France).

La France est le cinquième pays le plus producteur de molécules pharmaceutiques avec 4,4% du marché derrière l'Allemagne, la Chine, le Japon et les États-Unis (Leem 2014) (Tableau 1).

Tableau 1: Les principaux marchés pharmaceutiques dans le monde en 2013 et 2003

	En % du marché mondial en 2013	En % du marché mondial en 2003
ÉTATS-UNIS	38,2%	49,0%
JAPON	9,4%	11,0%
CHINE	7,2%	ND
ALLEMAGNE	5,1%	6,0%
FRANCE	4,4%	5,0%
ITALIE	3,3%	4,0%
ROYAUME-UNI	2,6%	3,0%
BRESIL	2,5%	ND
ESPAGNE	2,4%	2,0%
CANADA	2,4%	2,0%

(Leem 2014, Les Entreprises du Médicament en France)

En 2013, on pouvait recenser environ 2 800 substances pharmaceutiques sur le marché français, représentant un volume de vente dépassant les 26,8 milliards d'euros, comprenant les ventes aux officines (20,6 Mds €) et les ventes aux hôpitaux (6,2 Mds €) (ANSM, 2014, Analyse des ventes de médicaments en France en 2013). Parmi les sept plus grands consommateurs de médicaments en Europe (France, Allemagne, Belgique, Espagne, Italie, Royaume-Uni, Pays-Bas), la France se positionne comme le second pays le plus consommateur de médicaments. En moyenne, un français consomme 48 boîtes de médicaments par an. La consommation de médicament en Europe est en constante évolution.

Le tableau 2 présente les cinq classes de médicaments les plus consommés par les français à domicile (en ville) et en hôpitaux au cours de l'année 2013. On constate que dans les hôpitaux (non psychiatriques) la consommation de médicaments est majoritairement constituée d'antinéoplasiques utilisés en chimiothérapie et d'immunosuppresseurs utilisés la plupart du temps pour limiter le rejet d'une greffe d'organe. A l'opposé, en ville, la prise de médicaments par la population est composée majoritairement d'analgésiques et de psycholeptiques.

Tableau 2: Les 5 classes de médicaments les plus vendues en France en 2013**En ville**

Classe	Unités vendues en 2013 (millions de boîtes)	Part de marché	
		2013	2003
Analgésiques	740	21.90%	15.90%
Psycholeptiques	162	5.20%	5.10%
Antibiotiques	134	4.30%	4.60%
Médicaments des troubles de l'acidité	104	3.30%	3.90%
Médicaments ophtalmologiques	84	2.70%	2.70%

En hôpitaux

Classe	Unités vendues en 2013 (millions de boîtes)	Part de marché	
		2013	2003
Antinéoplasiques	1660	27.20%	17.80%
Immunosuppresseur	682	11.20%	4.10%
Antihémorragiques	598	9.80%	9.30%
Antiviraux	327	5.40%	10.80%
Immunoserums et Immunoglobulines	313	5.10%	2.80%

ANSM 2014, Analyse des ventes de médicaments en France en 2013

Si l'on s'intéresse à l'évolution de la consommation de psychotropes (Figure 5), on constate une augmentation des consommations d'antidépresseurs et dans le même temps une stabilisation voire une tendance à une baisse de la consommation d'anxiolytiques. La France se positionne en 2013 comme le 4^{ème} consommateur d'antidépresseurs et le 3^{ème} consommateur d'anxiolytiques en Europe.

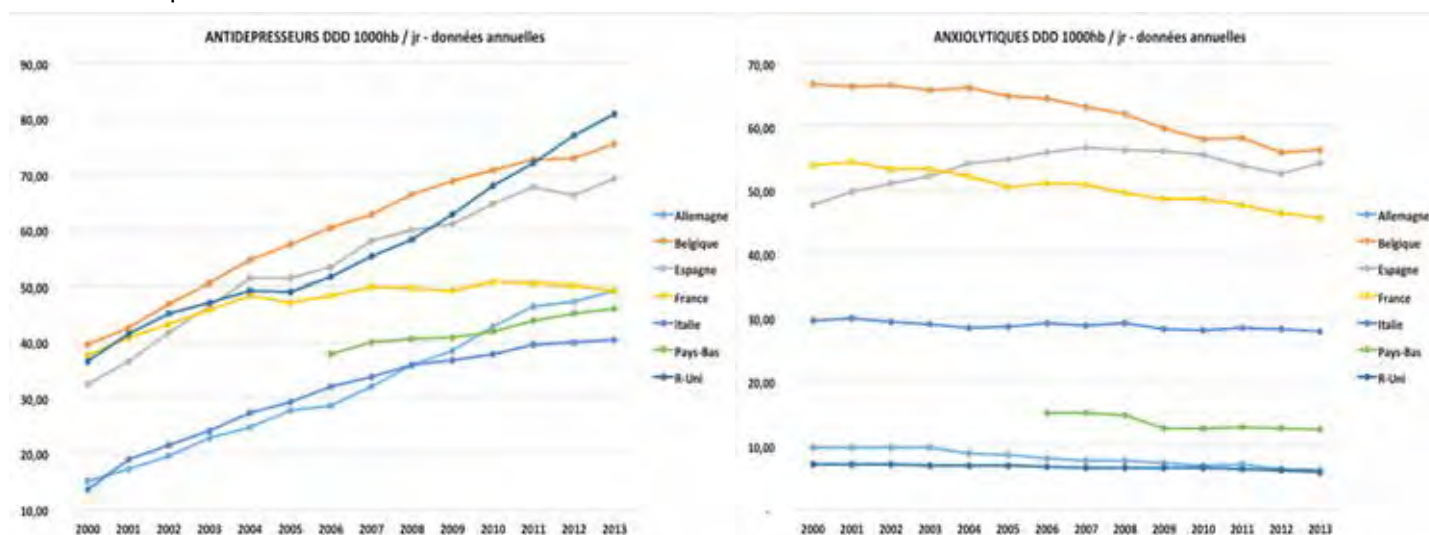


Figure 5 : Évolution de la consommation d'antidépresseurs et d'anxiolytiques (2000 - 2013) (ANSM, 2014, Analyse des ventes de médicaments en France en 2013)

c. L'entrée des produits pharmaceutiques dans l'environnement

Les voies d'entrées des médicaments dans l'environnement sont multiples. Le compartiment le plus exposé aux rejets de médicaments est le milieu aquatique. Une infime fraction des médicaments

prescrits peut être aussi retrouvée dans l'atmosphère et les sols peuvent également faire l'objet d'une contamination par les médicaments. Nous allons donc développer dans les parties suivantes les différentes sources d'émissions de particules médicamenteuses dans ces trois compartiments.

i. Les sources de pollutions atmosphériques

La pollution médicamenteuse de l'air peut se faire de manière directe ou indirecte. La contamination directe ne concerne qu'un nombre limité de molécules, appartenant à la classe des anesthésiques volatils de type fluothane (utilisés en milieu hospitalier), mais aussi des médicaments comme l'eucalyptol qui sont éliminés via les voies respiratoires. Le rejet d'hydrofluoroalcanes (gaz utilisé pour la propulsion du médicament) dans l'atmosphère entraîne la formation (après oxydation) de l'acide trifluoroacétique (voie minoritaire de formation de l'acide trifluoroacétique) (Académie Nationale de Pharmacie 2008). Ce dernier est un produit toxique, très persistant qui est susceptible de participer à l'effet de serre (Jordan and Frank 1999). Durant le processus d'évaporation des eaux de surfaces, certains polluants comme les médicaments peuvent être entraînés dans le compartiment atmosphérique, notamment les molécules liposolubles stockées dans les biofilms de surface. Ces mêmes biofilms chargés de molécules médicamenteuses peuvent se retrouver amassés dans les embruns puis projetés sur les terres à plusieurs dizaines de kilomètres par les vents (Académie Nationale de Pharmacie 2008). De plus, les particules fixées dans les sols peuvent, par déshydratation, cristalliser et se retrouver emportées par les vents, dans les poussières. La contamination indirecte pourrait provenir des médicaments non utilisés, des déchets médicamenteux hospitaliers ainsi que des boues de stations d'épuration qui sont tous incinérés dans des installations répondant à des normes environnementales strictes et comportant un traitement des fumées. Le rejet médicamenteux par les fumées devrait donc être insignifiant. Cependant il existe peu d'études estimatives des rejets atmosphériques. Bison *et al.* (1996, 2007) ont étudié l'efficacité d'élimination de 23 médicaments anticancéreux par un incinérateur communément utilisé pour l'incinération d'ordures ménagères et de déchets hospitaliers. Il ressort de l'expérience que 13 des 23 médicaments ne sont pas complètement détruits, mais que le pourcentage résiduel ne dépasse jamais 1,19% de la quantité du médicament incinéré. De plus, ils ont montré que l'ajout de médicaments anticancéreux dans une usine d'incinération d'ordures ménagères ne modifie pas de façon significative la composition chimique des émissions gazeuses et particulaires (Bisson *et al.* 2007). Il en résulte donc que l'incinération de cette classe de médicaments semble être plutôt très efficace. Cependant, on observe un faible relargage de médicaments dans les fumées des usines d'incinération, contribuant ainsi à la pollution atmosphérique.

ii. Les sources de pollutions des sols

Les effluents domestiques, hospitaliers et industriels (usines pharmaceutiques) sont chargés en molécules médicamenteuses à l'entrée des STEP (Station d'épuration) ». De ce fait, les boues résultantes du processus de purification des effluents par les STEP contiennent des médicaments. Une portion non négligeable des boues de STEP sont utilisées en agriculture. En 2010, 43 % des boues de STEP ont été valorisées en agriculture (Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer). De ce fait, les boues sont une source de contamination médicamenteuse des sols. Par ruissellement et infiltration, elles peuvent également contaminer les eaux souterraines et de surfaces.

Une autre voie d'entrée des médicaments dans les sols provient de l'utilisation de médicaments à usage vétérinaire (animaux domestiques et élevages agricoles) (Boxall *et al.* 2003). Les principales classes de médicaments vétérinaires utilisées sont les antibiotiques et les antiparasitaires. Après absorption, métabolisation et excrétion dans les urines ou les fèces, les principes actifs médicamenteux ou leurs résidus sont retrouvés sur les sols (*via* l'épandage de lisiers contaminés par exemple). Le compartiment terrestre reçoit donc une charge conséquente de molécules médicamenteuses qui sera stockée dans les sols ou lessivée par les pluies pour aboutir dans le compartiment aquatique.

iii. Les sources de pollutions aquatiques

Les centres hospitaliers prescrivent et administrent une large diversité de micropolluants en partie retrouvée dans les effluents. Cette charge de molécules est très variable et dépend des saisons, du centre hospitalier, du jour de la semaine ou encore de l'heure à laquelle l'analyse est réalisée (Baker and Kasprzyk-Hordern 2013; Golovko *et al.* 2014). Les eaux usées de la plupart des établissements hospitaliers ne sont pas traitées par des unités présentes sur sites, mais sont acheminées directement vers les STEP urbaines. Elles s'additionnent donc aux eaux usées des particuliers qui représentent l'apport majoritaire de médicaments (Corvaisier 2000). Il est en effet admis aujourd'hui que la majorité des médicaments acheminés aux STEP provient de la consommation de molécules à domicile (Tamtam *et al.* 2008; Matamoros *et al.* 2009; Santos *et al.* 2009). Les traitements physico-chimiques et biologiques actuels des stations d'épuration dégradent inégalement les résidus médicamenteux (Togola and Budzinski 2007; Golovko *et al.* 2014). Les effluents de STEP se retrouvent donc chargés de molécules médicamenteuses qui sont ensuite diluées dans les eaux de surface.

Le relargage de résidus par les usines de fabrication et de conditionnement constitue une deuxième source de contamination des eaux de surfaces. Les rejets des usines pharmaceutiques sont à la fois complexes et variables de par la pluralité des molécules produites, mais aussi des techniques

épuratoires employées. Les rejets sont donc qualitativement et quantitativement différents au cours du temps (Mompelat *et al.* 2009; Cardoso 2015). À cela s'ajoutent les rejets d'entreprises ayant une activité de Recherche et Développement (R et D) de nouveaux médicaments, pouvant rejeter des molécules non référencées et dont la toxicité n'est pas connue. De plus, les médicaments étant des formulations de composés actifs, les sites industriels fabriquent aussi tous les composés d'enrobage qui se retrouvent également dans les effluents industriels. Enfin, les traitements des rejets industriels effectués sur le site de production peuvent parfois dégrader les molécules initiales en métabolites biologiquement actifs voire plus actifs que la molécule initiale (Cardoso *et al.* 2014; Cardoso 2015). Une étude portant sur les rejets industriels dans le Rhône montre qu'une grande quantité d'effluents industriels médicamenteux issus des usines pharmaceutiques répartis tout au long du fleuve s'y déverse. De nombreuses usines pharmaceutiques sont localisées dans le Canton du Valais (Suisse), mais on trouve aussi une douzaine de sites industriels au niveau de l'agglomération lyonnaise et de sa périphérie et encore plus en aval, au niveau de l'agglomération d'Aramon, deux autres sites industriels qui produisent des matières premières pharmaceutiques et rejettent directement leurs effluents dans le fleuve. Toutes ces usines de production contribuent à la forte contamination pharmaceutique de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ par molécules. D'autre part, l'étude de Larsson *et al.*, (2007) montre des concentrations en antibiotiques supérieures à 30 mg/L dans les effluents de stations d'épuration de la zone industrielle de Patancheru en Inde où l'on trouve les rivières les plus polluées du monde par les médicaments issus des usines pharmaceutiques locales (selon Mason Margie ; 26 Janvier 2009, *Huffington Post*). La pollution des cours d'eau par les activités industrielles a aussi été étudiée par les travaux de Sanchez (2007). Cette étude a évaluée la qualité de plusieurs cours d'eau du Nord de la France à travers la mesure de l'activité de plusieurs biomarqueurs de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). Les cours d'eau ont été classés en fonction de la pression humaine subie. Les cours d'eau étudiés ont été classés en quatre catégories. Premièrement, le cours d'eau de référence était peu contaminé et situé en amont de l'urbanisation. Deuxièmement, cette étude a analysé un cours d'eau recevant des effluents urbains. Troisièmement, cette étude a aussi été réalisée sur un cours d'eau recevant une forte pression de l'agriculture et quatrièmement, le cours d'eau analysé recevait à la fois des effluents industriels, urbains et agricoles. Les résultats de cette étude montrent que le cours d'eau recevant une pression à la fois industrielle, urbaine et agricole est très perturbé par ces sources de contaminations (Sanchez 2007). En effet, la mesure des biomarqueurs chez les épinoches à trois épines exposées à ce cours d'eau montre une induction de l'activité de la GST (Glutathion-s-transférase), de l'EROD (7-Ethoxy-résorufin-O-dééthylase) et une induction de la Vitéllogénine (VTG), mais aussi une inhibition de l'activité de l'ACHé (Acétylcholinestérase) et une inhibition du GSH (Sanchez 2007). Dans un même objectif, des travaux ont été menés sur l'impact d'un rejet de STEP urbaine (Site A) et de celui d'un rejet d'une usine

pharmaceutique (produisant majoritairement des stéroïdes) additionné à un rejet de STEP urbaine (Site B) sur différents biomarqueurs (AChE, GST, EROD, ...), sur la VTG et sur l'inter-sexualisation du goujon (*Gobio gobio*) dans la rivière la Dore (Sanchez *et al.* 2011). Les résultats de cette étude ne montrent pas d'effets entre les biomarqueurs mesurés chez les goujons situés sur le site A et de ceux mesurés chez les goujons situés sur le site B. Cependant, les résultats de la mesure des biomarqueurs des deux sites ont été comparés aux valeurs obtenues à partir de goujons situés sur une partie du cours d'eau (de la Dore) ne recevant aucune pression humaine. De cette comparaison ressort une induction significative des enzymes de biotransformation (EROD et GST) et une inhibition de l'AChE par le rejet de STEP urbaine seul et additionné du rejet d'une usine pharmaceutique. Les résultats montrent aussi une induction de la VTG chez les poissons situés en aval du site B, suggérant un effet œstrogénique d'un effluent de STEP urbaine additionné à un effluent d'usine pharmaceutique sur les goujons. L'étude de la présence de poissons intersexués sur les sites révèle une forte augmentation des poissons intersexués sur le site B (80 %) comparé au site A (5 %) ainsi qu'une diminution du ratio de mâles et de femelles, de respectivement 18 % et 40 %. Cela montre donc une masculinisation de la population de goujons exposée aux rejets de l'usine pharmaceutique.

Une dernière partie de la pollution médicamenteuse des milieux aquatiques provient des traitements médicamenteux massifs en aquaculture. Les médicaments utilisés en aquaculture sont les antibiotiques comme l'oxytétracycline, le florfenicol, le premix, la sarafloxacin et l'érythromycine couplée à la triméthoprime ou à l'orméthoprime (Serrano 2005; Kümmeler 2009a; Kümmeler 2009b). L'utilisation d'antibiotiques en aquaculture norvégienne a nettement augmenté de 2002 à 2005 (Grave *et al.* 2008). Cependant, peu de données sont disponibles pour beaucoup de pays et les Etats-Unis considèrent que cette utilisation d'antibiotiques est une fraction non significative des antibiotiques à usages non humains (Kümmeler 2009a; Kümmeler 2009b).

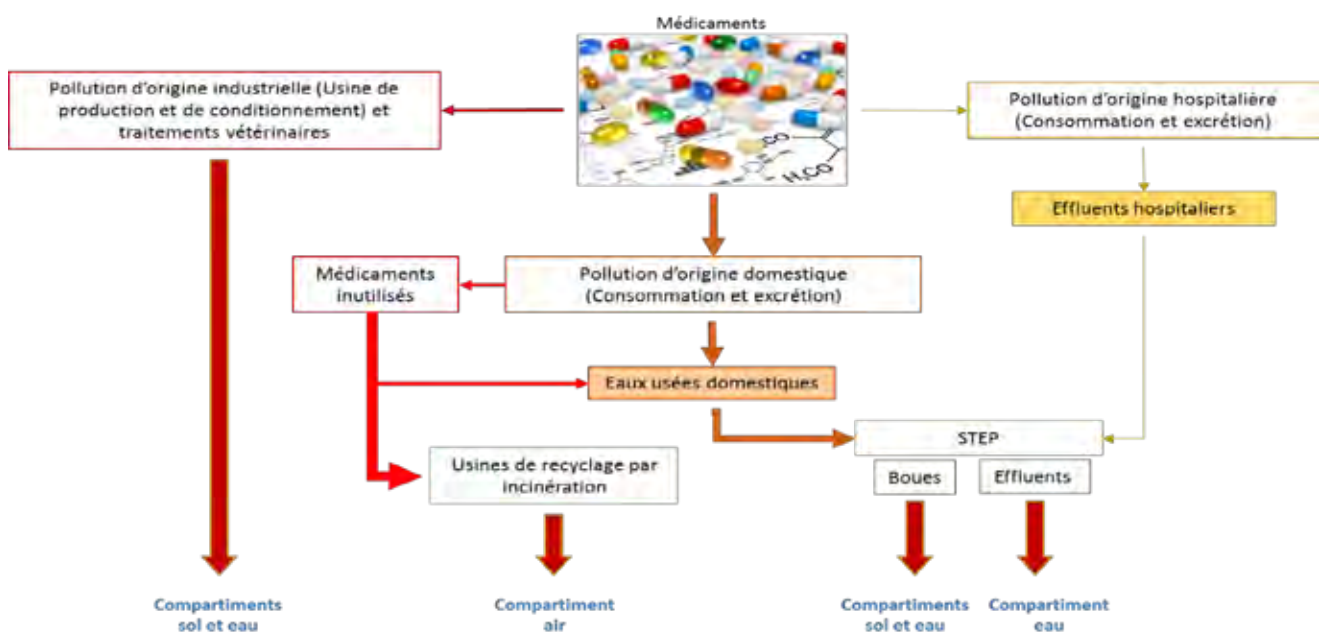


Figure 6 : Les différentes sources d'entrée des médicaments dans les compartiments aquatiques (adapté de la thèse Besse 2010)

Parmi ces trois voies d'entrées de molécules médicamenteuses dans l'environnement, c'est donc dans le compartiment aquatique que l'apport de médicaments est le plus important. Cette charge de polluant majoritairement rejetée dans l'environnement par les STEP est aujourd'hui préoccupante et fait l'objet de nombreuses études tant sociologiques (analyse des pratiques) que techniques (amélioration des processus d'épuration) pour limiter l'introduction de médicaments dans les milieux aquatiques.

d. Efficacité des Stations d'épurations envers les médicaments

À ce jour, on trouve différents types de STEP composées de plusieurs unités spécialisées visant à traiter un polluant ou un groupe de polluants. Il faut dissocier les traitements physico-chimiques et les traitements biologiques. Classiquement un prétraitement physico-chimique consistant en un dégrillage, dessablage et déshuilage est mis en place afin de préparer l'effluent à un traitement biologique pour digérer la matière organique à l'aide des bactéries (Hu *et al.* 2012). Au cours de ce processus, les microorganismes vont former des amas en suspension dans l'eau appelés "flocs" qui en s'agglomérant donneront des boues activées en partie réinjectées dans le bassin de digestion, l'autre partie étant éliminée par le clarificateur qui sépare les boues de l'eau. Ce traitement se fait en aérobie. Un traitement biologique secondaire en anaérobie peut être utilisé afin de réduire les produits azotés. Un traitement tertiaire au chlore ou à l'ozone peut être ajouté afin d'oxyder toutes les membranes biologiques et donc dégrader tout ce qui est vivant, mais aussi oxyder les molécules disponibles afin d'en diminuer la charge (Shon *et al.* 2006; Snyder 2008; Flyborg *et al.* 2010). Des étapes de microfiltration ou encore nano et ultrafiltration peuvent être rencontrées sur certains sites de traitement des eaux usées (Flyborg *et al.* 2010), mais ces pratiques sont généralement appliquées à la potabilisation de l'eau. On trouve aussi des procédés d'épuration plus simples qui utilisent les capacités épuratoires des milieux naturels tels que le lagunage. Celui-ci consiste à traiter l'effluent dans plusieurs bassins successifs qui vont filtrer et adsorber les polluants majoritaires au moyen de charbon actif ou autres matériaux de fixation. Enfin, une dernière méthode consiste à faire circuler les eaux usées par gravité au fil de bassins successifs aménagés en pallier dans lesquels se trouvent des végétaux fixateurs de types subaquatiques tels que les roseaux (*Phragmites communis* ou *Phragmites australis*), les massettes (genre *Typha*) ou les joncs (du genre *Juncus*) en privilégiant les espèces locales adaptées au climat. On constate donc que ces différents types d'installations ne sont pas spécialisés dans l'élimination des polluants émergents et notamment des médicaments. En effet, l'abattement en sortie de station d'épuration pour une substance médicamenteuse est très variable d'une molécule à l'autre et est fonction de la méthode de traitement de la STEP. Le pourcentage d'abattement varie entre 0 et 98% (Beausse 2004; Quintana *et al.* 2005; Fent 2008; Miège *et al.* 2008; Tamtam *et al.* 2008; Matamoros *et al.* 2009;

Santos *et al.* 2009; Wahlberg *et al.* 2011; Zenker *et al.* 2014; Golovko *et al.* 2014; Subedi *et al.* 2017). Notre étude s'intéresse tout particulièrement aux psychotropes, le tableau 3 rassemble les résultats de plusieurs études ayant mesurées l'efficacité d'élimination des psychotropes par les stations d'épuration.

Tableau 3: Abattement des concentrations de médicament en entrée et en sortie de STEP

Molécules (CAS)	Entrée de STEP (µg/L)	Sortie de STEP (µg/L)	Références
Antiépileptiques			
	0.274 à 9.420	0.036 à 0.013	(Metcalfe <i>et al.</i> 2003; Togola and Budzinski 2007; Roig 2010; Geret 2014; Golovko <i>et al.</i> 2014)
Anxiolytiques			
	0.077 à 5.000	0.004 à 7.044	(van der Hoeven 2004; Kosonen and Kronberg 2009; Roig 2010; Geret 2014; Golovko <i>et al.</i> 2014)
Antidépresseurs			
	0.008 à 0.800	0.005 à 10.300	(Chen <i>et al.</i> 2006; Schultz and Furlong 2008; Vasskog <i>et al.</i> 2008; Lajeunesse <i>et al.</i> 2008; Styrihave <i>et al.</i> 2011; Geret 2014; Weston <i>et al.</i> 2014; Golovko <i>et al.</i> 2014)
Neuroleptiques			
	2.902 à 8.950	0.323 à 14.430	(Geret 2014; Matongo <i>et al.</i> 2015)

Les données bibliographiques montrent que l'efficacité des STEPs dépend de chaque molécule pharmaceutique. Pour la classe des analgésiques, les concentrations varient en entrée de STEP de 7 ng/L à 611 µg/L et en sortie de STEP de 2 ng/L à 5,7 µg/L. Pour certaines molécules très résistantes, l'abattement des concentrations en STEP peut être proche de 0 voir être négatif avec un relargage des molécules adsorbées par les matières en suspension (voir tableau détaillé en Annexe 1). L'abattement de l'oxazépam en STEP a été étudié par exemple par Golovko *et al.* (2014) en République Tchèque qui constate une diminution de 17%. Il y a donc plus de molécules disponibles en sortie qu'en entrée de STEP. En ce sens, le travail de Zorita *et al.*, (2010) décrit la dégradation de 13 molécules en STEP après plusieurs traitements physico-chimiques et biologiques (Zorita *et al.* 2009). Il ressort de cette étude que les effluents rejetés sont encore composés de nombreuses molécules médicamenteuses sous leur forme initiale. Le diclofénac par exemple n'est pas métabolisé, tout comme l'ibuprofène ou le naproxène qui sont largement retrouvés dans les effluents. Ce type de résultat est confirmé par de nombreuses études comme Bartelt-Hunt *et al.*, (2009), Miège *et al.* 2008, Wahlberg *et al.* 2011, Kümmerer 2009 ou encore par une étude française menée par Togola et Budzinsky 2007.

Au-delà du rejet des polluants émergents dans l'environnement, leur présence dans le compartiment aquatique est aussi dépendante de la composition des molécules qui les rend plus ou moins résistantes aux contraintes physico-chimiques des STEP et de l'environnement. La figure 7 présente les différents processus d'élimination d'une molécule dans l'environnement et dans les STEPs.

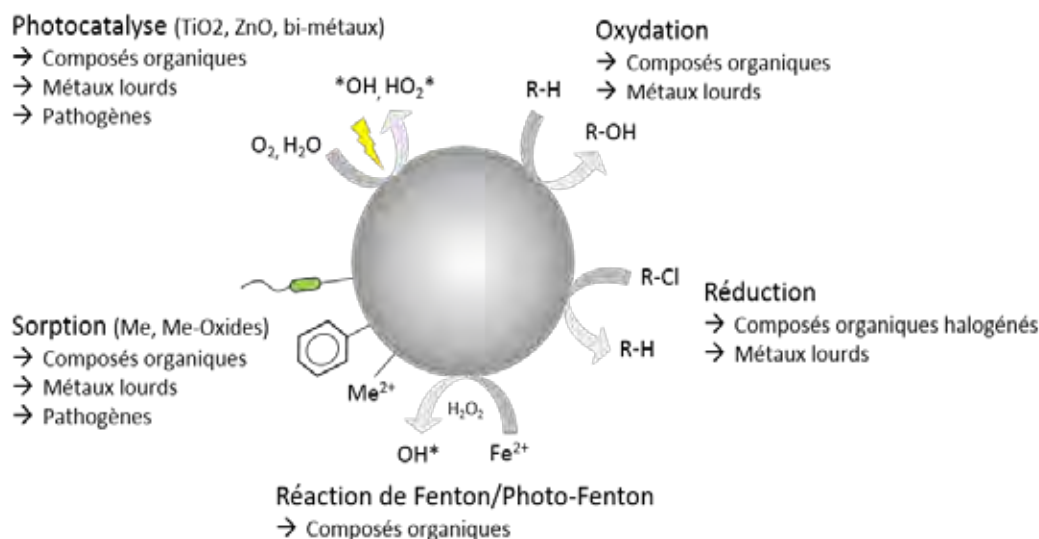


Figure 7 : Processus d'élimination des polluants organiques et inorganiques de l'eau (Prasse and Ternes, 2010)

En effet, les processus de photocatalyse, d'oxydation ou encore de réduction peuvent éliminer une molécule de sa matrice, mais ils peuvent aussi générer des métabolites qui se révèlent autant voire plus toxiques que la molécule mère comme le 10,11-époxy-carbamazépine issu de la métabolisation de la carbamazépine par une enzyme du cytochrome P450 (Attia 2010). Cependant, les processus de sorption peuvent aussi aboutir à une stabilisation des contaminants sur le substrat ou la matière en suspension.

e. Occurrence des médicaments dans les compartiments aquatiques

Le compartiment aquatique étant le plus contaminé par les rejets de médicaments, il est important de quantifier la présence de ces molécules. Grâce à l'amélioration des méthodes d'analyses physico-chimiques, de nombreuses molécules pharmaceutiques ont été détectées dans les différents compartiments aquatiques. Il est ainsi possible de connaître la fraction biodisponible de ces polluants pour les organismes et d'anticiper le cycle biogéochimique de ces composés. L'analyse chimique a cependant des limites, tout d'abord les molécules retrouvées dans une fraction sont les molécules que l'on recherche, notamment avec l'utilisation de matrices (silice greffée ou polymère). Ensuite, il n'existe pas de méthode analytique pour chaque type de molécule et enfin, les seuils de quantification de chaque molécule peuvent être élevés, parfois même au-dessus de certaines concentrations environnementales ce qui limite la quantification et la détection des molécules. La

quantification et la détection des molécules sont aussi fonction du matériel utilisé ainsi que de la nature de la matrice de solubilisation.

Notre étude se focalise sur les psychotropes et leurs effets en milieu aquatique. Ce type de molécules a fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, la concentration en antiépileptiques dans les eaux de surfaces est comprise entre 0,009 et 5,4 µg/L (Metcalf *et al.* 2003; Togola and Budzinski 2007; Roig 2010; Geret 2014; Golovko *et al.* 2014). Pour les anxiolytiques, la concentration dans les eaux de surface varie entre 0,0007 et 0,814 µg/L (van der Hoeven 2004; Kosonen and Kronberg 2009; Roig 2010; Geret 2014; Golovko *et al.* 2014). De façon semblable aux anxiolytiques, la concentration des antidépresseurs en eau de surface varie entre 0,001 et 1,31 µg/L (Chen *et al.* 2006; Schultz and Furlong 2008; Vasskog *et al.* 2008; Lajeunesse *et al.* 2008; Styris have *et al.* 2011; Geret 2014; Weston *et al.* 2014; Golovko *et al.* 2014). Les neuroleptiques sont les médicaments à cible neurologique dont l'amplitude de concentrations dans les eaux de surfaces est la plus grande. En fonction des lieux de prélèvement et de la molécule, les concentrations oscillent entre 0,001 et 78,33 µg/L (Roig 2010; Geret 2014; Matongo *et al.* 2015).

Le relargage de médicaments va directement impacter le compartiment aquatique récepteur de l'effluent et donc potentiellement perturber son écosystème. Les concentrations de médicaments dans les effluents de STEP, mais aussi dans les eaux de surface sont très différentes d'un pays à l'autre. Cela peut s'expliquer par le caractère national d'une autorisation de mise sur le marché d'un médicament. Ainsi chaque pays possède une liste différente de médicaments commercialisés. De ce fait, la nature des effluents ne peut être que différente d'un pays à l'autre. À cela s'ajoute un phénomène plus culturel qui lui aussi modifie le profil chimique des effluents. Deux facteurs entrent en jeu, l'habitude de prescription par les médecins qui diffère au sein de chaque pays (deux molécules différentes pouvant avoir la même cible seront plus ou moins utilisées) et le coût de chaque médicament (coût de la matière première, coût de la fabrication et coût du transport). La présence de cette charge de polluants dans les écosystèmes représente un risque environnemental, mais aussi un risque de santé publique. Ainsi, certaines molécules font d'ores et déjà l'objet de surveillance via la liste de vigilance relative aux substances à surveillance à l'échelle de l'Union Européenne dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil (diclofénac, 17-alpha-éthinyloestradiol (EE2), 17-bêta-estradiol (E2), estrone (E1)). Afin d'améliorer cette liste de molécules à surveiller, plusieurs études visant à les hiérarchiser vis-à-vis de leur toxicité ont été réalisées.

f. Hiérarchisation et évaluation des risques de la présence de résidus de médicaments rejetés dans le compartiment aquatique

La liste de molécules pharmaceutiques retrouvées dans l'environnement est longue et il serait coûteux et fastidieux d'étudier l'impact de chaque molécule sur l'environnement. De ce fait, les autorités, notamment les agences nationales et européennes ont mis en place un système d'évaluation des risques environnementaux des molécules médicamenteuses destinées à la consommation humaine. Une étude préliminaire de hiérarchisation des résidus de médicaments dans l'eau a été réalisée par l'Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) à partir de 2006 en collaboration avec le Leem (Syndicat des industries du médicament humain), à la suite des travaux de Boulanger (2005) qui ont permis de définir les premiers paramètres utilisés pour l'étude (nature chimique de la molécule, occurrence et consommation). Il en a résulté une liste préliminaire de 12 molécules prioritaires avec 8 molécules mères et 4 métabolites (Acide acétylsalicylique, Carbamazépine, Chlorambucil, Hydrochlorothiazide, Iobitridol, Ibuprofène, Oxazépam, Paracétamol et Acide salicylique, 10,11 époxyde carbamazépine, Moutarde phénylacétique et 4 aminophénol). Par la suite, l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) a dressé un rapport sur la poursuite de l'étude portant sur 208 médicaments en calculant la criticité de ces molécules. La criticité d'une molécule est un ratio prenant en compte la quantité consommée, la posologie minimale et la solubilité de la molécule étudiée. À l'issue de cette étude, l'Afssa propose en 2008 une liste de 42 médicaments à usage humain à rechercher en priorité dans les eaux, dont 5 hormones, 7 anticancéreux, 5 antibiotiques, 3 anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), 5 neuroleptiques, 8 cardiovasculaires, 2 produits de contrastes (PC) et 7 molécules diverses telles que la caféine, l'oméprazole ou encore le paracétamol (Afssa 2008). Au niveau européen, les médicaments n'apparaissent que dans la liste de vigilance relative aux substances à surveillance avec le diclofénac, le 17-bêta-estradiol (E2) et le 17-alpha-éthinyloestradiol (EE2) pour compléter la liste de substances prioritaires qui comportait 33 substances prioritaires. Ces trois médicaments sont souvent classés parmi les médicaments, toutes méthodes confondues, comme les molécules les plus à risque pour l'environnement.

L'évaluation des risques de la présence de résidus médicamenteux dans l'eau permet de définir un paramètre utilisé pour la hiérarchisation de ces molécules et ainsi prioriser les actions. Au cours de ces 10 dernières années, plusieurs études portant sur l'évaluation des risques de la présence de médicaments dans les milieux aquatiques ont été publiées. Toutes les études de risques européennes utilisent un quotient PEC (Concentration environnementale prédite)/PNEC (Concentration prédite sans effet) dérivant du rapport de l'EMEA 2006 et incluant différents paramètres en fonction de l'étude considérée (Huschek *et al.* 2004; Carlsson *et al.* 2006; Besse *et al.* 2008; Daouk *et al.* 2015; Riva *et al.* 2015).

Il existe à ce jour deux méthodes dédiées à l'évaluation de risque pour les médicaments à usage humain. La première méthode a été mise en place par la FDA (Food and Drug Administration) en 1998, la seconde méthode, plus utilisée en Europe a été établie par l'Agence Européenne d'Evaluation du Médicament (EMA 2006). L'évaluation du risque selon l'EMA est organisée en deux phases majeures (Figure 8), la première est destinée à estimer l'exposition environnementale aux différents médicaments et la deuxième est destinée à analyser les effets et le devenir des médicaments dans l'environnement (EMA 2006).

Au cours de la phase I, l'estimation de l'exposition selon un scénario de pire cas est réalisée à l'aide d'un calcul (Equation 1) de la concentration environnementale prédite (PEC) dans les eaux de surface, en utilisant les données relatives à la consommation maximale journalière du médicament par habitant.

Equation 1:

$$PEC \text{ Phase 1} = \frac{DOSE_{ai} \times F_{pen}}{WW_{inhab} \times Dilution \times 100}$$

PEC Phase 1 : Concentration prédite dans les eaux de surface (mg/L). **DOSE_{ai}** : Dose journalière maximale du médicament consommée par habitant (mg/hab/jour). **F_{pen}** : Facteur de pénétration du médicament sur le marché (1% par défaut). **WW_{inhab}** : Quantité d'eaux usées par jour et par habitant sur la zone considérée (valeur moyenne par défaut = 200 L/habitant/jour). **Dilution** : Facteur de dilution des effluents de STEP dans les eaux de surface (par défaut, la valeur est 10).

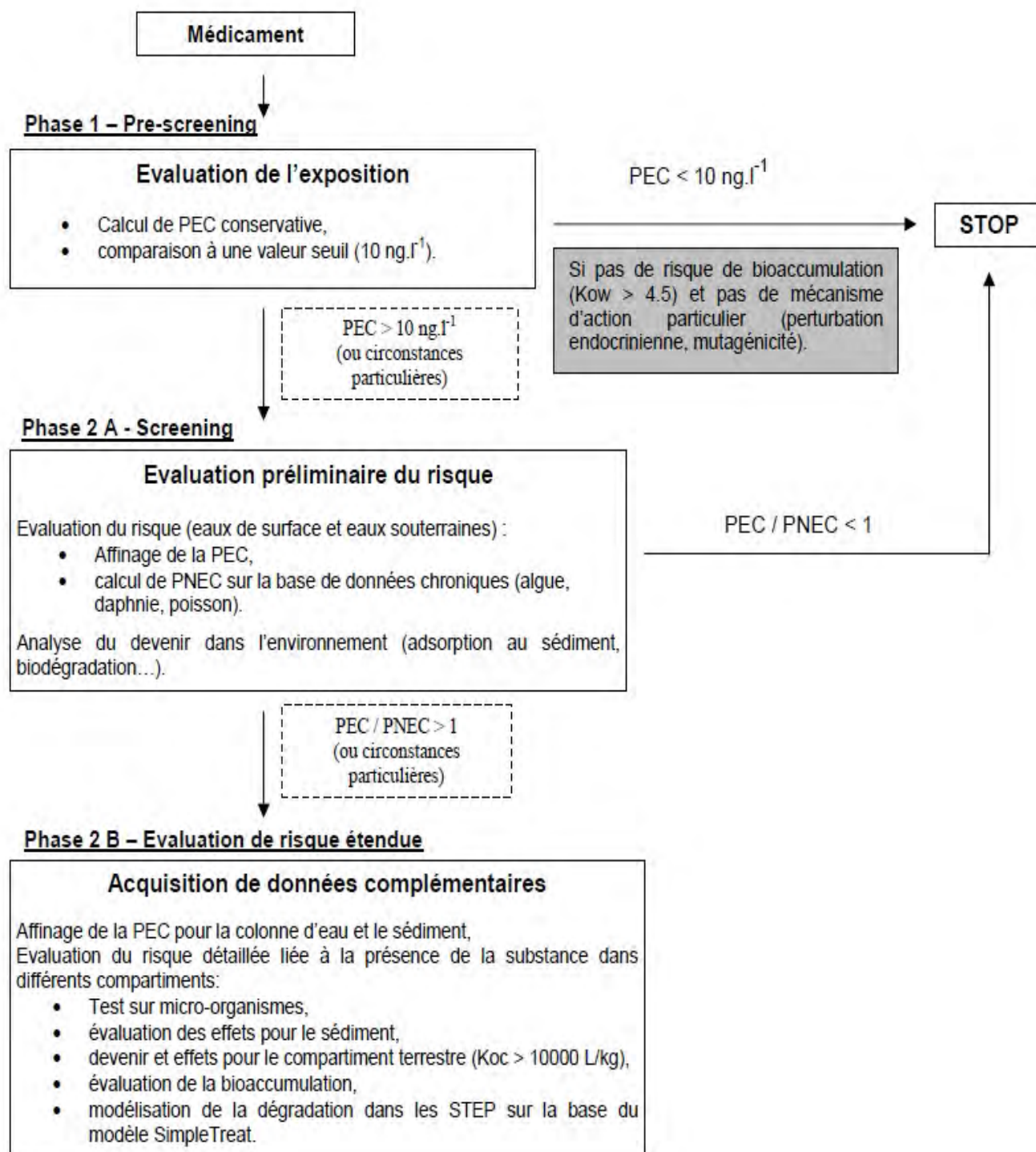


Figure 8 : Schéma de la procédure d'évaluation du risque environnemental de l'EMEA (EMEA 2006) pour les substances pharmaceutiques à usage humain. (Thèse Besse 2010)

Le calcul de la PEC Phase 1 donne une valeur en mg/L. Si la valeur de la PEC eau de surface est inférieure à 10 ng/L, le produit pharmaceutique est classé comme ne présentant pas de risque environnemental et est exclu de toute démarche d'évaluation de risque ultérieur. Cependant, si la valeur de la PEC Phase 1 est égale ou supérieure à 10 ng/L, l'analyse du produit pharmaceutique est poursuivie en phase 2 (EMEA 2006). La phase 2 A consiste à calculer des ratios PEC/PNEC (concentration prédite sans effet). Les valeurs de PNEC sont dérivées à partir des données

écotoxicologiques chroniques disponibles (NOEC) établies sur la base des tests standardisés selon les normes de l'OCDE. Un facteur de sécurité est appliqué à chaque valeur de NOEC afin de prendre en compte les incertitudes de l'extrapolation des données de laboratoire par rapport à la réalité environnementale (Tableau 4).

Tableau 4: Facteurs de sécurité à appliquer lors du calcul des PNEC

Données disponibles	Facteurs de sécurité
Au moins une CE(L) ₅₀ aiguë pour chacun des trois niveaux trophiques de la "base set" (algue, daphnie, poisson)	1000
Une NOEC long terme (poisson ou daphnie)	100
Deux NOEC long terme pour deux niveaux trophiques différents (algue et/ou daphnie et/ou poisson)	50
NOEC long terme pour au moins trois espèces représentant trois niveaux trophiques (algue, daphnie, poisson)	10

(selon Thèse Besse, 2010)

L'EMEA 2006 n'utilise que les données écotoxicologiques chroniques et ne dérive les PNECs que lorsqu'il y a au moins 3 valeurs de NOEC connues pour 3 espèces représentant 3 niveaux trophiques différents (habituellement algue, daphnie et poisson). De ce fait, le facteur de sécurité appliqué aux NOEC pour obtenir les PNEC est de 10. Après calcul du quotient de risque (QR) PEC/PNEC, si le ratio est inférieur à 1, l'étude d'impact sur le compartiment aquatique n'est pas nécessaire et il peut être conclu que la substance pharmaceutique et/ou ses métabolites ne présentent pas de risque pour l'environnement. Si ce même ratio est supérieur à 1 (ou à 0,1 lorsque les résultats utilisés proviennent de test sur des microorganismes), une évaluation du devenir de la substance pharmaceutique et de ses métabolites est poursuivie dans la deuxième partie de la phase 2 où le calcul de PEC prend en compte la consommation des médicaments, leur métabolisation dans l'organisme, la dégradation dans les STEPs et de leur l'adsorption sur les matières en suspension (MES) (Equation 2) :

Equation 2:

$$PEC \text{ Phase } 2B = \frac{DOSE_{ai} \times F_{pen} \times F_{excreta} \times F_{step}}{WW_{inhab} \times Factor \times Dilution \times 100}$$

PEC Phase 2B : Concentration prédite dans les eaux de surface (mg/L). **DOSE_{ai}** : Dose journalière maximale du médicament consommé par habitant (mg/hab/jour). **F_{pen}** : Facteur de pénétration du médicament sur le marché (1% par défaut). **F_{excreta}** : Fraction excrétée de la substance active (prise en compte de la métabolisation du composé). **F_{step}** : Fraction du composé émis dans l'eau de surface à partir de la STEP (prise en compte de la dégradation du composé dans les STEP). **WW_{inhab}** : Quantité d'eaux usées par jour et par habitant sur la zone considérée (valeur moyenne par défaut = 200 L/habitant/jour). **Factor** : Facteur d'adsorption sur la matière en

suspension. **Dilution** : Facteur de dilution des effluents de STEP dans les eaux de surface (par défaut, la valeur est 10).

Les principales variantes de l'EMEA sont propres à chaque pays réalisant une évaluation des risques, mais le calcul du ratio PEC sur PNEC est presque toujours conservé, sauf pour les États Unis qui calculent plusieurs ratios dont le ratio de risque potentiel par l'équation suivante (Équation 3) :

Equation 3 :

$$EP = \frac{T}{V \times NOEC}$$

EP : Potentiel écotoxique. **T** : Temps de séjour du composé dans l'environnement. **V** : Concentration du composé dans l'environnement. **NOEC** : Concentration la plus forte sans effet observable.

En France, l'étude de Besse *et al.* 2008 a ajusté le calcul de la PEC eau de surface (Equation 4) afin de prendre en compte les quantités de molécules d'intérêts consommées :

Equation 4 :

$$\text{PEC eau de surface} = \frac{\text{consommation} \times \text{Fexcrété} \times \text{Fstp}}{\text{WWparhab} \times \text{hab} \times \text{Dilution} \times 365}$$

Consommation : quantité en mg/an d'une molécule active consommée par la population pendant 1 an. **Fexcrété** : fraction excrétée de la molécule active. **Fstp** : fraction de la molécule rejetée par les effluents de STEP dans les eaux de surfaces. **WWparhab** : volume d'eau usée par habitant et par jour (valeur moyenne par défaut = 200 L/habitant/jour). **Hab** : nombre d'habitants avec un facteur de correction de 100 pour obtenir la valeur en pourcentage. **Dilution** : facteur de dilution des effluents de STEP dans les eaux de surface (par défaut, la valeur est 10). **365** : nombre de jours par an (jours/an).

À ces méthodes d'évaluation des risques, on peut ajouter le calcul de ratios permettant d'apporter des informations complémentaires quant au devenir de la molécule comme le montre le calcul du PNR_i, qui est le pourcentage de composé *i* non éliminé (PNR_i de l'anglais Percentage of compound *i* Not Removed) par les STEPs, calculé selon l'équation 5 :

Equation 5 :

$$\text{PNR}_i = \frac{\text{concentration de } i \text{ dans les effluents de STEP}}{\text{concentration de } i \text{ dans les influents de STEP}}$$

Ce ratio permet d'identifier les molécules pour lesquelles les traitements en STEP sont efficaces ou inefficaces.

La hiérarchisation des molécules médicamenteuses en fonction du risque qu'elles représentent est réalisée à partir des équations vues précédemment qui peuvent différer d'un pays à l'autre voire d'une étude à l'autre. Ainsi, en fonction des paramètres sélectionnés pour le calcul des PEC et des PNEC, les résultats des ratios de type PEC/PNEC varient et il devient très vite difficile de

comparer les résultats de plusieurs études de priorisation (Tableau 5). Le tableau 5 montre que les quotients de risque sont très différents d'une part en fonction de la PEC considérée, qui est soit une concentration calculée et donc prédite (PEC), soit une concentration mesurée (MEC). De plus, les quotients de risques varient en fonction de la PNEC considérée qui dépend du ou des organismes modèles utilisés pour établir la NOEC, mais aussi du protocole expérimental mis en œuvre. Certaines molécules comme l'oxazépam peuvent avoir des quotients de risque réel variant de 0,3 à 11,52 ou encore la sertraline avec des quotients prédits pouvant varier de 0,00043 à 968,8 en fonction des références. Ces différences proviennent majoritairement des valeurs de PEC et de MEC utilisées qui peuvent être différentes d'une étude à l'autre. Par exemple, pour le diclofénac et la carbamazépine, les valeurs de MEC utilisées sont respectivement de 16 et 48 ng/L pour l'étude de Bouissou Schurtz (2014) et sont de 676 et 571 dans l'étude de Mendoza (2015). De la même façon, les PEC de l'oxazépam utilisées dans les études de Bouissou Schurtz (2014) et d'Ahlford (2008) sont très différentes.

Tableau 5: Liste des quotients de risques de quelques molécules médicamenteuses			
	PEC/PNEC (quotient prédit)	MEC/PNEC (quotient réel)	Référence
Carbamazépine	3,20	0,02	(Bouissou-Schurtz <i>et al.</i> 2014)
	0,31	ND	(Besse <i>et al.</i> 2008)
	ND	0,20	(Mendoza <i>et al.</i> 2015)
	0,23	ND	(Mansour <i>et al.</i> 2016)
Oxazépam	2,10	0,30	(Bouissou-Schurtz <i>et al.</i> 2014)
	7,17	11,52	(Ahlford 2008)
Sertraline	0,00043	ND	(Mansour <i>et al.</i> 2016)
	0,22	ND	(Besse <i>et al.</i> 2008)
	0,22	ND	(Henry <i>et al.</i> 2004)
	968,80	22,00	(Ahlford 2008)
Cyamémazine	ND	ND	
Ibuprofen	600	1,90	(Bouissou-Schurtz <i>et al.</i> 2014)
	0.00027	ND	(Besse <i>et al.</i> 2008)
	ND	219,60	(Mendoza <i>et al.</i> 2015)
	0,23	ND	(Mansour <i>et al.</i> 2016)
17- β -estradiol	62,50	ND	(Mansour <i>et al.</i> 2016)
17- α -etinyloestradiol	0,24	ND	(Mansour <i>et al.</i> 2016)
Diclofénac	0,012	ND	(Mansour <i>et al.</i> 2016)
	15,00	0	(Bouissou-Schurtz <i>et al.</i> 2014)
	ND	13,5	(Mendoza <i>et al.</i> 2015)

Malgré la difficulté de comparer les quotients de risques des différentes études, on peut constater que l'ibuprofène, le 17- β -estradiol et le diclofénac sont souvent retrouvés en tête des tableaux avec le plus fort quotient de risque et font partie des listes de molécules prioritaires ajoutées par le conseil et le parlement européen en 2013 (Bouissou-Schurtz *et al.* 2014; Mendoza *et al.* 2015; Mansour *et al.* 2016). Le calcul des quotients de risques pour les molécules de types psychotropes suggère que ces molécules présentent un risque pour l'environnement avec un ratio souvent supérieur à 1 et parfois même supérieur à 950 (sertraline) (Tableau 5). Au vu des coefficients de risques, le rejet de ces molécules dans l'environnement aquatique paraît préoccupant. De plus, la plupart de ces molécules sont de nature liposoluble. La sertraline et la cyamémazine ont un LogKow respectif de 5,29 et 4,28. Ces molécules peuvent donc se bioaccumuler. En effet, Beek *et al.*, (2000) considèrent qu'un LogKow de 3 constitue la valeur seuil pour considérer qu'une molécule a un pouvoir de bioaccumulation (Beek *et al.* 2000; Montiel 2006; Roig 2010, Drugbank). Dans le cas de la carbamazépine et de l'oxazépam, ces deux molécules affichent un faible pouvoir de bioaccumulation avec un LogKow respectif de 2,25 et de 2,24. Malgré le risque potentiel que peuvent présenter ces molécules pour l'environnement, cette catégorie de médicament reste peu étudiée avec une fréquence de citation estimée entre 4 % pour les molécules les plus étudiées comme la carbamazépine à 0,6 % pour des molécules comme le diazépam (en comparaison, certains perturbateurs endocriniens ont une fréquence de citation d'environ 30 % (Miège *et al.* 2008). Aux vu de ces résultats d'évaluation de risques et de la faible quantité de données disponibles sur cette classe de médicaments, il semble important aujourd'hui de réaliser beaucoup plus de travaux sur cette catégorie de résidus médicamenteux. Une étude menée par Besse et Garric (2008) a dressé une liste qui recommande d'inscrire 40 molécules, dont 5 psychotropes, dans la stratégie de priorisation. Pour toutes ces raisons, notre étude s'est focalisée sur 4 de ces 5 molécules psychotropes, la carbamazépine, l'oxazépam, la cyamémazine et la sertraline, représentant 4 classes thérapeutiques différentes, respectivement les antiépileptiques, les anxiolytiques, les neuroleptiques et les antidépresseurs. Cette étude a été menée sur deux organismes dulçaquicoles, *Radix balthica* et *Schmidtea polychroa* présents dans les cours d'eau français et européens et susceptibles d'être exposés de manière ponctuelle ou chronique à une ou plusieurs de ces molécules.

II. Les médicaments psychotropes, intérêt, effets et cibles thérapeutiques

L'augmentation des concentrations en médicaments dans les différents compartiments aquatiques au cours du temps peut être directement corrélée à une augmentation de la production, de la prescription et de la consommation de ces médicaments par la société. Comme nous avons pu le voir précédemment (Chapitre 1, I., b.), les molécules à cible neurologique sont de plus en plus

consommées au fil des années. Ces molécules sont aussi connues sous le terme "psychotrope". Défini au cours des années 1960, il caractérise toutes les molécules possédant un tropisme psychologique susceptible de modifier l'activité mentale. Le groupe des psychotropes rassemble de nombreuses molécules possédant diverses activités.

a. Les différentes classes thérapeutiques de psychotropes

Les médicaments psychotropes sont utilisés en psychiatrie et en santé mentale (individus ayant subi un traumatisme ou en situation d'exclusion), pour traiter les maladies psychiques en complément de la psychothérapie et de l'accompagnement social. Un médicament psychotrope est un médicament qui agit sur des cibles neurobiologiques du cerveau afin de soigner les troubles ou les dysfonctionnements de l'activité psychique. L'activité psychique résulte d'une activité électrique et biochimique des neurones. Une partie de cette activité repose sur la production de neurotransmetteurs (NT) comme la dopamine, la sérotonine ou encore la noradrénaline. Lorsque ces NT sont produits en quantités anormalement importantes ou insuffisantes, ils peuvent entraîner des perturbations de la transmission synaptique pouvant parfois amener à une pathologie comme la schizophrénie, l'anxiété ou la dépression. L'utilisation des psychotropes vise alors à rétablir des quantités normales de NT au niveau des synapses afin de restaurer une transmission synaptique normale.

Plusieurs classifications des psychotropes existent et reposent sur les propriétés pharmacologiques et thérapeutiques ou sur la dangerosité de ces derniers : classification de l'OMS (1971), classification du rapport Pelletier (1978), classification du Code de la Santé Publique (1990), classification du rapport Roques (1998)). D'autres se basent sur leurs effets : classification de Lewin (1924), classification de Delay et Deniker (1957), classification selon Pelicier et Thuillier (1991)). La classification de 1957 selon Delay et Deniker est à mon sens la plus pertinente pour catégoriser la diversité de molécules. La classification a été organisée selon quatre catégories d'effets : les psycholeptiques, les psychoanaleptiques, les normothymiques et les psychodysleptiques. Les psycholeptiques dont font parties la carbamazépine, l'oxazépam et la cyamémazine, regroupent les molécules diminuant l'activité mentale. Cette classe contient l'ensemble des hypnotiques, des neuroleptiques, des anxiolytiques et des anesthésiques. Les psychoanaleptiques dont fait partie la sertraline, sont des molécules ayant comme effet d'augmenter l'activité mentale. Cette classe contient l'ensemble des antidépresseurs, des psychostimulants et des éveillants. Les psychodysleptiques regroupent les molécules qui perturbent l'activité psychique ainsi que l'ensemble des molécules hallucinogènes et euphorisantes. Enfin, les normothymiques sont des molécules permettant de régulariser l'activité psychique et notamment l'humeur. Cette classe est composée des sels de lithium et du divalproate de sodium.

Les quatre molécules sélectionnées sont présentées dans les parties suivantes b., c., d. et e. Pour chaque médicament, la description sera organisée comme suit. En premier lieu, nous décrirons les effets thérapeutiques de la molécule ainsi que la cinétique de dégradation chez l'homme, puis nous aborderons les effets secondaires et enfin la toxicité déjà observée sur différentes cultures cellulaires ou encore sur mammifères.

b. L'oxazépam

i. Effet(s) thérapeutique(s) contre la ou les pathologie(s) ciblée(s)

L'oxazépam est une molécule commercialisée sous plusieurs noms comme Seresta®, Anxiolit® ou encore Oxepam® et fabriquée par les laboratoires Biodim, Apotex, etc. Cette molécule est classée dans les anxiolytiques de la famille des psycholeptiques. D'un point de vue chimique, l'oxazépam fait partie de la classe des benzodiazépines. Les benzodiazépines sont des molécules utilisées pour traiter des pathologies telles que l'anxiété ou les crises convulsives, mais ils peuvent être aussi utilisés à des fins myorelaxantes.

L'oxazépam ($C_{15}H_{11}ClN_2O_2$) se caractérise par un cycle benzénique fusionné à un cycle diazépine. On retrouve sur ces cycles 4 chaînes latérales conférant à chaque molécule une propriété (Figure 9). Ce médicament est issu de la dégradation du diazépam, du prazépam et du témazépam.

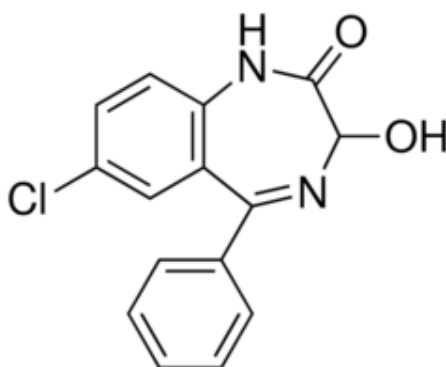


Figure 9 : Molécule d'oxazépam

Les benzodiazépines ciblent tous les neurones GABAergiques du système nerveux central. L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est un neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Le GABA est spécifiquement reconnu par deux types de récepteurs nommés GABA_A et GABA_B. Le récepteur GABA_A est composé de 5 sous-unités glycoprotéiques de 450 à 550 acides aminés, organisées autour d'un canal chlorure central (R L Macdonald and Olsen 1994) (Figure 10). On trouve ces récepteurs majoritairement sur les neurones postsynaptiques du cortex cérébral, dans les noyaux thalamiques et sur la couche granulaire du cervelet.



Figure 10 : Récepteur GABA de type A couplé à un canal chlorure

Chaque sous-unité possède un domaine extracellulaire contenant un site de fixation pour le GABA. Le pore (canal chlorure) est constitué d'un domaine transmembranaire. L'ouverture de ce canal aux Cl^- est médiée par la fixation de deux molécules de GABA. En dehors des sites de fixation du neurotransmetteur GABA, le récepteur GABA_A possède une variété d'autres sites de fixation topographiquement distincts pour des molécules actives comme l'oxazépam qui vont moduler l'action du GABA (Möhler 2002). L'oxazépam agit en se fixant sur le site allostérique spécifique du récepteur GABA_A . L'oxazépam est un agoniste de l'action du GABA. Il maintient le canal chlorure central ouvert ce qui conduit à une hyperpolarisation de la membrane des cellules neurologiques et diminue ainsi fortement la conduction nerveuse (Figure 11).

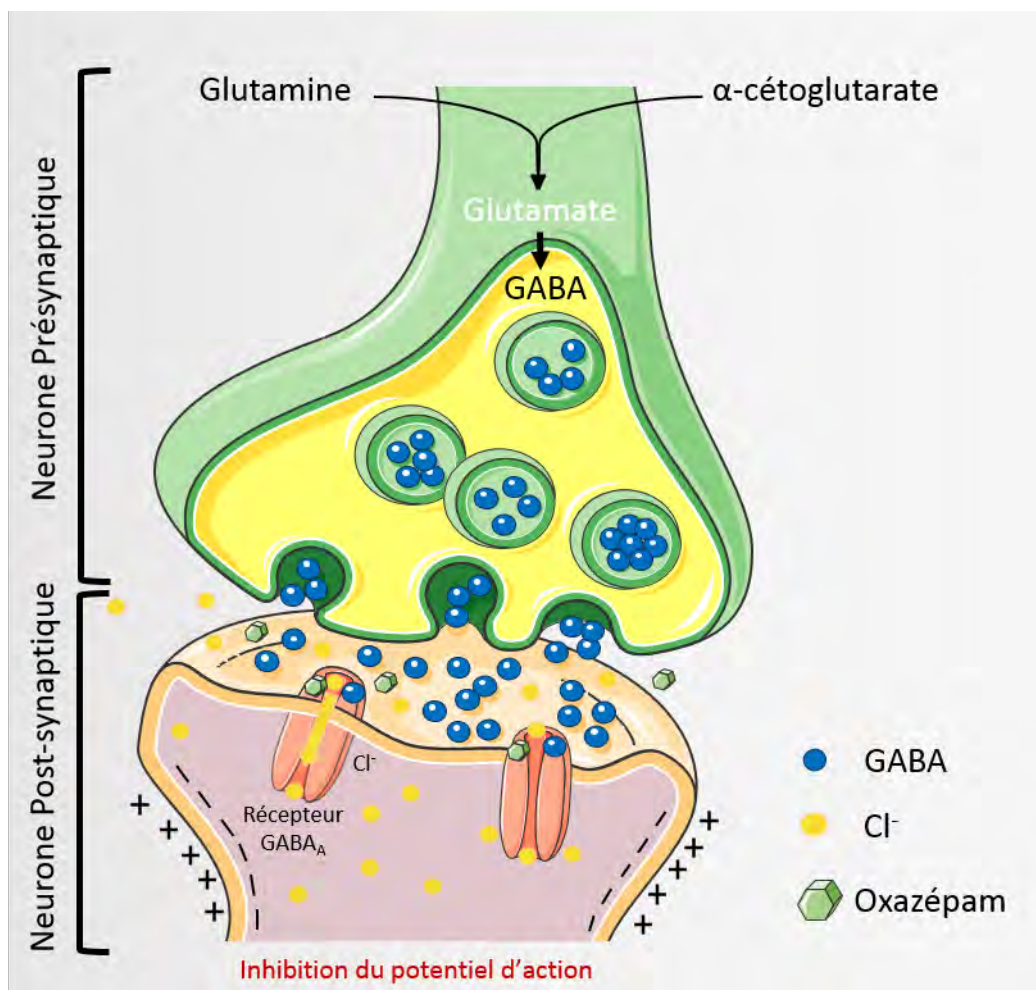


Figure 11 : Mode d'action de l'oxazépam

La demi-vie de l'oxazépam est d'environ 10 heures. Étant déjà un métabolite actif (Figure 12), l'oxazépam présente l'avantage de ne pas solliciter le centre hépatique qui ne produit pas de métabolites actifs dans l'organisme (Bader *et al.* 2000). Cependant, l'oxazépam subit une glucuronosyl conjugaison par une Glucuronosyl transférase et produit du (R/S)-glucuronyl oxazépam (Court *et al.* 2004; Mandrioli *et al.* 2010).

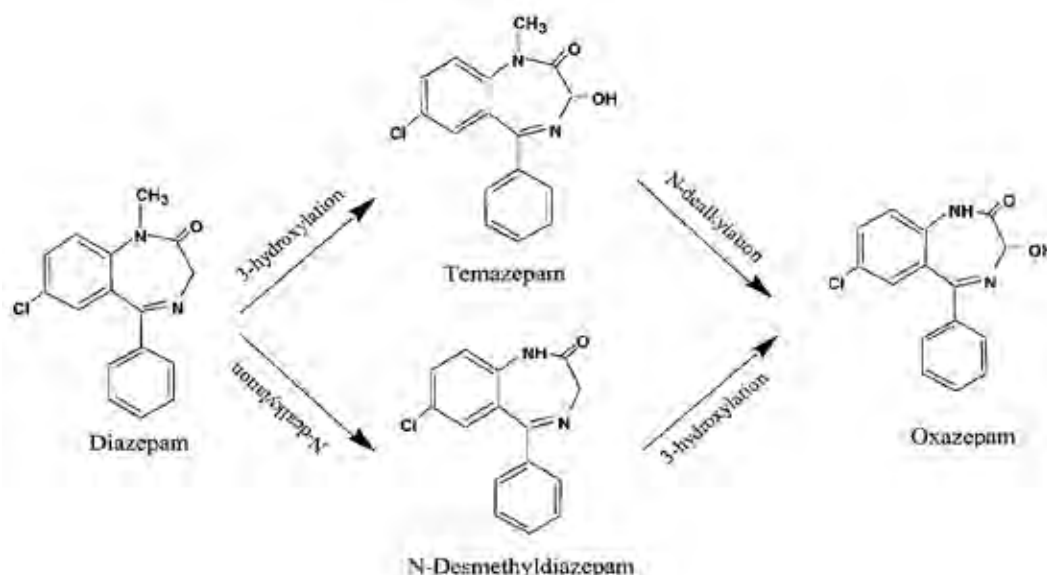


Figure 12 : Métabolisation de l'oxazépam (Bader *et al.*, 2000)

ii. Les effets secondaires du traitement

Les effets secondaires de l'oxazépam sont pour la plupart ceux rencontrés avec les autres benzodiazépines. En cas de diminution rapide de la dose ou de l'arrêt du traitement, des douleurs abdominales, des crampes musculaires, des convulsions, une dépression, des insomnies, une transpiration excessive, des tremblements ou encore des vomissements peuvent apparaître (Mackinnon and Parker 1982; Bond and Lader 2012). Les effets secondaires les plus fréquents sont tout de même la somnolence et de grosses pertes de mémoire (Notice SERESTA®, Mackinnon and Parker 1982; Bond and Lader 2012). Comme effets secondaires rares ou possibles, on trouve des amnésies antérogrades, des ictus amnésiques, des vertiges, des céphalées, des difficultés de mémorisation, une excitation paradoxale, une diplopie (vision double), une augmentation de l'appétit, de l'euphorie, de la fatigue excessive, une désorientation, une obnubilation et une dépendance (Mackinnon and Parker 1982; Bond and Lader 2012). Les effets secondaires plus rares constatés sont le syndrome myasthénique, une dépression respiratoire ou encore des érythèmes pigmentés fixes (Notice SERESTA® ; (Mackinnon and Parker 1982; Bond and Lader 2012).

iii. Toxicité de l'oxazépam

- Pathologie et concentration létale de l'oxazépam

La toxicité aiguë sur vertébrés a été évaluée chez le rat (*Rattus norvegicus*) par administration orale et sous-cutanée. La DL₅₀ (Dose Létale à 50 %) obtenue est de plus de 8 g/kg (Material Safety Data Sheet PNU-0029556, Pfizer). Chez la souris (*Mus musculus*), l'administration par voie orale montre une DL₅₀ comprise entre 1,54 et 5 g/kg (Fox and Lahcen 1974) et une DL₅₀ de plus de 400 mg/kg pour une administration sous-cutanée (Material Safety Data Sheet PNU-0029556, Pfizer). Une administration orale du médicament chez le lapin montre une DL₅₀ de 2 g/kg (Material Safety Data Sheet PNU-0029556, Pfizer).

Une administration orale, répétée et à long terme de l'oxazépam à 25 mg/kg chez le rat ne montre pas d'effet sur les principaux organes tels que les reins, le foie ou encore l'appareil gastro-intestinal (Material Safety Data Sheet PNU-0029556, Pfizer). Chez la souris, une administration orale de l'oxazépam à 25 mg/kg induit un effet toxique sur le système nerveux central (SNC) et le foie. Sur le chien, après administration orale de l'oxazépam, on constate une LOAEL (Lowest Observable Adverse Effect Level, Dose minimale induisant un effet) de 10,920 mg/kg/jour sur les organes du système endocrinien. Sur le rat on observe une LOAEL de 5,250 mg/kg/jour sur les organes du système endocrinien et sur la vessie (Material Safety Data Sheet PNU-0029556, Pfizer). Des études sur l'activité carcinogène de la molécule ont été menées sur le rat et la souris. On constate chez le rat des effets carcinogènes de l'oxazépam sur les reins avec une LOAEL de 25 mg/kg/jour (Material Safety Data Sheet PNU-0029556, Pfizer). L'étude sur la souris montre une LOAEL de 12 mg/kg/jour avec des effets carcinogènes sur le foie (Material Safety Data Sheet PNU-0029556, Pfizer). L'oxazépam administré à forte concentration peut amener à une toxicité de plusieurs organes vitaux chez les vertébrés qui pourrait perturber de nombreuses fonction telles que la détoxification, la conduction nerveuse ou encore la mobilité.

- Expression génique et activité protéique

Selon les travaux de Devreux *et al.*, (1994), l'oxazépam apporté par l'alimentation à 2500 ppm, impacte les fonctions hépatiques chez les vertébrés, notamment chez la souris (ligné B6C3F1) en stimulant la peroxydation des lipides, l'activité de la Catalase et de la Glutathion peroxydase (Gpx) (Devereux *et al.* 1994). Les fonctions de détoxification sont donc activées par l'oxazépam. Dans le même sens, l'étude de Lahousse *et al.* (2011), a montré que l'oxazépam pourrait induire la surexpression des gènes du cytochrome P450 sur les tumeurs de souris (*cyp2a5*, *cyp2b10*, *cyp2c55*...) (Lahousse *et al.* 2011). La surexpression des gènes du cytochrome pourrait aussi augmenter la production de ROS. Cette étude montre une inhibition du gène *sirt1*, inhibiteur de la β -caténine. Cette protéine intervient dans la signalisation cellulaire (voie Wnt), l'adhésion cellulaire ou encore en tant que facteur de transcription. Ainsi, la β -caténine intervient dans de nombreux processus fondamentaux de l'organisme et joue un rôle primordial au cours du développement embryonnaire

des vertébrés, notamment dans l'acquisition de l'axe dorsal antéro-postérieur. En inhibant *sirt1*, l'oxazépam impacte certaines étapes essentielles du développement embryonnaire, ainsi que des processus fondamentaux des organismes exposés.

- Dommage à l'ADN de l'oxazépam

L'étude d'Ibrulj et Duricić (2001) a permis d'évaluer l'effet de l'oxazépam sur une lignée de lymphocytes humains (Lymphocytes humains binucléés et bloqués par la cytocholasin- β) en évaluant la formation de micronoyaux (MN) par les cellules après 72 h d'exposition à l'oxazépam. Il en résulte que l'oxazépam induit la formation de MN pour toutes les concentrations testées (de 0,5 à 50 mg/ml). Ces résultats mettent en avant un effet génotoxique de l'oxazépam. De plus, les travaux de Shane *et al.*, (1999) montrent grâce au test des comètes (SCGE pour single cell gel electrophoresis) que l'oxazépam à 1mM induit des dommages à l'ADN sur myéloïdes humains leucémiques (K562) (Shane *et al.* 1999). Cette étude montre aussi que l'oxazépam pourrait avoir un effet mutagène en induisant des transversions de bases azotées puriques en bases azotées pyrimidiques (Guanine en Thymine et Guanine en Cytosine).

c. La carbamazépine

i. Effet(s) thérapeutique(s) contre la ou les pathologie(s) ciblée(s)

La carbamazépine est une molécule commercialisée sous le nom de Tegretol®, Carsol® ou encore Timonil® et fabriquée par le laboratoire Novartis ou encore le laboratoire Viollier. Cette molécule fait partie des antiépileptiques de la famille des psycholeptiques. D'un point de vue chimique, la carbamazépine a une structure proche de celles des phénothiazines. L'épilepsie est l'une des pathologies neurologiques les plus fréquentes dans le monde avec une prévalence de 0,5% de la population. Cette maladie résulte d'une hyperexcitabilité neuronale conduisant à des décharges anormales de potentiel d'action de tout ou une partie des neurones du cerveau pouvant provoquer des crises convulsives. On distingue deux grands types de crises, les crises dites partielles qui ne concernent qu'un groupe de neurones conduisant à des manifestations épileptiques focales (altération ou non de l'état de conscience) et les crises dites généralisées qui concernent l'ensemble des neurones du cerveau amenant à une perte de l'état de conscience courte ou prolongée avec une activité convulsive. Cette hyperexcitabilité s'explique par l'instabilité ionique de la membrane cellulaire.

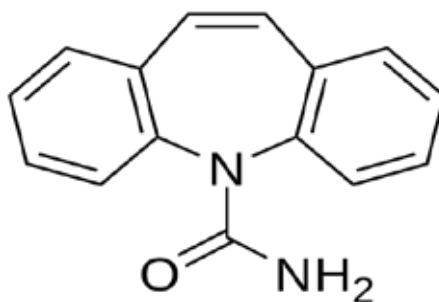


Figure 13 : Molécule de carbamazépine

La carbamazépine ($C_{15}H_{12}N_2O$) (Figure 13) se caractérise par un noyau tricyclique composé de deux cycles benzéniques couplés par un atome d'azote et une chaîne latérale ($CONH_2$) liée par l'atome d'azote du noyau central.

Les médicaments antiépileptiques interviennent selon trois actions principales que sont : la modulation des canaux cationiques, l'augmentation de l'inhibition médiée par l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la diminution de l'action du glutamate. Pour éviter la tendance à la dépolarisation cellulaire observée chez les patients atteints d'épilepsie, on renforce la polarisation cellulaire soit en inhibant l'entrée de sodium, soit en favorisant l'entrée de chlorure. La carbamazépine a pour action principale de bloquer les canaux sodium voltage dépendant pré- et post-synaptiques. Ces canaux sont présents dans l'ensemble du système nerveux central et leur structure est détaillée en Figure 14.

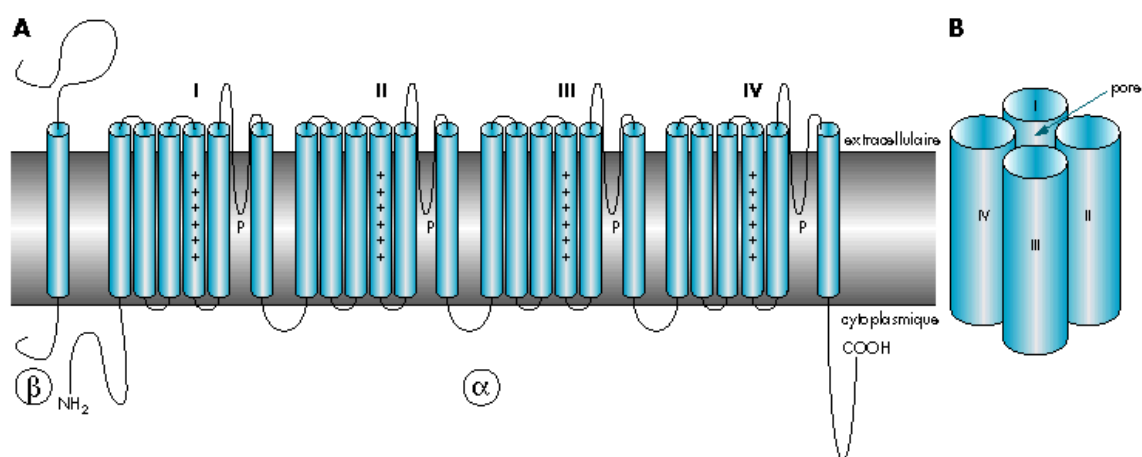


Figure 14 : Schéma d'un canal sodium voltage dépendant

L'ouverture des canaux sodium voltage dépendant provoque une entrée massive d'ions Na^+ qui crée un potentiel d'action (PA) le long de la membrane du neurone. La carbamazépine, inhibe l'ouverture des canaux sodiums voltage dépendants ne déclencheront pas de PA le long de la membrane des neurones (Figure 15). De ce fait, le potentiel d'action est maîtrisé par une augmentation du seuil d'excitabilité.

D'un point de vue pharmacocinétique, la carbamazépine est efficace à une concentration plasmatique comprise entre 4 et 8 mg/L et sa demi-vie est comprise entre 13 et 17 heures. Après administration, la biodisponibilité de la carbamazépine est très élevée. Après son absorption intestinale, la carbamazépine est prise en charge par le centre hépatique où elle est métabolisée par les enzymes du cytochrome P450 (CYP), notamment par le CYP3A4, le CYP2D et le CYP2C8. La carbamazépine est tout d'abord métabolisée en 10,11-époxy-carbamazépine puis en 10,11-dihydroxy-carbamazépine inactives (Figure 16) (Attia 2010). Les produits de la métabolisation sont ensuite excrétés dans les urines.

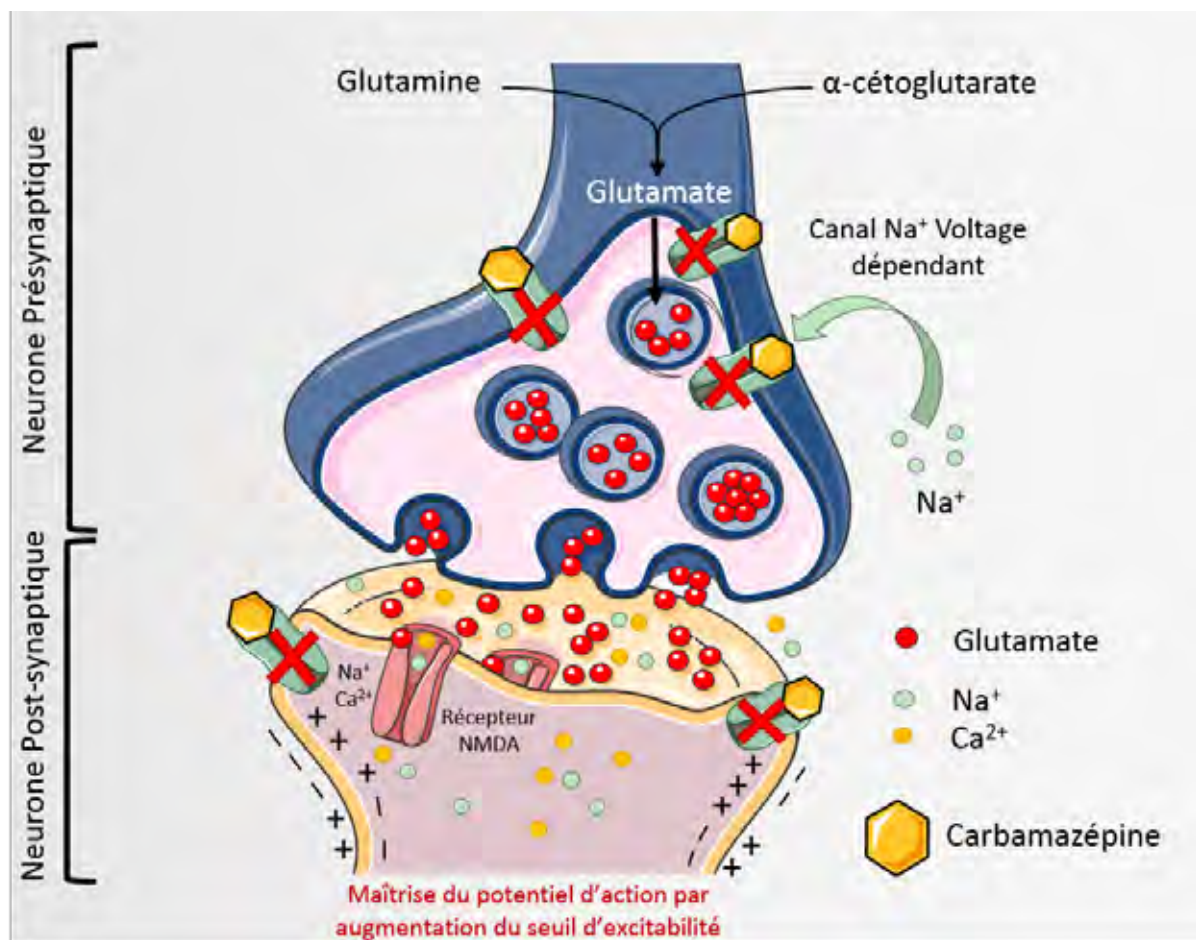


Figure 15 : Mode d'action de la carbamazépine chez les vertébrés

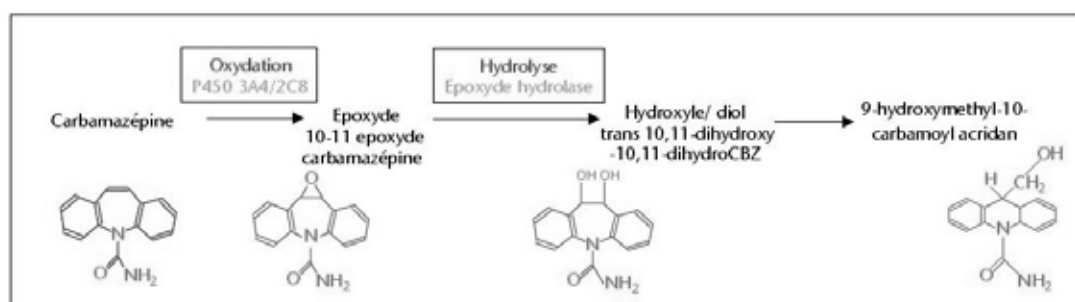


Figure 16 : Les étapes de la métabolisation de la carbamazépine

ii. Les effets secondaires du traitement

De nombreux effets secondaires sont signalés lors d'un traitement à la carbamazépine. Le patient peut montrer des signes d'agitation, de confusion, de vertiges, de diplopie, de maux de tête, de troubles de l'équilibre, de somnolence ou encore de fatigue (Notice Carbamazépine Sandoz® ; Schweizer *et al.* 1991). La carbamazépine peut déclencher des troubles de la digestion comme des nausées, des vomissements, une augmentation des enzymes du foie, des diarrhées ou encore des constipations (Notice Carbamazépine Sandoz®). La carbamazépine peut affecter les défenses

immunitaires avec une diminution des leucocytes, une diminution du nombre de plaquettes ou une augmentation du nombre d'éosinophiles et provoquer ainsi des réactions allergiques sévères par le mécanisme d'hypersensibilité (Syndrome DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms), syndrome de Lyell ou encore le syndrome de Stevens-Johnson, qui se manifeste par des éruptions cutanées, dermatite exfoliatrice ou encore une érythrodermie (Queyrel *et al.* 2001; McCormack *et al.* 2011). Plus rarement, on peut observer des effets secondaires tels que des cas d'œdème de Quincke, de ralentissement du rythme cardiaque, d'insuffisance rénale, de perte de cheveux ou encore de diminution des cellules sanguines (Notice Carbamazépine Sandoz® ; Schweizer *et al.* 1991).

iii. Evaluation de la toxicité

- Pathologie et concentration létale de la carbamazépine

Les données disponibles sur la toxicité de la carbamazépine montrent une LDLO (Dose minimale du composé ayant entraîné la mort de l'animal exposé, de l'anglais Lethal Dose Low) de 54 mg/kg pour l'homme et 1920 mg/kg chez la femme après administration orale (Material safety data sheet, c4024, Sigma-Aldrich ; Safety data sheet, 15422, Cayman Chemical Company). Chez le rat, on constate une DL₅₀ de 1957 mg/kg avec une administration orale, plus de 1500 mg/kg lors d'une administration sous-cutanée et 158 mg/kg après administration intrapéritonéale (Material safety data sheet, c4024, Sigma-Aldrich ; Safety data sheet, 15422, Cayman Chemical Company). Chez la souris, l'administration orale du composé provoque la mort de 50% des animaux testés à 526 mg/kg (DL₅₀), par administration sous-cutanée la DL₅₀ se situe à plus de 1 g/kg et par voie intrapéritonéale la DL₅₀ est de 114 mg/kg (Material safety data sheet, c4024, Sigma-Aldrich ; Safety data sheet, 15422, Cayman Chemical Company). De plus, la toxicité de la carbamazépine a été testée sur le chien, le lapin et le cochon d'Inde et montre des DL₅₀ respectives de 5620, 2680 et 920 mg/kg (Material safety data sheet, c4024, Sigma-Aldrich ; Safety data sheet, 15422, Cayman Chemical Company).

- Cytotoxicité de la carbamazépine

L'étude de Murabe *et al.*, (2007) montre que la carbamazépine a un effet cytotoxique sur cellules souches embryonnaires et sur fibroblastes (NIH-3T3) avec des IC₅₀ respectifs de 0,24 et 0,31 mM. La cytoxicité de la carbamazépine a aussi été testée par Mannerström *et al.* (2006), sur des lignées de cellules hépatiques primaires de souris, sur des cellules humaines d'hépatoblastome (Hep-G2), de neuroblastomes (SH-SY5Y) et d'astrocytomes (U-373 MG). Il en résulte que la carbamazépine impacte significativement la viabilité cellulaire des lignés SH-SY5Y à 420 µM ainsi que des hépatocytes primaires de souris de 42 à 420 µM, mais elle n'impacte pas les cellules U-373 MG, ni les cellules Hep-G2.

- Expression génique et activité protéique

La carbamazépine a un effet cytotoxique sur des cellules souches embryonnaires de souris selon l'étude de Murabe *et al.* (2007). En effet, la carbamazépine impacte de nombreux marqueurs de différenciation cellulaire. La carbamazépine induit la surexpression des gènes *sox2* et *oct4* sur les cellules souches embryonnaires de souris. Ces deux gènes sont impliqués dans le processus de renouvellement de cellules germinales et de cellules souches embryonnaires. Ces résultats suggèrent donc un impact de l'oxazépam sur les fonctions reproductrices et développementales. Sur des lignées de cellules souches embryonnaires (ES, Embryonary souche) endodermiques, la carbamazépine induit la surexpression du facteur de transcription *GATA6* (marqueur de détermination précoce de l'endoderme) et inhibe l'expression de deux marqueurs tardifs de détermination des cellules endodermiques de manière concentration dépendante, les gènes *TTR* et *HNF1* (Murabe *et al.* 2007). Sur des lignées d'ES mésodermiques, le gène *Bmp4* (un marqueur précoce de détermination), est surexprimé de manière dose dépendante. La carbamazépine induit également une faible surexpression d'un marqueur précoce de différenciation des cellules mésodermique en cardiomyocytes, *Nkx2.5*, mais inhibe le marqueur tardif de différenciation en cellules cardiaques *ANF* de manière concentration dépendante. De ce fait, la carbamazépine diminue le taux de différenciation. La carbamazépine potentialise les étapes initiales de la différenciation des cellules mésodermiques en différents précurseurs, mais inhibe les étapes de différenciations tardives. L'étude de Theunissen *et al.* (2012) décrit l'impact de la carbamazépine sur l'expression globale des gènes sur cellules souches embryonnaires murines à l'aide d'une puce Affymetrix (Mouse Genome 430 2.0 arrays). Les principales fonctions perturbées après une exposition à la carbamazépine sont la transcription, la méthylation, la phosphorylation, le développement neural et l'angiogenèse. Une autre étude réalisée sur souris dont les deux allèles du gène *UGT1* (UDP-Glucuronosyltransférase 1) ont été remplacés par son homologue chez l'homme, le gène *hUGT1* (human UDP-Glucuronosyltransférase 1) (Hirashima *et al.* 2016). Il résulte de cette étude que la carbamazépine induit une surexpression du gène *UGT1A1* (200 fois plus) et que l'activité de la protéine UGT1A1 est doublée par la carbamazépine. Ces observations traduisent une probable glucurono-conjugaison de la carbamazépine par les enzymes de la souris au cours du processus de détoxification. D'autre part, cette étude montre aussi une inhibition significative des gènes codants la Synapsin I et la Synaptophysine dans l'hippocampe, marqueurs de la densité synaptique. Ces résultats suggèrent un impact de la carbamazépine sur la synaptogenèse et donc sur toutes les fonctions nécessitant une conduction nerveuse.

d. La cyamémazine

i. Effet(s) thérapeutique(s) contre la ou les pathologie(s) ciblée(s)

Le comprimé formulé de la cyamémazine est commercialisé sous le nom de Tercian®, et fabriqué par le laboratoire Sanofi Aventis. Cette molécule fait partie des neuroleptiques de la famille des psycholeptiques et de la classe chimique des phénothiazines. Les neuroleptiques sont des molécules initialement prévues pour traiter la schizophrénie. Plusieurs études ont tenté de démontrer l'origine de la schizophrénie et ont émis comme hypothèse principale un déséquilibre du système dopaminergique (Meltzer and Stahl 1976; Haracz 1982; Meltzer 1987; Laruelle *et al.* 1996). Plusieurs études montrent aussi que l'efficacité des neuroleptiques contre la schizophrénie est lié à la réduction de l'activité des neurones dopaminergiques (Carlsson and Lindqvist 1963; Seeman *et al.* 1976). L'action antagoniste des neuroleptiques s'exerce sur 4 voies dopaminergiques, les voies mésolimbiques, mésocorticales, nigrostriées, et tubéro-infundibulaires (Franck and Thibaut 2005). Ces molécules ciblent plusieurs pathologies, elles peuvent avoir une activité anti-hallucinatoire (diminution des hallucinations auditives, visuelles ou sensitives), antidépressive, sédatrice (diminution de l'anxiété, de l'agitation ou encore de l'agressivité) et désinhibitrice (amélioration du contact du patient avec la réalité) ("Les médicaments psychotropes", Réseau PIC, 2014).

La cyamémazine ($C_{19}H_{21}N_3S$) se caractérise par un noyau tricyclique composé de deux cycles benzéniques couplés par des atomes d'azote et de soufre et une chaîne latérale ($C_6H_{14}N$) liée par l'atome d'azote du noyau central. La nature de cette chaîne détermine la sous-classe de la molécule (Figure 17).

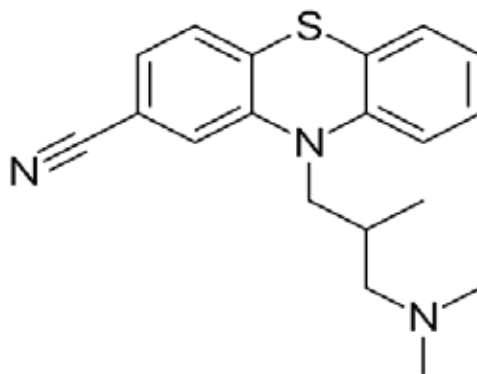


Figure 17 : Formule de la cyamémazine

Les neuroleptiques sont des antagonistes de la Dopamine mais peuvent aussi avoir une action sur d'autres neurotransmetteurs. Les récepteurs à la dopamine sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituées de 7 domaines transmembranaires et ayant l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) comme messenger secondaire (Figure 18). Il existe deux grands types de récepteurs à la dopamine, les récepteurs D1 qui regroupent les récepteurs D1 et D5 et les récepteurs D2 qui regroupent les récepteurs D2, D3 et D4. La classe de récepteurs D1 aboutit à la

formation d'AMPc (Adénosine MonoPosphate cyclique) qui active la Protéine Kinase A (PKA AMPc dépendante) qui va faire sortir les ions K^+ et entrer les ions Na^+ puis provoquer la formation d'un Potentiel d'Action (PA). Les récepteurs de la classe D2 sont couplés à l'adénylate cyclase et aboutissent à l'inhibition de la production d'AMPc et donc à l'inactivation de la PKA qui inhibera la formation d'un potentiel d'action (Figure 18). Les récepteurs D1 sont présents dans tout le cerveau sur la partie postsynaptique des neurones. Les récepteurs D2 eux sont présents sur le corps cellulaire du neurone avec une fonction d'autorécepteur (autorécepteur somatodendritique), sur les régions présynaptiques (autorécepteur présynaptique) et sur les régions postsynaptiques. C'est sur les récepteurs D2 que se fixent les neuroleptiques.

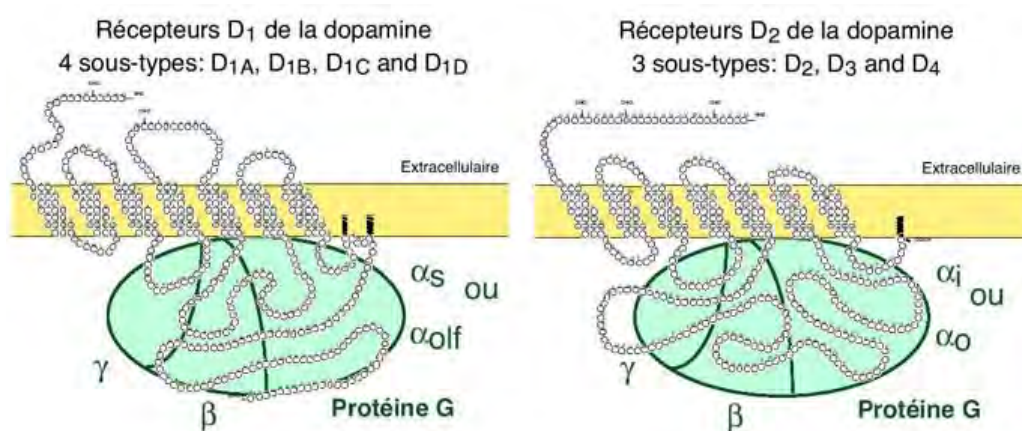


Figure 18 : Les deux types de récepteurs à la dopamine

Les neuroleptiques comme la cyamémazine vont inhiber les récepteurs D2 et donc inhiber l'activité des neurones dopaminergiques, ainsi que la synthèse et la libération de la Dopamine. De plus la stimulation des autorécepteurs va aussi diminuer l'activité dopaminergique et donc l'activité cérébrale (Figure 19).

Le délai d'absorption des phénothiazines est variable d'un individu à un autre, se situe entre 30 et 90 minutes après la prise par voie orale et présente une biodisponibilité de 60 à 70%. La demi-vie des phénothiazines se situe entre 15 et 80 heures (Franck and Thibaut 2005). La métabolisation de ces molécules se fait majoritairement dans le centre hépatique à l'aide des différentes enzymes qui composent le cytochrome P450 comme CYP 1A2, CYP 3A4 et surtout CYP 2D6 (Arbus *et al.* 2007). Les métabolites peuvent être soit conjugués (glucuronide ou sulfate) puis excrétés, soit directement excrétés dans les urines (Arbus *et al.* 2007).

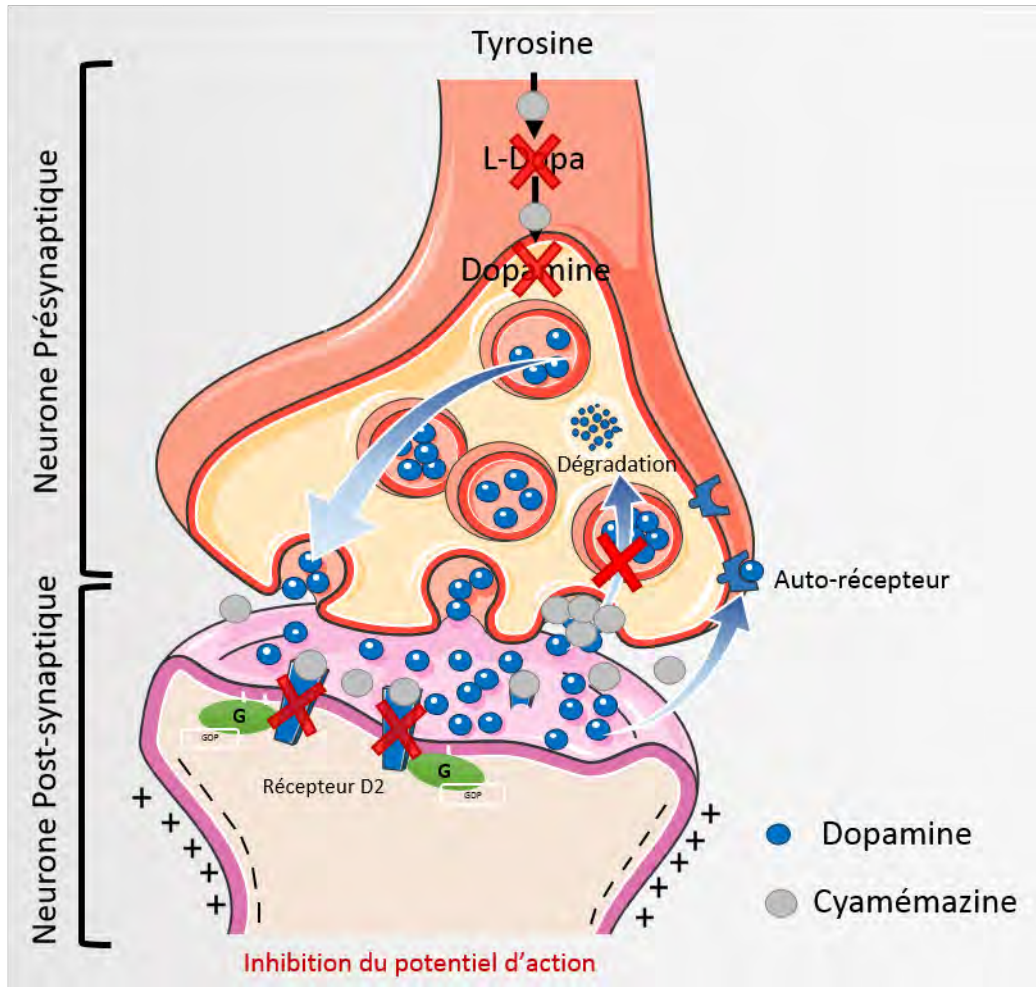


Figure 19 : Mode d'action de la cyamémazine

ii. Les effets secondaires du traitement

Les neuroleptiques présentent une affinité pour les récepteurs à l'Acétylcholine qui est à l'origine de plusieurs effets secondaires tels qu'une sécheresse de la bouche, une constipation, des troubles de l'accommodation, une rétention urinaire ou encore des troubles de l'attention voir une sédation. Les neuroleptiques ont aussi une affinité pour les récepteurs α -1-adrénrgiques et histaminergique, à l'origine d'effets secondaires comme une chute de la tension artérielle, une sédation, une perte de vigilance et une prise de poids.

iii. Toxicité de la cyamémazine

- Pathologie et concentration létale de la cyamémazine

Peu de données concernant la létalité liée à la cyamémazine sont disponibles. On peut trouver une DL_{50} de 300 mg/kg lors d'une administration orale chez la souris, de 3200 mg/kg chez le lapin et de 980 mg/kg chez le rat (Material safety data sheet, cyamemazine, Clearsynth).

- Cytotoxicité de la cyamémazine

La cyamémazine induit un effet cytotoxique sur des cultures de fibroblastes et de kératinocytes avec une DL_{50} respective de 80,8 $\mu\text{g/L}$ (0,25 μM) et 160 $\mu\text{g/L}$ (0,5 μM) selon les travaux de Morlière *et al.* (2004). Les molécules de la classe des phénothiazines peuvent induire la mort cellulaire sur une lignée de cellules hépatiques de rat (HTC cells line) selon de Faira *et al.*, (2015). De plus, une étude met en avant une altération des mitochondries de cellules de foie de rat par les phénothiazines, pouvant partiellement expliquer la cytotoxicité sur cellules hépatiques. Les travaux de Crumb *et al.* (2006) ont montré un impact de la cyamémazine sur des cellules rénales d'embryons humains (HEC 293) transfectées par le gène *hERG*. Ce gène code pour un transporteur aux ions K^+ contribuant à l'activité électrique du cœur en coordonnant les battements cardiaques. La cyamémazine diminue significativement le flux d'ions calcium à 323 $\mu\text{g/L}$ (1 μM), mais n'a pas d'impact sur les autres flux ioniques (K^+ , Na^+ , Cl^- ,...). Cette même étude a montré une inhibition du rythme cardiaque du cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) par la cyamémazine à 5 et 20 mg/Kg. La posologie habituelle chez l'Homme est comprise entre 25 et 100 mg/jour. On constate donc que la cyamémazine peut avoir un effet cytotoxique, mais aussi inhibiteur du battement cardiaque chez les vertébrés selon une posologie équivalente.

- Expression génique et activité protéique

L'étude de Cruz *et al.*, (2010), a montré que les phénothiazines sont capables de perturber le contrôle du cycle cellulaire en induisant l'expression des gènes *p21*, *Waf1* et *Cip1* sur cellules tumorales (U-87 MG) de cerveau de rat. La chlorpromazine utilisée dans cette étude pourrait induire la mort cellulaire, notamment en inhibant la voie de signalisation Akt/mTor, impliquée dans l'inhibition de l'apoptose (Cruz *et al.* 2010). Il est donc supposé que l'effet toxique sur les cellules cancéreuses est dû à une inhibition de la voie de signalisation inhibitrice de l'apoptose (Akt/mTor). Les phénothiazines telles que trifluoperazine (TFP) peuvent inhiber l'activité de certaines Serine/thréonine kinases qui sont souvent impliquées dans les cascades des voies de signalisation. La perturbation des voies de signalisation pourrait à terme perturber l'ensemble des processus cellulaires d'un organisme et donc perturber ses constantes vitales. Une autre étude portant sur la thioridazine montre une inhibition du gène codant pour la protéine signal P13K, mais aussi de l'expression des gènes de la voie de signalisation cellulaire Akt, comme l'a montré l'étude de Cruz *et al.*, (2010) (Rho *et al.* 2011). La thioridazine inhibe aussi l'expression des gènes codant pour des protéines intervenants dans la régulation du cycle cellulaire comme la cycline D1 et la CDK4 (Rho *et al.* 2011). Cette molécule induit aussi l'expression des gènes codant pour les protéines P21, P26 et P-CDC25A. Il en résulte donc un blocage du cycle cellulaire au stade G0/G1 des cellules exposées à la thioridazine. De plus, en inhibant les protéines de la voie de signalisation cellulaire Akt (inhibant l'apoptose cellulaire), elle diminue la viabilité cellulaire et induit donc l'apoptose. Il est donc souvent

décrit que les phénothiazines impactent certaines étapes du cycle cellulaire et notamment l'apoptose, ceci se traduisant par de nombreux effets cytotoxiques. De plus, les phénothiazines semblent aussi modifier certains courants ioniques comme celui du calcium, impactant alors de nombreux processus physiologiques tels que les battements cardiaques.

- Dommages à l'ADN de la cyamémazine

Les travaux d'Eriksson *et al.*, (2001) montrent que la cyamémazine a un effet potentialisateur avec la bléomycine en augmentant le nombre de cassures à l'ADN et en diminuant l'activité réparatrice des cassures simples brins de l'ADN (Eriksson *et al.* 2001) en inhibant la voie de régulation de réparation de l'ADN (Calmodulin-regulated DNA repair pathway) (Chafouleas *et al.* 1984).

e. La sertraline

i. Effet(s) thérapeutique(s) contre la ou les pathologie(s) ciblée(s)

La sertraline est une molécule commercialisée sous plusieurs noms comme Zoloft®, Sertralin®, Lustral® ou encore Asentra® et fabriquée par plusieurs laboratoires comme Pfizer ou encore Mylan. Cette molécule fait partie des antidépresseurs de la famille des psychoanaleptiques. D'un point de vue chimique, la sertraline appartient à la classe chimique des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la Sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT) (ISRS). On distingue plusieurs classes d'antidépresseurs telles que les inhibiteurs de la monoamine-oxydase (IMAO), les antidépresseurs tricycliques (ATC), les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS), les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine-noradrénaline (IRSNa), les antidépresseurs noradrénergiques et sérotoninergiques et les antidépresseurs tétracycliques. La sertraline ($C_{17}H_{17}Cl_2N$) est une molécule composée de trois cycles benzéniques. On retrouve sur ces cycles 2 atomes de chlore et une chaîne latérale (CH_3-NH) (Figure 20).

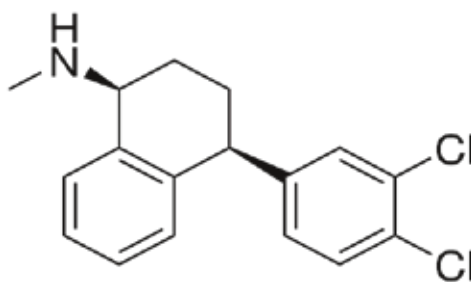


Figure 20 : Molécule de sertraline

La sertraline est un antidépresseur principalement prescrit pour soigner les troubles dépressifs majeurs, l'anxiété, les troubles obsessionnels compulsifs (TOC), les douleurs neuropathiques réfractaires, les troubles panique et la phobie sociale. La sertraline agit sur les neurones sérotoninergiques en inhibant la recapture de la sérotonine par le neurone présynaptique. La sertraline se fixe spécifiquement sur les transporteurs de hautes affinités SERT. Le transporteur SERT possède douze segments transmembranaires, chacun constitué de 25 acides aminés hydrophobes et

d'une grande boucle extracellulaire. Le transport de la 5-HT s'accompagne de la fixation et de l'entrée d'un ion Cl^- qui facilite la fixation de la 5-HT et de Na^+ qui permet la translocation de la 5-HT fixée sur SERT (Chang and Lam 1998; Rudnick 2006). Ce processus est complété par une translocation d'un ion K^+ intracellulaire vers le compartiment extracellulaire où il se dissocie du transporteur. Ce co-transport Na^+/K^+ fait intervenir une pompe Na^+/K^+ ATPase. Lorsque la sertraline bloque ce transport, la quantité de sérotonine augmente dans la synapse et rétablit un potentiel d'action (Figure 21). Cependant, une activité de recapture résiduelle de la 5-HT est maintenue par les transporteurs de faibles affinités situés sur les neurones voisins qui limite ainsi l'action de la molécule (Noradrénaline Transporteur (NAT), Dopamine Transporteur (DAT), Organic Cation Transporteur (OCT) ou Plasma Membrane Transporteur (PMAT)) ou sur les cellules gliales (OCT et transporteur "uptake 2") (Schroeter *et al.* 2000; Miner *et al.* 2000; Miner *et al.* 2003; Daws *et al.* 2006; Fuxe *et al.* 2007). Cette recapture limite ainsi l'action du médicament.

La concentration plasmatique maximale de la sertraline est atteinte entre 4,5 et 8,4 heures. La sertraline est majoritairement métabolisée dans le centre hépatique, notamment *via* le CYP3A4, le CYP2C19, le CYP2C9, le CYP2D6 et le CYP2B6 en N-desméthylsertraline et/ou en Sertraline Kétone. La sertraline peut être aussi directement conjuguée en sertraline N-carbamoyl glucuronide par une Glucuronyltransférase (Figure 22) (Obach *et al.* 2005). Ces métabolites sont ensuite excrétés majoritairement par les urines.

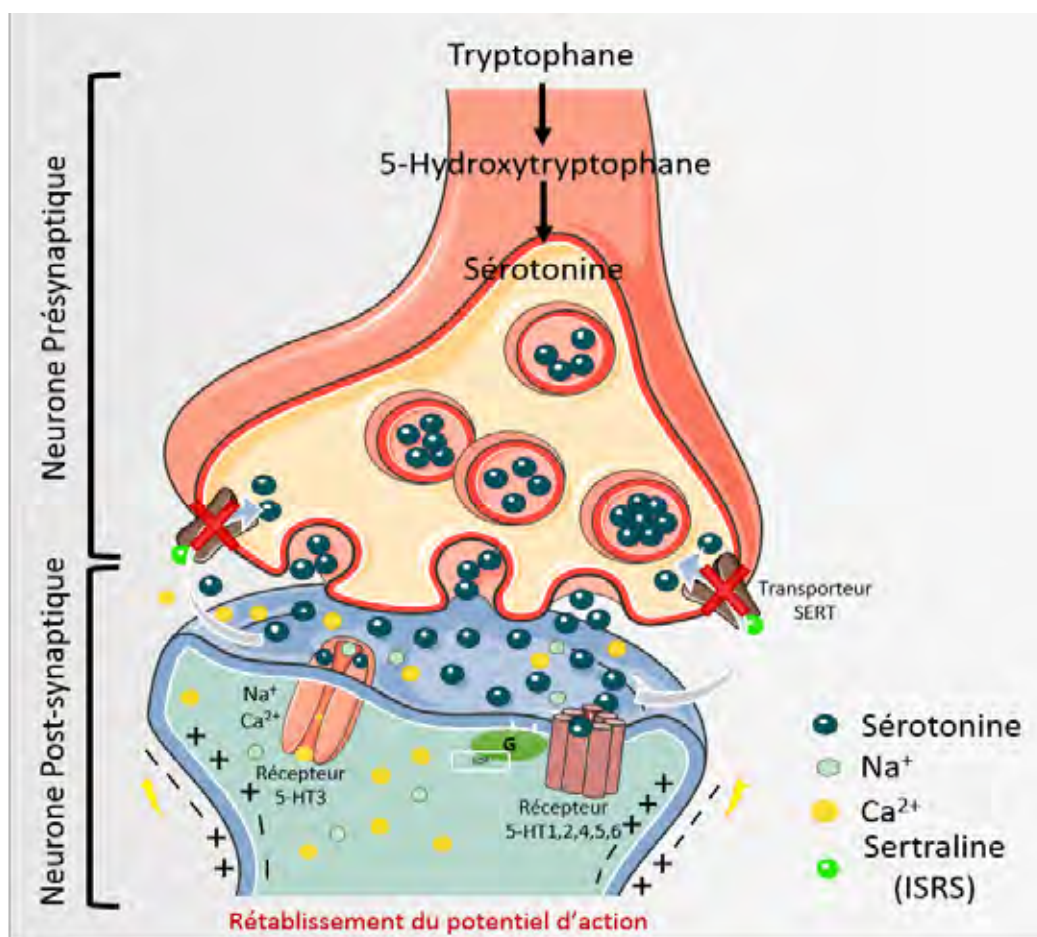


Figure 21 : Mode d'action de la sertraline

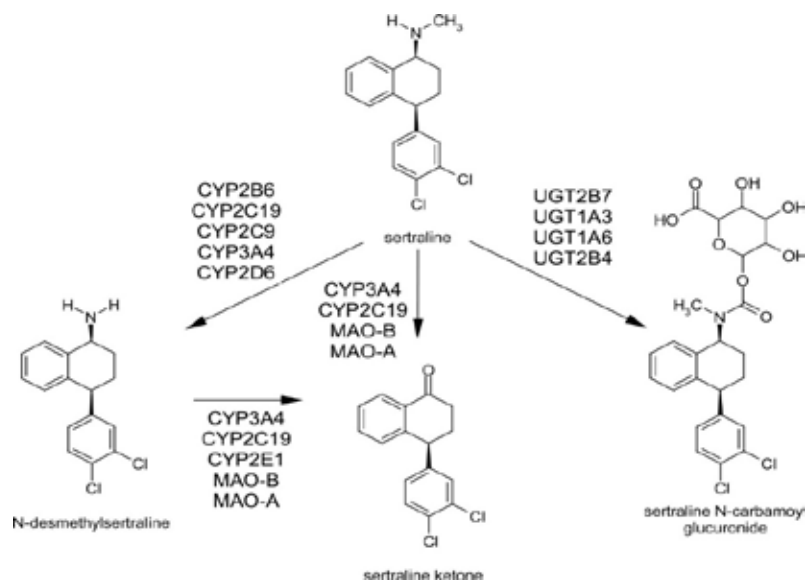


Figure 22 : Métabolisme de la sertraline

ii. Les effets secondaires du traitement

Le traitement à la sertraline peut provoquer des somnolences, insomnies, étourdissements, nervosités, fatigues, maux de tête, convulsion, cauchemars, confusion, hallucination, euphorie, bâillements, contractions musculaires involontaires. Il peut aussi engendrer une modification de la tonicité musculaire et de la régulation des mouvements involontaires et automatiques (tremblement, dyskinésie, hyperkinésie, hypertonie, hypotonie), une augmentation de l'appétit, des nausées, vomissements, diarrhées, constipation et sécheresse de la bouche. D'autres effets secondaires comme des démangeaisons, éruptions cutanées, crises d'urticaires, œdèmes de Quincke ou des réactions anaphylactiques peuvent être provoqués par la sertraline. On peut aussi observer une perte ou prise de poids, parfois importante, l'accélération du rythme cardiaque, des rares cas d'élévation ou diminution de la tension artérielle, un trouble de la vue, un trouble auditif, vestibulaire ou encore des acouphènes. Des troubles sexuels comme la diminution de la libido et des troubles de l'orgasme, des troubles de l'érection et de l'éjaculation peuvent faire partie des effets secondaires du médicament. De rares cas d'ecchymoses, d'hémorragies gynécologiques, de saignement gastro-intestinaux ou autres saignements cutanéomuqueux ont été signalés.

De plus, cette molécule a été incriminée dans plusieurs pays dans des cas de crimes, souvent commis sur des proches, par des patients sous sertraline, non connus pour leur violence. La prise de sertraline est statistiquement associée à une multiplication par plus de 6 des actes de violence.

iii. Toxicité de la sertraline

- Pathologie et concentration létale de la sertraline

La sertraline présente une toxicité aiguë chez la souris avec une DL₅₀ comprise entre 419 et 548 mg/kg (administration orale) et une DL₅₀ chez le rat comprise entre 1327 et 1591 mg/kg (administration orale) (Material safety data sheet, Sertraline hydrochloride, Pfizer). La sertraline présente des effets sur le rat et le chien avec une LOAEL de 80 mg/kg/jour lors une exposition à long terme (3 mois) impactant principalement le foie (Material safety data sheet, Sertraline hydrochloride, Pfizer). Par voie orale, cette molécule présente aussi un impact sur le développement postnatal du rat par prise orale avec une LOAEL de 20 mg/kg/jour, sur la fertilité avec une LOAEL de 80 mg/kg/jour, mais pas d'effet tératogène (NAOEL = 80 mg/kg/jour) (Material safety data sheet, Sertraline hydrochloride, Pfizer). Cette molécule n'a pas montré d'effet carcinogène sur le rat (NOAEL = 40 mg/kg/jour), cependant un tel effet est observé chez la souris pour une LOAEL de 40 mg/kg/jour, avec des tumeurs bénignes dans le foie et les poumons (Material safety data sheet, Sertraline hydrochloride, Pfizer).

- Cytotoxicité de la sertraline

L'étude de Yeh *et al.* (2015) a montré que la sertraline est cytotoxique pour des cellules de l'épithélium cornéen de lapin (SIRC cells), de manière concentration dépendante. L'étude de Minguez *et al.* (2014) démontre que la sertraline cause des dommages aux membranes cellulaires *via* les tests MTT et LMS (CE₅₀ respectives de 4,40 et 0,74 mg/L). La sertraline comparée à 7 autres ISRS apparaît comme la plus cytotoxique de cette étude. Une étude de cytotoxicité de la sertraline a été menée sur des lignées cellulaires de gonade de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (RTG-2) et de *Fundulus notatus* (PLHC-1) par l'équipe de Minagh *et al.* (2008, 2009). Après 96 h d'exposition à la sertraline, la concentration efficace à 50 % (CE₅₀) pour la lignée RTG-2 est de 4,0 mg/L et pour la lignée PLHC-1, la CE₅₀ est de 3,7 mg/L). Ces résultats suggèrent qu'une bioaccumulation de la sertraline dans le plasma de ces poissons au-delà de 4,0 mg/L, pourrait perturber le développement et le fonctionnement des gonades et donc la reproduction.

- Expression génique et activité protéique

L'étude d'Uno *et al.*, (2016) montre que la sertraline inhibe la contraction des muscles lisses de vessie de cochon d'Inde induite par l'Acétylcholine (Uno *et al.* 2016). L'étude de Yeh *et al.* (2015) montre aussi que la sertraline bloque l'entrée de Ca²⁺ par l'inhibition des canaux Ca²⁺ voltage dépendant de type L (Long-Lasting) de myocytes. L'étude de Baharav *et al.* (2012) montre que la sertraline a un effet immunomodulateur sur splénocytes (leucocyte indifférencié) de rat en inhibant la sécrétion de TNF-α. Une administration orale de la sertraline chez le rat provoque une inhibition de l'expression du gène *cox-2* codant pour une enzyme, la cyclo-oxygénase 2, dont la fonction est

centrale dans le processus de synthèse de prostaglandines. Cela montre donc que la sertraline peut avoir un rôle immunomodulateur chez le rat (Baharav *et al.* 2012).

III. La toxicité environnementale des médicaments psychotropes

À ce jour, il n'existe pas de méthode ou de protocole exclusif permettant d'évaluer la qualité de l'environnement. Ainsi, il est nécessaire d'associer plusieurs approches afin d'évaluer de façon précise l'état d'un écosystème. Comme le propose le schéma adapté d'Amiard (1994) présenté sur la figure 23, c'est la mesure du maximum de paramètres biologiques et physico-chimiques qui permet d'obtenir une évaluation de l'état de l'environnement. L'évaluation de la toxicité de molécules dans l'environnement peut donc se faire à différents niveaux : au niveau des communautés en utilisant des indices de diversité tels que l'indice de Shannon se basant sur la richesse spécifique et sur l'abondance au sein de chaque espèce, l'IBGN, l'indice diatomées, l'indice poissons... Ces indices (IBGN, diatomées, poissons) sont basés sur la présence ou l'absence d'espèces bioindicatrices et tient donc compte de la sensibilité des espèces vis-à-vis des polluants. Au niveau individuel, c'est l'utilisation de biomarqueurs qui peut renseigner sur la pénétration d'un xénobiotique dans un organisme et de ses effets.

A côté des biomarqueurs, la toxicité sur organismes peut s'évaluer en utilisant des biotests normalisés.

L'utilisation d'une batterie de bioessais permet d'obtenir une information diversifiée de l'impact d'un contaminant sur l'environnement.

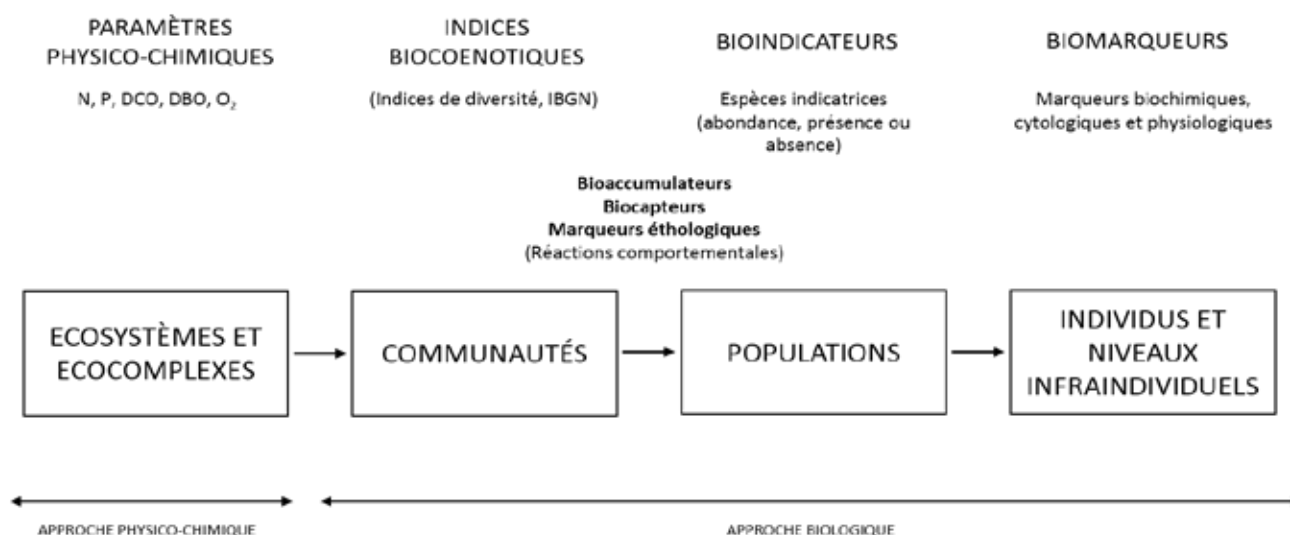


Figure 23 : Schéma des différents types de paramètres mesurables à différents niveaux d'organisation biologique. (D'après Amiard, 1994)

a. Toxicité environnementale des 4 psychotropes d'intérêts

Les données bibliographiques varient énormément d'une molécule à l'autre. Ainsi, pour la carbamazépine, de très nombreuses références permettent de renseigner sa toxicité, tandis que pour des molécules consommées localement comme la cyamémazine, uniquement consommée en Europe, très peu d'études permettent d'appréhender sa toxicité. En effet, on peut recenser environ 15 700 références pubmed relatives à la carbamazépine, 4 300 relatives à la sertraline, 1 800 relatives à l'oxazépam et seulement 80 citant la cyamémazine. On constate donc qu'il est plus aisé de trouver des informations relatives à l'occurrence ou encore à la toxicité de la carbamazépine que d'en trouver pour la cyamémazine.

i. L'oxazépam

- La bioaccumulation de la carbamazépine

Une étude de Gust *et al.* (2014) démontre la capacité de bioaccumulation de l'oxazépam par un mollusque d'eau douce, le *Potamopyrgus antipodarum*. Exposé 42 jours à l'oxazépam, Gust *et al.* ont retrouvé 2,6 µg d'oxazépam par gramme de poids frais. En ce sens, l'équipe de Huerta *et al.* (2016) a étudié la bioconcentration de l'oxazépam dans différents compartiments du poisson *Pimephales promelas* (*P. promelas*) exposés à différentes concentrations d'oxazépam. Il résulte de cette étude que les facteurs de bioconcentration les plus forts sont obtenus par l'exposition de ce poisson à la plus faible concentration de l'étude, 0,8 µg/L. Chez la perche commune, *Perca fluviatilis*, c'est dans le foie que la bioconcentration de l'oxazépam est la plus importante avec un facteur de 20 pour une exposition à 0,8 µg/L (Brodin *et al.* 2013).

- Effets de la carbamazépine sur le comportement des organismes

L'étude de Brodin *et al.* (2013) montre un impact négatif de l'oxazépam sur l'alimentation et le comportement du poisson *Perca fluviatilis* (Brodin *et al.* 2013). L'étude de Chiffre *et al.* (2016) montre une stimulation de la vitesse de déplacement du poisson medaka par l'oxazépam à 10 mg/L et une inhibition de la vitesse de déplacement à 10 et 100 µg/L. Cette même étude propose une CL₅₀ supérieure à 10 mg/L et une LOEC à 10 µg/L (Chiffre *et al.* 2016). D'autre part, l'étude de Chiffre *et al.* (2016) montre aussi une inhibition de la distance parcourue des larves de poissons médaka exposées à 10 mg/L d'oxazépam. Cependant, à 10 et 100 µg/L, l'oxazépam entraîne une hausse de la distance parcourue. Une étude contradictoire de Brodin *et al.* (2013) montre que l'exposition de la perche commune (*Perca fluviatilis*) à de faibles concentrations d'oxazépam (1,8 µg/L), augmente son activité, mais sa sociabilité, très développée chez cette espèce, est diminuée. Cependant, cette même étude montre que l'exposition de *P. fluviatilis* à une solution d'oxazépam à 910 µg/L augmente l'activité du poisson, sa sociabilité et le rend plus audacieux. Par ailleurs, cette étude montre que les fortes ou faibles concentrations d'oxazépam abaissent la vitesse de prise alimentaire.

Le poisson exposé à l'oxazépam met plus de temps que le poisson témoin pour manger la même quantité de nourriture. De plus, cette étude montre une inhibition significative du déplacement pour une exposition à 4,7 µg/L d'oxazépam.

- Effets de l'oxazépam sur le système nerveux

Les travaux de Gagné *et al.* (2010) ont étudié les modes d'action du diazépam (benzodiazépine très proche structurellement de l'oxazépam), sur une moule d'eau douce, *Elliptio complanata*. Il en résulte que le diazépam diminue les taux de sérotonine dans l'organisme, induit une augmentation du taux de glutamate, mais n'a aucun effet sur le système dopaminergique et sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Cependant, le diazépam induit une augmentation de l'activité de la dopamine adénylate-cyclase et des concentrations en glutamate.

- ii. La carbamazépine

La toxicité de la carbamazépine a été évaluée au travers de multiples études sur de nombreux organismes modèles et non-modèles.

- La bioaccumulation de la carbamazépine

Les travaux de Gust *et al.* (2014) ont montré une bioaccumulation de la carbamazépine dans les tissus du mollusque *Potamopyrgus antipodarum* à hauteur de 1,1 ng/g de poids frais. L'étude de Vernouillet *et al.* (2010) a mis en évidence une bioaccumulation de la carbamazépine différente en fonction des organismes étudiés. C'est ainsi que l'algue verte *P. subcapitata* présente un facteur de bioaccumulation de 12,6 alors qu'il est de 2,2 pour le crustacé d'eau douce *T. platyurus* et qu'il est nul pour l'hydre *Hydra attenuata* (Vernouillet *et al.* 2010). Ces résultats suggèrent que la carbamazépine peut être bioaccumulée par les organismes qui y sont exposés, mais quels seront les effets de cette bioaccumulation sur les organismes ?

- Effets létaux de la carbamazépine

Les études de Im Park *et al.* (2005) et de Thacker *et al.* (2005) ont évalué l'impact de la carbamazépine sur *Daphnia magna* et obtiennent une CL₅₀ respective de 138 et de 17,2 mg/L. Cet effet léthal a aussi été observé sur un moustique, *Culicoides impunctatus* au cours de l'étude de Thacker (2005) et sur un crustacé d'eau douce, *Thamnocephalus platyurus* au cours de l'étude de Kim *et al.* (2009). Les résultats de ces études proposent une CL₅₀ respective de 34,4 et de plus de 100 mg/L. Des tests de létalité de la carbamazépine ont été réalisés sur des vertébrés aquatiques tels que *Oryzias latipes* qui présente une CL₅₀ allant 35,4 à 45,87 mg/L (Kim *et al.* 2007; Kim *et al.* 2009) ou encore le *Danio rerio* avec une LOEC à 50 mg/L (Ferrari *et al.* 2003). On constate donc que la carbamazépine a un effet léthal pour des concentrations variant de quelques dizaines de mg/L à la centaine de mg/L chez les vertébrés comme chez les invertébrés.

- Effets de la carbamazépine sur le comportement des organismes

Plusieurs études ont été menées sur la mobilité de *D. magna* et de *C. dubia* en présence de carbamazépine. Il résulte qu'une exposition de 48 h à la carbamazépine immobilise 50 % (CE₅₀) des organismes *D. magna* exposés à plus de 100 mg/L (Cleuvers 2003). L'étude Ferrari *et al.* (2003) propose une CE₅₀ de la carbamazépine sur *D. magna* supérieur à 13,8 mg/L et sur *C. dubia* à 77,7 mg/L. Étonnamment, on constate des divergences dans la littérature avec des valeurs de CE₅₀ différentes d'un facteur 10 sur l'organisme *D. magna* (Ferrari *et al.* 2003). Cependant, pour ces deux études on ne dispose pas de la valeur exacte de la CE₅₀ de la carbamazépine, probablement à cause de l'intervalle de concentration trop restreint choisi pour ces études. L'étude de Nassef *et al.*, (2010) a montré que la carbamazépine diminue la vitesse de déplacement et augmente le temps de recherche alimentaire du poisson *O. latipes* à 6,15 mg/L. Ces résultats suggèrent que la carbamazépine peut inhiber le déplacement de certains organismes aquatiques. Cependant, ces études n'ont pas analysé les fonctions impactées conduisant à l'inhibition de la mobilité. Une diminution du déplacement pourrait impacter les réserves énergétiques de l'animal en diminuant les chances de l'animal à trouver un aliment. De plus, l'inhibition de la mobilité pourrait impacter les fonctions reproductrices (pour une reproduction sexuée) des organismes en diminuant le taux de rencontre entre les organismes de chaque sexe.

- Effets de la carbamazépine sur la reproduction, le développement et la croissance des organismes

L'étude d'Oropesa *et al.* (2016) a observé un impact transgénérationnel de la carbamazépine sur *D. magna*. En effet, la carbamazépine ne présente pas d'effet direct sur le développement embryonnaire, mais présente un effet sur le développement embryonnaire d'œufs provenant d'une mère exposée à la carbamazépine. Les générations F1 provenant d'une femelle exposée à la carbamazépine présentent des altérations de l'embryogenèse avec un blocage du développement au stade gastrula, ou encore un impact sur l'organogenèse avec l'absence de torsion du manteau. Des études similaires menées sur le développement embryonnaire d'autres organismes montrent que la carbamazépine peut impacter le système reproducteur et la fécondité du *Danio rerio* dès 0,5 et 10 µg/L (Lamichhane *et al.* 2013; Galus *et al.* 2014) ou encore une altération des gonades avec une baisse de la kétotestostérone chez le *D. rerio*, suggérant une modification des taux d'hormones sexuelles (Galus *et al.* 2013).

De nombreuses études d'inhibition de la croissance ont été menées sur des plantes et des algues vertes. Les travaux de Cleuvers *et al.* (2003) ayant exposé l'algue verte *Desmodesmus subcapitatus* et la lentille d'eau *Lemna minor* à la carbamazépine proposent une CI₅₀ respective de 74 et 25,5 mg/L (Cleuvers 2003). D'autres études d'inhibition de croissance d'algues vertes par la carbamazépine ont été menées par Zhang *et al.* (2012) qui ont travaillé sur *Chlorella pyrenoidosa* et *Scenedesmus obliquus*. Ils ont obtenu des CI₅₀ respectives de 239,8 et de 73 mg/L. Les travaux de

Ferrari *et al.* (2003) ainsi que de Delorenzo et Flemming (2008) ont évalué la toxicité de la carbamazépine sur *Pseudokirshneriella subcapitata* et sur *Dunaliella tertiolecta*, deux algues vertes, et ont obtenu respectivement une LOEC à plus de 100 mg/L et une Cl_{50} à plus de 80 µg/L mettant en évidence une sensibilité différente des organismes (Ferrari *et al.* 2003; DeLorenzo and Fleming 2008).

- Métabolisation et effets oxydants de la carbamazépine

La carbamazépine induit une augmentation de l'activité de la GST dans les gonades résultant de la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), et de l'activité EROD dans les glandes digestives de la moule verte *Perna viridis*, (Juhel *et al.* 2016). L'étude de Chen *et al.* (2014) a montré que la carbamazépine pouvait inhiber les activités SOD (Superoxyde dismutase) et GR (Glutathion Réductase) chez le mollusque bivalve *Corbicula fluminea*, mais aussi augmenter les activités CAT et MDA. L'étude de Vernouillet *et al.* (2010) a analysé l'impact de la carbamazépine sur l'activité du système de détoxification chez le crustacé *T. platyurus* et montre que les fonctions HO et GST sont augmentées alors que l'activité des CYP3A et la peroxydation des lipides sont inhibées. L'étude de Zhang *et al.* (2012) a montré que la carbamazépine induit une augmentation de l'activité CAT et SOD chez les algues *S. obliquus* et *C. pyrenoidosa*. Une autre étude d'effet de la carbamazépine sur le collembole *Folsomia candida* montre une inhibition de la GST (Oliveira *et al.* 2015). Les travaux d'Almeida *et al.* (2014) montre que la carbamazépine induit une augmentation de l'activité de la GST, GR, SOD et du CYP3A4 et inhibe la peroxydation des lipides.

- Effets de la carbamazépine sur le système nerveux

Juhel *et al.*, (2016) ont montré que la carbamazépine inhibe l'activité de l'AchE dans l'hémolymphe de la moule verte.

- Autres effets de la carbamazépine

Les travaux de Juhel *et al.* (2016) sur la moule verte (*Perna viridis*) reportent que la carbamazépine n'a pas d'effet significatif sur la mortalité des hémocytes de moule verte et ne crée pas de dommage à l'ADN (Juhel *et al.* 2016). Par ailleurs, les travaux de Franzellitti *et al.* (2016) montrent que la carbamazépine impacte le système de résistance aux xénobiotiques et aux médicaments (MXR, Multixénobiotique résistance et MDR, Multidrug resistance-related protein) chez la moule (Franzellitti *et al.* 2016). Il résulte que la carbamazépine inhibe le gène codant pour l'ABCC transporteur, le MDR et induit l'expression du gène codant pour l'ABCB transporteur, le MXR.

iii. La cyamémazine

- Effets de la cyamémazine sur le comportement

La cyamémazine inhibe la vitesse de déplacement du poisson *O. latipes* et présente une CL_{50} de 1,22 mg/L (test de létalité à 72 h) (Chiffre *et al.* 2016). Par ailleurs, les travaux de Chiffre *et al.*,

(2016) ont mis en avant un impact de la cyamémazine à 1220 µg/L sur la vitesse de déplacement et sur la distance parcourue par des larves de poissons médaka (*O. latipes*).

iv. La sertraline

- Effets létaux de la sertraline

La toxicité de la sertraline a été évaluée par des tests de létalité à 24 et 48h d'exposition sur différents organismes comme *Thamnocephalus platyurus* (*T. platyurus*) qui présente une CL₅₀ à 24h de 600 µg/L (Minagh 2008), sur *Cerodaphnia dubia* (*C. dubia*) avec une CL₅₀ à 48h de 120 mg/L menée par Henry *et al.* (2004), sur *Brachionus plicatilis* (*B. plicatilis*) avec une CL₅₀ de 510,5 µg/L à 24h et de 317,2 µg/L à 48h et sur *Amphibalanus amphitrite* (*A. amphitrite*) avec une CL₅₀ de 353,5 µg/L à 24h et de 305,8 µg/L à 48h menée par Estévez-Calvar *et al.*, (2016). Une étude de létalité a été aussi menée par Chiffre *et al.*, (2016) sur le poisson *Orizias latipes* (*O. latipes*). La mortalité des larves d'*O. latipes* est significative dès 1 mg/L (Chiffre *et al.* 2016). Ces résultats suggèrent que la sertraline peut induire la mortalité d'organismes aquatiques à des concentrations variant de 300 µg/L à plus de 100 mg/L. De plus, parmi ces études on constate que les organismes les plus sensibles à la sertraline sont les poissons.

- Effets de la sertraline sur le comportement des organismes

L'étude de Minagh *et al.* (2008) montre que la sertraline impacte la mobilité de *Daphnia magna* (*D. magna*) après 48h d'exposition, avec une CE₅₀ de 1,3 mg/L. Ces résultats sont confirmés par l'étude de Minguez *et al.* (2014) qui propose une CE₅₀ de 1,15 mg/L après 48h d'exposition de *D. magna* à la sertraline. L'étude d'Estévez-Calvar *et al.* (2016) a évalué la toxicité de la sertraline sur la mobilité de larves de poissons *B. plicatilis* et *A. amphitrite*. Il en résulte deux CE₅₀ respectives après 24h d'exposition de 406,5 et 183,2 µg/L, puis de 290,6 et 115,2 µg/L après 48h d'exposition. Les travaux d'Estévez-Calvar *et al.* (2016) ont mis en avant une altération de la nage des larves de poissons (*A. amphitrite* et *B. plicatilis*) exposés à la sertraline, tout comme les travaux de Chiffre *et al.* (2016) qui montrent une diminution de la vitesse de nage des larves d'*O. latipes* pour les concentrations 10, 100 et 1000 µg/L. L'étude de Bossus *et al.* (2014) a montré que la sertraline augmente la vitesse de nage du gammare *Echinogammarus marinus* (*E. marinus*) à toutes les concentrations testées (de 0,001 µg/L à 1 µg/L). Xie *et al.* (2015) ont montré que la sertraline impacte la nage du poisson *Carassius auratus*. La sertraline semble augmenter la mobilité après 7 jours d'exposition à la sertraline. Ces résultats sont en contradiction avec les études précédentes. Cependant, des résultats similaires ont été observés par une exposition du crabe sauvage (*Carcinus maenas*) à la fluoxétine, une autre molécule de la famille des ISRS menée par Mesquita *et al.* (2011). Une augmentation de la mobilité va impacter directement les réserves énergétiques de l'animal et augmenter les risques de prédation. La chute des réserves énergétiques va directement affecter la

croissance et la reproduction des individus exposés à un ISRS, et donc perturber la fitness de la population.

- Effets de la sertraline sur la reproduction, le développement et la croissance des organismes

Des tests d'inhibition de la croissance après 96 h d'exposition à la sertraline ont été réalisés sur des végétaux aquatiques tels que *Pseudokirchneriella subcapitata* (*P. subcapitata*), *Schoenoplectus acutus* (*S. acutus*), *Scenedesmus quadricauda* (*S. quadricauda*) et *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) par Johnson *et al.* (2007). Les résultats de cette étude montrent une certaine disparité dans les valeurs de CI_{50} obtenues. Respectivement, les CI_{50} sont de 12,10 ; 98,94 ; 317,02 et de 763,66 $\mu\text{g/L}$. On constate que certaines espèces comme *P. subcapitata* sont plus sensibles à la sertraline que des espèces comme *S. quadricauda* ou *C. vulgaris*. La toxicité de la sertraline a aussi été évaluée sur le développement embryonnaire de différents organismes comme le Xénope ou encore sur l'huître. Les études de Minguez *et al.* (2014) et de Poi *et al.* (2013) ont montré que la sertraline impacte le développement embryonnaire de l'huître *Crassostrea gigas* (*C. gigas*) et proposent une CE_{50} de 67 $\mu\text{g/L}$. L'étude d'Estèvez-Calvar *et al.* (2016) a évalué l'impact de la sertraline sur le développement embryonnaire de la moule *Mytilus galloprovincialis* (*M. galloprovincialis*) et propose une CE_{50} de 206,8 $\mu\text{g/L}$. Les travaux de Richards et Cole (2006) ont évalué l'impact de la sertraline sur le développement embryonnaire de *Xenopus laevis* (*X. laevis*) avec une CE_{50} de 4,6 mg/L . En ce sens, l'étude métabolique de Campos *et al.* (2013) montre que les ISRS impactent l'expression de nombreux gènes intervenant dans la morphogenèse, dans la différenciation des tissus ou encore dans la reproduction de *D. magna*.

- Effets oxydants de la sertraline

Les travaux de Xie *et al.* (2015) ont montré que la sertraline induit une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathionne peroxydase (GPx) et de la glutathionne-S-transférase (GST) dans le foie de *C. auratus*.

- Effets de la sertraline sur le système nerveux

La sertraline induit aussi une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) dans le cerveau de *C. auratus* (Xie *et al.* 2015). L'étude de Bossus *et al.* (2014) a aussi évalué l'impact de la sertraline sur le transcriptome du gammare *E. marinus*. Les résultats montrent qu'une exposition à la sertraline à plus de 0,01 $\mu\text{g/L}$ inhibe l'expression de gènes codant une Neurocan core protéine, une Rhodopsine, une Arrestine. Ces gènes sont impliqués dans les processus de transduction du signal.

IV. Les modèles biologiques de notre étude

Nous avons choisi d'étudier deux organismes représentant deux niveaux trophiques différents dans les cours d'eau français. Le premier est un mollusque d'eau douce le *Radix balthica* (*R. balthica*), un consommateur primaire et le second est un consommateur secondaire, le plathelminthe *Schmidtea polychroa* (*S. polychroa*).

Les mollusques d'eau douce tels que la *Lymnaea stagnalis* et *Dreissena polymorpha* sont fréquemment utilisés pour évaluer la toxicité d'une molécule (Bandow and Weltje 2012; Bouétard *et al.* 2012; Polese *et al.* 2014; Kaur *et al.* 2016; Moreno-González *et al.* 2016; Atli and Grosell 2016; Hart *et al.* 2016; Charles *et al.* 2016; Reátegui-Zirena *et al.* 2016). L'utilisation de gastéropodes de la famille des *Lymnaeidae* tels que le *Radix balthica* ou la *Lymnaea stagnalis* présente l'avantage d'avoir accès aux stades précoces du développement embryonnaire (dès le stade 2 cellules). Ces gastéropodes sont faciles à collecter et le maintien de l'élevage représente un faible coût. Le *Radix balthica* fait partie des espèces les moins sensibles aux pollutions biodégradables selon l'échelle de Mouthon (2001). L'utilisation du *R. balthica* dans notre étude a permis d'apporter de nouvelles données transcriptomiques et toxicologiques sur un mollusque peu étudié, dans le but d'élargir la liste des espèces à utiliser en écotoxicologie.

Les planaires d'eau douce sont des invertébrés qui jouent un rôle important dans la chaîne alimentaire en tant que prédateur. Ces organismes présentent de multiples intérêts faisant d'eux des organismes modèles. Ils sont faciles à collecter et à maintenir en laboratoire à faible coût (Li 2013a; Li 2013b; Knakiewicz 2014). Plusieurs études de toxicité utilisent les planaires *Dugesia japonica* ou encore *Schmidtea mediterranea* (Li 2013a; Li 2013b; Knakiewicz 2014; Ofoegbu *et al.* 2016). Il a été suggéré que les planaires d'eau douce constituent des indicateurs pour estimer la qualité de l'eau (Kenk 1974a; Kenk 1974b) du fait de leur sensibilité aux faibles concentrations de toxines environnementales (Nano *et al.* 2002; Rodríguez-Esteban *et al.* 2015). L'utilisation de la planaire *S. polychroa* dans notre étude permettra d'apporter de nouvelles informations qui faciliteront les études ultérieures portant sur cet organisme.

a. L'organisme modèle *Radix balthica*

i. Systématique, répartition et écologie

La systématique du *Radix balthica* (*R. balthica*) est présentée dans le tableau suivant (Tableau 6).

Tableau 6: Systématique de l'espèce non modèle *R. balthica*

Règne	Animal
Embranchement	Mollusques
Classe	Gastéropodes
Ordre	Pulmonés
Sous-ordre	Basommatophores
Famille	Lymnaeidae
Genre	<i>Radix</i>
Espèce	<i>balthica</i> (Linnaeus, 1758)

Parmi l'ordre des Basommatophores, la famille des Lymnaeidae comporte 21 genres (selon NCBI Taxonomy Browser, 09 Juillet 2016) dont le genre *Radix* constitué de 14 espèces (selon NCBI Taxonomy Browser, 09 Juillet 2016) comprenant l'espèce *balthica*. D'un point de vue plus phylogénétique, le *Radix balthica* fait partie des Eukaryota, Metazoa, Lophotrochozoa, Mollusca, Gastropoda, Heterobranchia, Euthyneura, Panpulmonata, Hygrophila, Lymnaeoidea, Lymnaeidae, Radix.

Le genre *Radix* (Montfort 1810) est un groupe de la famille des Lymnaeidae (Basommatophora). Il a une distribution paléarctique, cependant les travaux de Remigio (2002) montrent un statut paraphylétique avec les espèces européennes d'un côté et les espèces asiatiques de l'autre. On trouve au Nord-Est de l'Europe à ce jour cinq espèces, *Radix ampla*, *R. auricularia*, *R. balthica*, *R. labiata* et *R. lagotis* (Pfenninger *et al.* 2006; Feldmeyer *et al.* 2011; Schniebs *et al.* 2011; Tills *et al.* 2013). Le *R. auricularia*, le *R. labiata* et le *R. balthica* sont présents aussi dans le Nord-Ouest de l'Europe et en France (Feldmeyer *et al.* 2011; Schniebs *et al.* 2011; Schniebs *et al.* 2013). La détermination basée sur les critères morphologiques du manteau est difficile et non spécifique, il est souvent conseillé de compléter cette orientation par une analyse anatomique et/ou génomique. Puisque nous avons réalisé le séquençage du transcriptome du mollusque utilisé dans notre étude, nous avons pu utiliser la séquence de l'ARN 18S et du gène *cox 1* pour identifier le *Radix balthica* (appelé aussi *Radix peregra* ou *Radix ovata* (Kruglov and Starobogatov 1983)).

L'espèce *Radix blathica* est donc une espèce dulçaquicole largement répandue en Europe (Figure 24) (de Jong *et al.* 2014). Lawton *et al.*, (2015) et Pfenninger *et al.*, (2006) ont montré l'existence de plusieurs sous-espèces réparties en fonction de leur situation géographique en se basant sur la séquence nucléique du gène *cox1* de la sous-unité 1 du Cytochrome oxydase C.

Le *R. balthica* affectionne les milieux benthiques, riches en éléments nutritifs (algues, végétaux aquatiques, matière organique). Il se nourrit essentiellement de macrophytes vivants et de périphyton faisant de lui un brouteur. Ce mollusque participe donc à la stabilisation du

développement de la couverture algale et favorise ainsi l'incidence de la lumière sur les fonds et donc la fabrication d'oxygène et la présence de nutriments dans le milieu (Coeurdassier *et al.* 2004). Le *R. balthica* est donc un consommateur primaire pouvant devenir aussi une proie très appréciée des poissons et écrevisses. De ce fait, il constitue un élément non négligeable de la chaîne alimentaire.



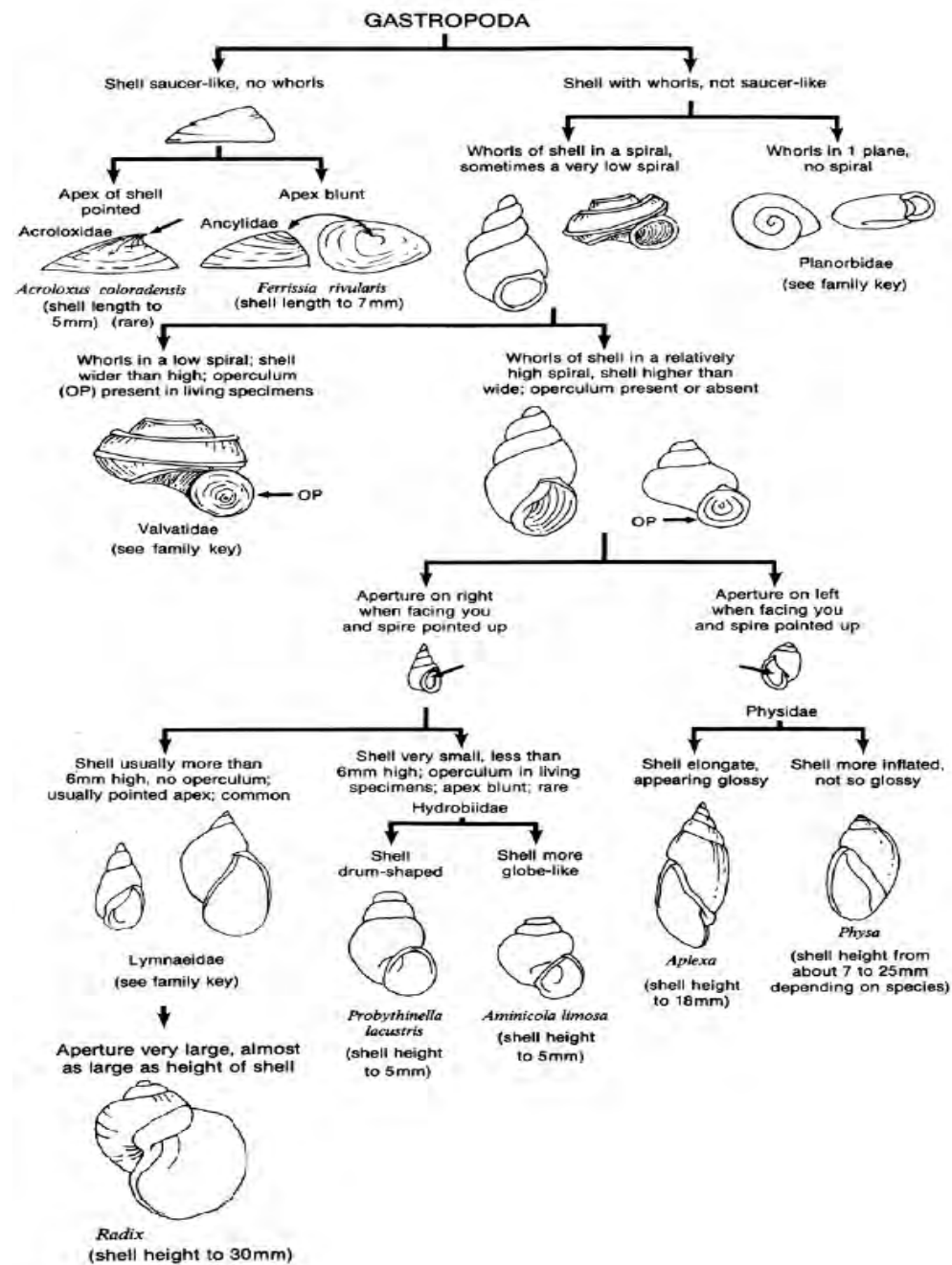
Figure 24 : Distribution de *R. balthica* (Adapté de Fauna Europea et Pongratz 2003)

ii. Morphologie et clé de détermination

Le *R. balthica* est un mollusque d'eau douce pulmoné à coquille dure. Ces yeux sont situés à la base de chacune des deux tentacules contractiles situées sur la tête de l'animale, le plaçant dans le sous-ordre des Basomatophores. Il se nourrit grâce à la présence d'une radula (langue râpeuse) présente sur la face ventrale de la bouche constituée essentiellement de muscles servant à la locomotion.

Chez le *R. balthica*, on parle d'une coquille dextre, car l'enroulement, vu du pôle apical (ou apex), a lieu dans le sens horaire. La coquille comporte plusieurs tours de spire séparés par des sutures. L'ouverture ou péristome est bordé par une lèvre appelée aussi labre.

La clé de détermination proposée figure 25, permet d'identifier la famille Lymnaeidae selon les caractères morphologiques de la coquille et la présence ou non d'un opercule. Par la suite, la détermination du genre est réalisée toujours selon la morphologie de la coquille, de son enroulement et de la taille de l'ouverture (Figure 25).

Figure 25 : Clé de détermination du genre *Radix*

iii. Cycle de reproduction et développement

Le *R. balthica*, comme la plupart des Lymnaeidae a un cycle de vie qui s'étend sur une période d'un à deux ans en fonction des conditions environnementales. En effet, la température, la qualité de l'eau et l'abondance alimentaire conditionnent son espérance de vie et son succès reproducteur (Wayne 2001). La reproduction est aussi conditionnée par la photopériode et la présence de parasites (Joosse 1984; de Jong-Brink 1992). Généralement, les longues journées ensoleillées ainsi qu'une eau claire et oxygénée stimulent les fonctions reproductives du mollusque alors que les faibles températures et les journées à courte photopériode inhibent la reproduction, tout comme la

présence de parasites (Wayne 2001). Le *R. balthica* est une espèce hermaphrodite simultanée qui se reproduit préférentiellement par allofécondation. En condition de stress, la reproduction devient majoritairement asexuée (Coutellec and Lagadic 2006). La famille des Lymnaeidae reste majoritairement sous le sexe femelle, car c'est celui-ci qui nécessite le moins d'énergie (Koene and Ter Maat 2005). Durant l'accouplement, chaque individu joue le rôle du mâle puis de la femelle afin de remplir mutuellement la spermathèque. Les lymnées sont sexuellement matures dès la taille de 20 à 30 mm. La reproduction du *R. balthica* a lieu du printemps à l'automne avec un pic au printemps et parfois un deuxième pic à l'automne lorsque les conditions sont favorables. Les pontes de *R. balthica* sont des masses gélatineuses enfermant 50 à 150 œufs accrochées sur le substrat (cailloux ou végétation) (Figure 26).

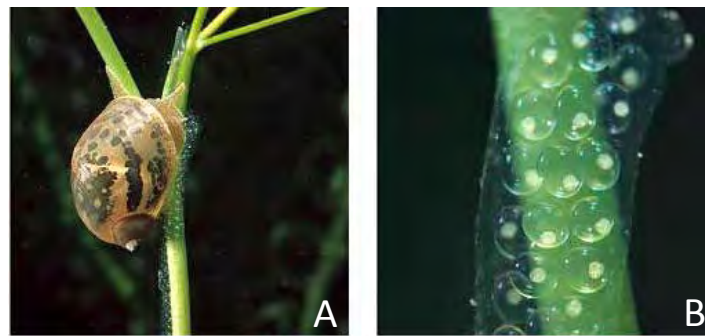


Figure 26 : Photographies du *Radix balthica* (A) et d'une ponte de *Radix* (B)

Il y a six principaux organes ou cellules connues pour être impliqués dans la régulation de la ponte des œufs chez les Lymnaea (Figure 27). On trouve l'organe endocrinien dorsal, les cellules neuroendocrines caudodorsales, les lobes latéraux, la gonade hermaphrodite, le conduit hermaphrodite et les organes sexuels accessoires (Joosse 1984; Wayne 2001).

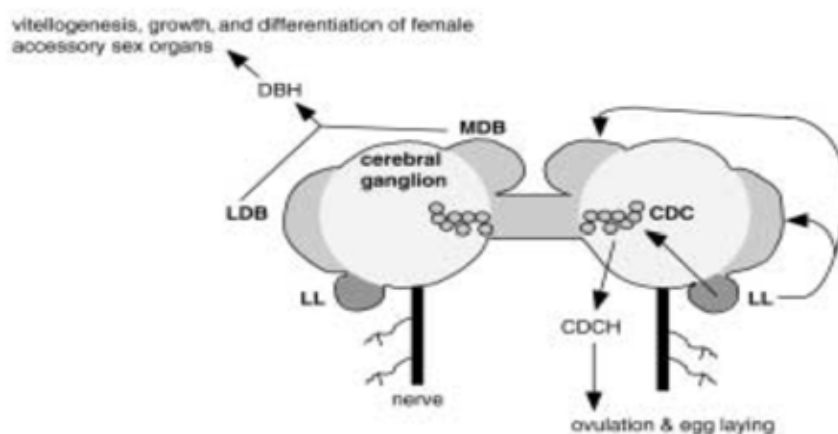


Figure 27 : Organisation du système reproducteur endocrinien femelle de *Lymnaea stagnalis*. LL: Lateral Lobe; LDB: Lateral Dorsal Body; MDB: Medial Dorsal Body; DBH: Dorsal Body Hormone; CDC: Caudodorsal Cells; CDCH: Caudodorsal Cell Hormone (adapté de Wayne 2001)

L'organe endocrinien dorsal est relié au ganglion cérébral et produit l'hormone du corps dorsal (DBH de l'anglais Dorsal Body Hormone) qui stimule la production de vitellogénine, le développement et la différenciation des organes sexuels femelles. Les cellules caudodorsales (CDC de l'anglais Caudodorsal Cells) sont situées dans le ganglion cérébral et produisent l'hormone cellulaire caudodorsale (CDCH de l'anglais Caudodorsal Cell Hormone) qui stimule l'ovulation et modifie le comportement associé à la ponte des œufs. Les neurones des lobes latéraux régulent la maturation de l'appareil reproducteur femelle en activant l'organe endocrinien dorsal et les CDC. En réponse à la CDCH, les ovocytes matures localisés dans les follicules dans les zones vitellogéniques de l'ovotestis sont libérés dans le canal hermaphrodite où la fécondation a lieu. Les œufs sont ensuite enveloppés par des sécrétions de la glande albuminée et d'une membrane sécrétée par la *pars contorta* lors de leur passage le long du conduit. La formation de la masse d'œufs se produit dans l'oothèque, les masses d'œufs sortent du corps de l'animal, et sont déposées sur le substrat. La modification du comportement associé à la ponte déclenchée par la sécrétion de la CDCH est très complexe et dure environ 2 h (Wayne 2001; Koene and Ter Maat 2005).

Le développement embryonnaire du *R. balthica* est comparable à celui des Lymnées. Les travaux de Pande *et al.* (2010) et de Saker *et al.* (2007) ont détaillé le cycle du développement embryonnaire de la lymnée. Celui-ci commence par le stade deux cellules résultant de la première segmentation par mitose, 2 à 3 h après la ponte. Deux heures plus tard a lieu la seconde mitose qui donne un embryon de 4 cellules de taille d'environ 57-60 µm. Par la suite, les segmentations se succèdent toutes les 4, 6, 10 et 13 heures pour aboutir au stade 64 cellules de taille inchangée. Environ 3 heures plus tard, l'embryon est au stade précoce trochophore avec une taille d'environ 100 µm et quelques mouvements créés par les couronnes de cils de l'embryon. Six heures plus tard, l'embryon est considéré être au stade jeune trochophore. Le stade trochophore est atteint 2 à 3 jours après la ponte, et l'embryon mesure environ 170 µm. Quatre à cinq jours plus tard, le stade véligère est atteint par l'embryon qui mesure environ 395 µm. Au sixième jour, l'embryon est au stade véligère tardif qui débouche sur le stade hypo au septième jour, suivi très rapidement par l'éclosion où le jeune mollusque qui sort de l'œuf mesure environ 590 µm (Sarker *et al.* 2007; Pande *et al.* 2010).

b. L'organisme modèle *Schmidtea polychroa*

i. Systématique, répartition et écologie

La systématique de *Schmidtea polychroa* (*S. polychroa*) est présentée dans le tableau suivant (Tableau 7).

Tableau 7: Systématique de l'espèce non modèle *S. polychroa*

Règne	Animal
Embranchement	Plathelminthes
Classe	Turbellariés
Ordre	Triclades
Sous-ordre	Continenticola
Famille	DugesIIDae
Genre	<i>Schmidtea</i>
Espèce	<i>polychroa</i> (Schmidt, 1861)

Parmi l'ordre des Triclades et le sous-ordre Continenticola, la famille des DugesIIDae comporte 9 genres (selon NCBI Taxonomy Browser, 09 Juillet 2016) dont le genre *Schmidtea* constitué de 4 espèces (selon NCBI Taxonomy Browser, 09 Juillet 2016) dont l'espèce *polychroa*. D'un point de vue plus phylogénétique, *Schmidtea polychroa* fait partie des Eukaryota, Metazoa, Platyhelminthes, Rhabditophora, Seriata, Tricladida, Continenticola, Geoplanoidea, DugesIIDae, Schmidtea.

Le genre *Schmidtea* (Ball 1974) fait partie de la famille des *DugesIIDae*. Il a une distribution paléarctique avec 4 espèces à ce jour, *Schmidtea lugubris*, *S. mediterranea*, *S. nova* et *S. polychroa*. Anciennement *Dugesia* ce dernier a été divisé en deux genres, les *Dugesia* (avec 25 espèces) et les *Schmidtea*. Parmi la population de *S. polychroa* il existe deux sous-populations, une diploïde amphimictique (sexuée) et une parthénogénétique polyploïde (Lázaro *et al.* 2011). La plupart des espèces de *Schmidtea* sont sexuées et diploïdes.



Figure 28 : Distribution de *S. polychroa* (Adapté de Fauna Europea)

L'espèce *S. polychroa* est une planaire dulçaquicole largement distribuée en Europe et en Amérique du Nord (Ball *et al.* 1969; Boddington and Mettrick 1974; Kenk 1974a; Pongratz *et al.* 2003) (Figure 28). En théorie, la coexistence des formes sexuée et parthénogénétique est rare (Case and Taper 1986; Peck *et al.* 1999). La coexistence des deux est, et a toujours été observée en étape de transition jusqu'à l'extinction de l'une des deux (Chaplin 1993). Généralement, la population sexuée représente la majorité de l'espèce alors que la forme parthénogénétique représente une minorité de la population (Cuellar 1977). Les travaux de Lynch (1984) ont montré que la population parthénogénétique ne pouvait jamais coloniser seule le milieu en présence d'une population sexuée. Cette hypothèse repose sur les croisements qui se font avec les formes sexuées et qui empêcheraient à long terme la colonisation des milieux seulement par les formes parthénogénétiques. Cependant, la population parthénogénétique possède de meilleures capacités colonisatrices grâce à un taux de croissance intrinsèque plus élevé et du fait qu'ils ne paient pas les effets délétères de la reproduction sexuée avec notamment la consanguinité (Lynch 1984). De ce fait, ils peuvent coloniser les zones où la population sexuée a du mal à se développer (Cuellar 1994). On observe cependant une cohabitation des deux formes sur l'ensemble des lieux de recensement.

La planaire *S. polychroa* affectionne les lacs, rivières et ruisseaux d'eau douce, peu profond méso- à eutrophisés. L'abondance de cet organisme dépend de la ressource alimentaire qu'il trouve, notamment la présence de gastéropodes et d'oligochètes qu'il affectionne. Les travaux de Reynoldson (1966) montrent que l'évolution de la présence de *S. polychroa* dans les eaux de Grande-Bretagne semble suivre l'évolution de la présence de gastéropodes. Ce ver plat est un consommateur secondaire, il est carnivore et/ou nécrophage pouvant devenir la proie d'autres animaux comme les poissons. Cet animal résiste plusieurs mois à la privation alimentaire sans mourir.

ii. Morphologie de *S. polychroa*

Comme l'ont montré Newmark et Alvaradro (2002), la taille des planaires est dépendante de leur alimentation. Elles sont capables de réduire leur taille jusqu'à une taille identique à celle de la leur sortie de l'œuf (Figure 29).



Figure 29 : Représentation de la corrélation entre la taille et la ressource alimentaire des planaires. (Newmark et Alvaradro 2002)

S. polychroa est un animal possédant une symétrie bilatérale (Figure 30 A), il est constitué de trois tissus (triploblaste), l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (Figure 30 B). Le corps vermiforme est aplati dorso-ventralement, d'où le terme de Plathelminthe (ver plat). Il est recouvert de cils, mais ne porte pas d'appendices. Une région antérieure, caractérisée par la présence d'organes sensoriels et de ganglions cérébroïdes et une région postérieure ou caudale peuvent être définies, de même qu'une face ventrale et dorsale.

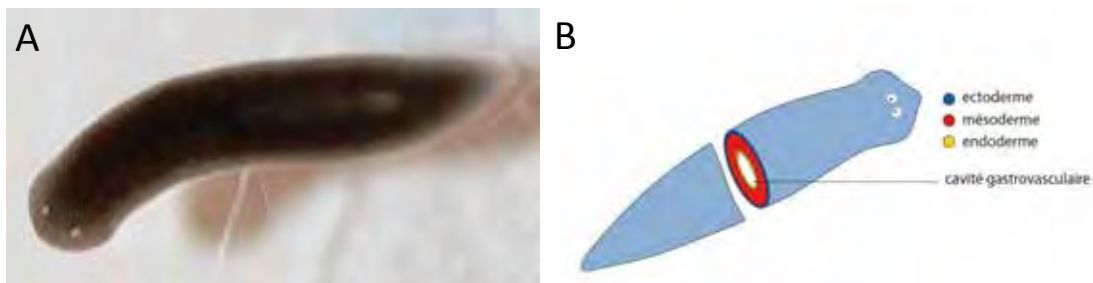


Figure 30 : Photographie de la face dorsale de *Schmidtea polychroa* (A) et schéma de l'organisation des trois tissus chez la planaire (B).

L'épiderme ventral est constitué de cellules formant chacune une centaine de centrioles et autant de cils qui battent en direction de la partie postérieure de l'animal afin d'assurer son déplacement sur le substrat ou en suspension dans l'eau (Figure 31 A et B).

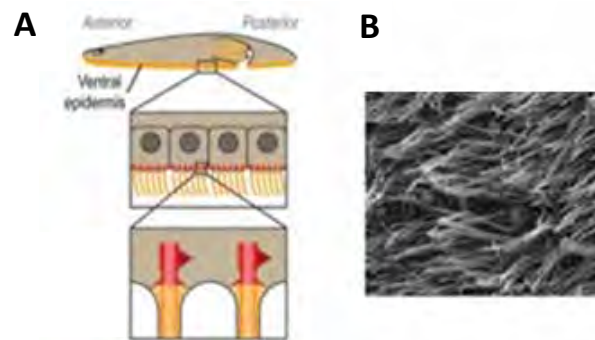


Figure 31 : Organisation des cils d'une planaire. A : Organisation du cil ventral, B : Micrographie de la face ventrale d'une planaire (adapté de Rompolas et al. 2010)

A la surface de celui-ci, à mi-chemin de l'axe antéro-postérieur de l'animal, se situe une bouche prolongée par un pharynx musculieux blanchâtre et dévaginable débouchant directement dans un intestin comportant plusieurs ramifications. La planaire possède des récepteurs sensoriels composés de cellules sensibles aux stimuli tactiles permettant à l'animal de percevoir la présence d'obstacles. Ils sont disposés sur l'ensemble du corps, avec une densité plus élevée au niveau de la tête et du pharynx. On trouve également des récepteurs aux substances chimiques appelés chémorécepteurs, particulièrement abondants sur les expansions latérales de la tête. Lorsqu'elle chasse, la planaire va faire osciller sa tête, balayant l'environnement chimique, de manière à percevoir d'éventuels gradients de signaux chimiques lui permettant de détecter ses proies et donc de s'orienter vers la source alimentaire.

iii. Cycle de reproduction et développement

Le système reproducteur sexué, mâle et femelle, occupe un large volume chez la planaire. Les spermatozoïdes sont déposés par le pénis d'un individu dans l'atrium génital de sa partenaire et remontent les oviductes jusqu'aux ovaires, où a lieu la fécondation (Figure 32).

Les œufs fécondés descendent les oviductes et sont entourés au passage de cellules vitellines produites par les glandes vitellogènes, et débouchent dans l'atrium génital où ils sont entourés d'une substance produite par l'utérus. Cette substance durcit et forme des cocons rigides pondus par le pore génital (2-3 semaines éclosions).

Après fécondation, plusieurs zygotes (deux à huit) sont encapsulés avec une masse de cellules vitellines. Les œufs fécondés se divisent et restent à peine en contact les uns avec les autres à l'intérieur du cocon. Au cours du développement, le pharynx permanent apparaît tout comme la ramification du système digestif. L'aplanissement de l'embryon devient apparent, la ramification du système gastrique est plus prononcée. Par la suite, l'embryon devient mobile, avec un pharynx bien développé et une cavité gastrique ramifiée (Alvarado 2003). En association avec la symétrie bilatérale, les trois feuilletts caractéristiques des organismes triploblastiques se mettent en place au

cours du développement embryonnaire. Le feuillet mésodermique est impliqué dans la mise en place de diverses structures, mais il est surtout à l'origine du parenchyme comblant les espaces entre les organes. À aucun moment il ne se creuse de cavités, d'où la qualification d'acœlomates traditionnellement réservée à ces organismes. Par ailleurs, il ne se forme pas d'anūs chez ces animaux qui peuvent être considérés comme des Protostomiens.

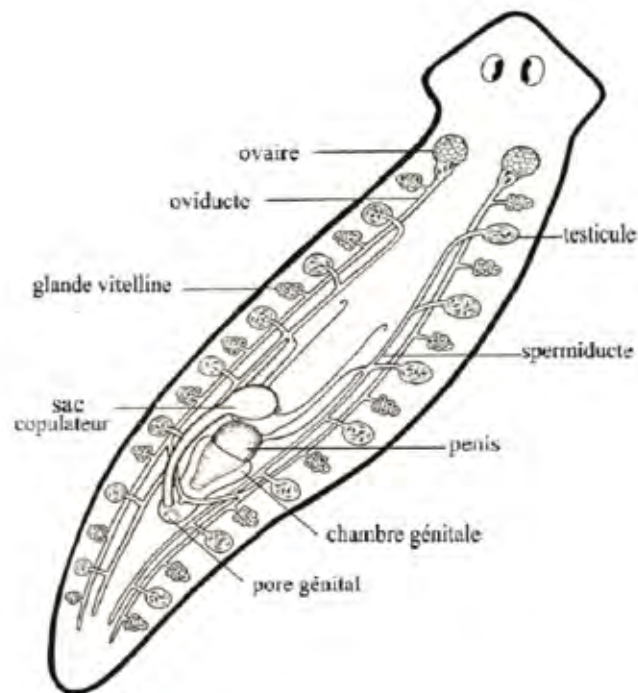


Figure 32 : Organisation du système reproducteur chez *Dugesia* sp. (D'après Buchsbaum 1961)

Outre la reproduction sexuée ou parthénogénétique aboutissant au développement de cellules germinales, il existe un troisième type de reproduction de la planaire, la reproduction par fission transversale. Lorsqu'elle est volontaire, la fission débute par une constriction qui apparaît spontanément derrière le pharynx, et aboutit finalement à la séparation de deux individus complets par cellulolyse. Par la suite, les deux morceaux d'individus vont régénérer la partie manquante. Ce phénomène permet aussi de restaurer une partie du corps ou d'un organe perdu accidentellement. La planaire a une capacité de régénération exceptionnelle grâce à la présence de cellules souches appelées néoblastes dispersées dans le parenchyme de l'organisme adulte (Newmark and Sánchez Alvarado 2000; Ladurner *et al.* 2000; Gschwentner *et al.* 2001). Comme l'a montré Morgan en 1898, un 279^{ème} d'une planaire est capable de régénérer un animal entier.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

I. Échantillonnage et mise en place des élevages

a. Échantillonnage et mise en stabulation des mollusques

Les mollusques *Radix balthica* (*R. balthica*) ont été échantillonnés dans le cours d'eau Le Lézert situé dans le Tarn (données géographiques : Latitude : 43.916740 | Longitude : 2.216328). En laboratoire, les mollusques ont été maintenus en aquarium de 40 L d'eau reconstituée AFNOR (NaHCO_3 200 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 297 mg/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 167 mg/L, K_2SO_4 anhydre 26 mg/L) (NF T90-350) à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ avec une filtration. Une aération permanente et un cycle jour/nuits de 10h/14h ont été appliqués. Les mollusques ont été nourris en excès avec de la salade (Label AB). Une algue de végétation et un caillou préalablement brossé du cours d'eau ont été ajoutés à l'aquarium.

b. Échantillonnage et mise en stabulation des planaires

Les planaires *Schmidtea polychroa* (*S. polychroa*) ont été prélevées dans le cours d'eau du Caussel situé dans le Tarn (données géographiques : Latitude : 43.932634 | Longitude : 2.164799). En laboratoire, les planaires ont été maintenues dans une rivière artificielle composée de trois bacs de 30 L remplis d'eau AFNOR (NF T90-350) à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ et d'une pompe remontant l'eau du troisième au premier bac. L'aération a été assurée par les deux chutes d'eau successives de la rivière.

II. Évaluation des impacts phénotypiques de quatre médicaments

Les médicaments utilisés pour les expérimentations sont l'oxazépam ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$; M.M : 286.71 g/mol), la sertraline ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}$; M.M : 306.23 g/mol), la carbamazépine ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$; M.M : 236.27 g/mol) et la cyamémazine ($\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{S} \cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$; 439.53 g/mol), synthétisés par ALSACHIM, France.

a. Préparation des solutions d'exposition utilisées pour les tests sur le *R. balthica*

Les molécules conditionnées sous forme de poudre ont été dans un premier temps solubilisées dans de l'éthanol à 100 % afin d'obtenir les solutions mères de chaque condition et de chaque molécule. Les solutions mères ont été ensuite diluées au 1/10000^e dans de l'eau AFNOR (NF T90-350) afin d'obtenir les solutions d'exposition. Les concentrations utilisées sont répertoriées dans le tableau 8.

Tableau 8: Concentration des solutions d'exposition

	Oxazépam (en µg/L)	Carbamazépine (en µg/L)	Cyamémazine (en µg/L)	Sertraline (en µg/L)	Témoins
	0,815	0,165	0,01	0,001	
<i>R. balthica</i>	1	1	1	1	Eau AFNOR et Éthanol au 1:10000 ^e
	5	5	5	5	
	10	10	10	10	
	25	25	25	25	
	50	50	50	50	
	100	100	100	100	

Pour chaque molécule utilisée, nous avons réalisé un suivi de leur stabilité dans les conditions d'exposition. Chaque molécule a été exposée dans des cuves en plastique puis dosée en HPLC tous les jours ou deux jours pendant 10 jours afin d'établir une courbe de stabilité des molécules. Les concentrations en médicaments utilisées étaient 1000 fois plus grandes que les concentrations d'exposition (à cause d'un seuil de détection des molécules par les instruments utilisés trop haut). Nous avons utilisé un standard interne très stable, la caféine, afin de normaliser nos résultats. La caféine a été solubilisée à 5 mg/L dans le solvant de solubilisation des molécules médicamenteuses à doser (de l'eau AFNOR). Nous avons donc utilisé la même solution pour solubiliser et préparer toutes les concentrations de chaque molécule.

La chromatographie a été réalisée à l'aide d'une chaîne HPLC (Spectra System, Thermo Scientific) équipée d'un détecteur UV à barrette de diode (UV2000, Thermo Scientific) et d'une colonne C18 de 4,6 x 150 mm, 5 µm et 100 Å (AGELA, Venusil). La séparation a été réalisée à l'aide d'un gradient composé à T0 de 95% d'H₂O + 0,04% d'acide trifluoracétique (TFA) / 5% acétonitrile (ACN) + TFA (0,04%), ratio 95/5. Le gradient est étendu sur 15 minutes pour aboutir à un ratio 5/95 avec les mêmes solvants. Ce ratio est maintenu 3 minutes, puis les 6 dernières minutes sont utilisées pour le retour aux conditions initiales (95/5). Le run dure 24 minutes avec un débit réglé à 1 mL/min.

La détection des molécules a été réalisée à partir d'une injection de 20 µL des solutions à doser. Pour toutes les molécules, la longueur d'onde (λ) utilisée était de 272 nm. Pour le standard interne (la caféine) le temps de rétention (TR) était de 6,44 min, pour la sertraline de 9,5 min, pour la carbamazépine de 9,46 min, pour la cyamémazine de 9,11 min et pour l'oxazépam de 10,1 min.

b. Test d'embryotoxicité sur le *R. balthica*

Les pontes de moins de 24 h ont été isolées en boîte de pétri puis observées au microscope optique inversé Leica DM IL (Leica, France) afin de classer les embryons en fonction de leur stade.

Seules les pontes dont les embryons étaient au stade trochophore ont servi à réaliser les tests d'embryotoxicité. Les pontes plus vieilles ont été isolées dans un autre aquarium afin d'obtenir une génération F1 de *R. balthica*.

Un pool de 20 pontes a été utilisé afin de réaliser les tests d'embryotoxicité. Chaque extrémité de ponte a été supprimée afin d'éliminer les œufs non fécondés du test, puis les pontes ont été disséquées en incisant la capsule contenant les œufs. Les œufs ont été brassés puis répartis aléatoirement dans une plaque à 96 puits à raison d'un œuf par puits préalablement rempli de 300 μL de la solution médicamenteuse fraîchement préparée. Chaque condition a été testée avec 90 œufs, en duplicat. Les plaques ont été ensuite incubées à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ à l'obscurité puis aérées 10 minutes tous les jours. Le taux d'éclosion a été déterminé après 8 jours d'exposition et le retard à l'éclosion après 15 jours d'exposition.

Les résultats du test d'embryotoxicité étant sous forme de pourcentage, un test d'indépendance du χ^2 a permis de mettre en avant les différences significatives.

c. Préparation des solutions d'exposition utilisées pour les tests sur *S. polychroa*

Les molécules conditionnées sous forme de poudre ont été solubilisées puis diluées dans de l'eau AFNOR (NF T90-350) afin d'obtenir les solutions d'exposition. La solubilisation des molécules a été facilitée par une sonication de 5 minutes à 37 kHz à l'aide d'un bain-marie à ultrasons (Fisher Scientific, France). Les concentrations des solutions d'exposition utilisées sont répertoriées dans le tableau 9.

Tableau 9: Concentration des solutions d'exposition					
	Oxazépam (en $\mu\text{g/L}$)	Carbamazépine (en $\mu\text{g/L}$)	Cyamémazine (en $\mu\text{g/L}$)	Sertraline (en $\mu\text{g/L}$)	Témoins
<i>S. polychroa</i>	0,815	0,165	0,01	0,001	Eau AFNOR
	10	10	10	10	
	100	100	100	100	

d. Étude de la capacité de régénération de la partie céphalique en présence de médicaments sur *S. polychroa*

Le suivi de la capacité de régénération des planaires a été réalisé *via* l'ablation de la région céphalique (en coupant transversalement entre le cerveau et le pharynx) et le suivi de la régénération de la tête au cours du temps (Schürmann and Peter 1998). Après ablation, les planaires ont été immédiatement réparties en plaques à 24 puits contenant 2mL de solution à tester à raison d'un individu par puits. Les planaires ont été alimentées *ad libitum* avec des larves de chironome

tous les trois jours, à chaque renouvellement de la solution d'exposition. Chaque condition a été testée sur 24 planaires. Le suivi de la régénération a été réalisé en déterminant des stades de régénération (Figure 33). Ensuite, l'évolution des stades de régénération des témoins est comparée à l'évolution des stades chez les planaires exposées. Au terme de la régénération de la région céphalique chez les témoins, le nombre de planaires exposées présentant un retard de régénération a été évalué. Le même suivi de la régénération a été réalisé à partir de planaires ayant été exposées 21 jours à chaque condition.

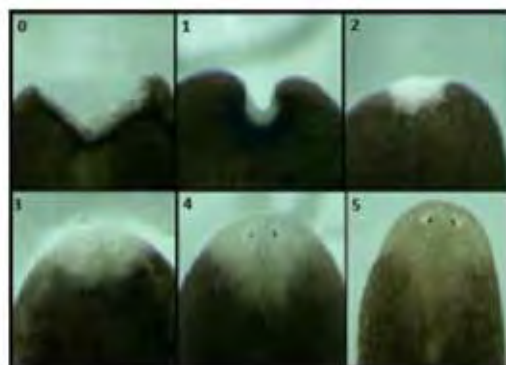


Figure 33 : Stades de régénération de la planaire

e. Étude de l'impact des médicaments sur la mobilité de *S. polychroa*

L'étude de la mobilité a été réalisée durant 21 jours en tripliquat pour chaque concentration de chaque psychotrope, avec 40 planaires placées en béccher d'un litre contenant 300 mL de solution à tester. Les planaires ont été alimentées avec 15 larves de chironomes (Chironomidae, Jardinierie tarnaise, France) tous les trois jours, au moment du renouvellement des solutions d'exposition. La mesure de la mobilité a été évaluée tous les trois jours avec 10 planaires par répliquat pris aléatoirement pour chaque condition et placés dans 10 arènes (Figure 34). Des vidéos de 2min30s de chaque répliquat ont été réalisées puis analysées à l'aide d'un logiciel de vidéo tracking (EthoVision, Noldus, Pays-Bas) pour déterminer la distance parcourue et la giration moyenne sur une durée de deux minutes pour chaque planaire. Les 15 premières et les 15 dernières secondes de la vidéo ont été éliminées pour conserver uniquement les données les plus représentatives des échantillons.



Figure 34 : Répartition en arènes de dix planaires pour étudier le déplacement et la giration.

L'analyse des résultats a conduit à un traitement statistique afin de déterminer les différences significatives entre chaque essai par rapport au témoin. Les tests ont été réalisés à l'aide du logiciel R (version 3.2.3). Un modèle linéaire généralisé (GLM) de type ANOVA a été appliqué sur les résultats puis les résidus de l'ANOVA ont été représentés graphiquement afin de vérifier des résultats. Un test post-hoc de Student avec une correction de Bonferroni a ensuite été réalisé.

f. Étude de la fécondité de *S. polychroa* et de la fertilité des cocons pondus en présence de médicaments

L'étude de l'impact des médicaments sur la reproduction de la planaire *S. polychroa* a été réalisée en tripliquat pour chaque concentration de chaque psychotrope, avec 30 planaires placées en béccher d'un litre contenant 300 mL de solution à tester. Les planaires ont été alimentées avec 15 larves de chironomes (Chironomidae, Jardinerie tarnaise, France) tous les trois jours, au moment du renouvellement des solutions d'exposition. L'impact des médicaments sur la reproduction de *S. polychroa* a été suivi quotidiennement pendant un mois en dénombrant les cocons pondus par les 30 planaires (Knakiewicz and Ferreira 2008). Les cocons pondus ont été isolés pour évaluer le nombre de jours nécessaires à l'éclosion des juvéniles ainsi que le nombre d'individus par cocon.

L'analyse des résultats a conduit à un traitement statistique afin de déterminer les différences significatives entre chaque essai par rapport au témoin. Les tests ont été réalisés à l'aide du logiciel R (version 3.2.3). Un modèle linéaire généralisé (GLM) de type ANOVA a été appliqué sur les résultats de la fertilité, puis les résidus de l'ANOVA ont été représentés graphiquement afin de vérifier l'homoscédasticité des résultats. Un test post-hoc de Student avec une correction de Bonferroni a ensuite été réalisé.

III. Évaluation de l'impact transcriptomique et biochimique des médicaments

a. Extraction d'ARN total et traitements bioinformatiques pour le séquençage du transcriptome en conditions différentielles sur le *R. balthica*.

Dès l'éclosion, les mollusques de chaque condition ont été échantillonnés à raison de 10 par tube afin de réaliser les extractions d'ARN pour le séquençage du transcriptome en conditions différentielles. Trois conditions ont été choisies pour la réalisation du séquençage en différentiel, une condition témoin pour laquelle les embryons ont été exposés à une solution d'éthanol dilué dans de l'eau AFNOR (NF T90-350) au 1/10000ème et deux conditions pour lesquelles les embryons ont été exposés à deux solutions d'oxazépam, une à la concentration environnementale (0,815 µg/L) et une à 10 µg/L nommées respectivement TB et TA pour la suite de l'analyse du transcriptome en conditions différentielles. Huit réplicats ont été réalisés pour chacune des trois conditions. L'extraction d'ARN

début par le broyage des pools de mollusques dans 200 µL de TRIzol® Reagent (Life Technologie, France) à l'aide de pistons stériles RNase et DNase free. Après 5 minutes à température ambiante pour dissocier tous les complexes nucléoprotéiques, 40 µL de chloroforme (0.2 mL/1 mL de Trizol) ont été ajoutés au broyat puis le mélange a été vigoureusement agité durant 15 secondes. Après 3 minutes à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés à 12000 x g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant (environ 50 % du volume total à centrifuger) a été récupéré. Les ARNs ont ensuite été purifiés avec le kit RNeasy Mini columns (Qiagen, France) avec digestion à la DNase sur colonne selon les recommandations du fabricant (Protocole QIAGEN, RNeasy Micro Handbook 12/2007, p.56). La qualité et la concentration des ARNs extraits ont été évaluées à l'aide d'un Nanodrop 2000TM (Thermo Scientifique, France). Les ARNs ont été ensuite stockés à -80 °C jusqu'au dépôt sur la plateforme de séquençage GET-PlaGE.

Le personnel technique de la plateforme a réalisé les manipulations nécessaires au séquençage des ARNs dans chaque condition (voir Mazzitelli *et al.*, 2016, en Annexe 2 pour plus d'informations). Les données issues du séquençage ont été traitées par une plateforme de bio-informatique afin de nettoyer les séquences et vérifier leur qualité, les assembler, les annoter et les quantifier. Par la suite, une étude en différentielle (Témoins/exposé) des séquences a été réalisée à l'aide du logiciel R et du DEseq package version 1.14.0 afin d'isoler les contigs différentiellement exprimés entre les conditions exposées (TA et TB) et le témoin. Les contigs différentiellement exprimés ont été analysés afin de les ré-annoter à l'aide des logiciels KOBAS 2.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/home.do>) et Blast KOALA (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>) puis de les classer à l'aide des logiciels WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>) et GO-term Mapper (<http://go.princeton.edu/>) et d'en prédire les modules de voies impactées à l'aide du logiciel KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg4.html>) (voir Mazzitelli *et al.*, 2016 en Annexe 2 pour plus d'informations).

b. Extraction d'ARN total pour l'étude transcriptomique du *R. balthica* en RT-qPCR

Dès le début des éclosions, 6 juvéniles de moins de 24 heures pour chaque condition ont été isolés en tube de 1,5 mL, chaque condition a été réalisée en 10 réplicats. Deux conditions par médicament ont été choisies pour la réalisation de l'étude transcriptomique ainsi qu'une condition témoin pour laquelle les embryons ont été exposés à une solution d'éthanol diluée dans de l'eau AFNOR (NF T90-350) au 1/10000ème. Les deux conditions de chaque médicament pour lesquelles les embryons ont été exposés sont premièrement la concentration environnementale de l'oxazépam, de la carbamazépine, de la sertraline et de la cyamémazine (respectivement 0,815, 0,165, 0,001 et 0,01 µg/L) et la première concentration présentant un effet de chaque médicament (autre que la

concentration environnementale) (respectivement 10, 25, 10 et 100 µg/L). Selon le même protocole que celui utilisé en II.a jusqu'à l'obtention des ARNs en phase aqueuse, le broyage de chaque condition a été réalisé dans 200 µL de TRIzol® Reagent (Life Technologie, France) à l'aide de pistons stériles RNase et DNase free. Après 5 minutes à température ambiante pour dissocier tous les complexes nucléoprotéiques, 40 µL de chloroforme (0.2 mL/1 mL de TRIzol) ont été ajoutés au broyat puis le mélange a été vigoureusement agité durant 15 secondes. Après 3 minutes à température ambiante, les échantillons ont été centrifugés à 12000 x g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant (environ 50 % du volume total à centrifuger) a ensuite été récupéré et un lavage au chloroforme a été réalisé en ajoutant un volume de chloroforme à la phase aqueuse. Le mélange a été agité 30 secondes à température ambiante puis centrifugé à 12000 x g pendant 15 minutes à 4 °C. La phase aqueuse a ensuite été récupérée puis la précipitation et le lavage des ARNs ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur (TRIzol® Reagent, Life Technologies, France). Les ARNs ont été solubilisés dans 20 µL d'eau traitée au DEPC (Di-éthyl-pyrocabonate).

Les échantillons d'ARNs extraits ont été traités à la DNase I avec le kit DNA Free kit (Ambion by Life Technologies, France) selon les recommandations du fabricant, afin d'éliminer la présence d'ADN dans les échantillons. La qualité et la concentration d'ARN totale ont été mesurées avec un Nanodrop 2000TM (Thermo Scientifique, France) puis les échantillons ont été stockés à -80 °C.

Une reverse transcription (RT) a ensuite été réalisée sur 500 ng d'ARN total dilués dans 10 µL d'eau traitée au DEPC. La réaction de transcription a été réalisée avec des random hexamer, à l'aide du kit M-MLV (Invitrogen, France) selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc synthétisés ont été ensuite dilués au 1/5e pour diluer les inhibiteurs de PCR présents dans les échantillons.

c. Méthodologie de l'amplification en RT-qPCR et des traitements statistiques de l'étude transcriptomique du *R. balthica*

i. Le principe de la RT-qPCR

L'amplification PCR a été suivie et quantifiée grâce à un marqueur fluorescent, le SYBR Green. Elle est composée d'une phase de latence où la quantité de fragments d'ADN liés au marqueur produit une intensité de fluorescence trop faible située en dessous du seuil de détection, d'une phase exponentielle et d'une phase stationnaire où la fluorescence arrive à un plateau (Figure 35). La phase d'amplification exponentielle est celle pendant laquelle les réactifs et l'encombrement du milieu réactionnel ne sont pas limitants.

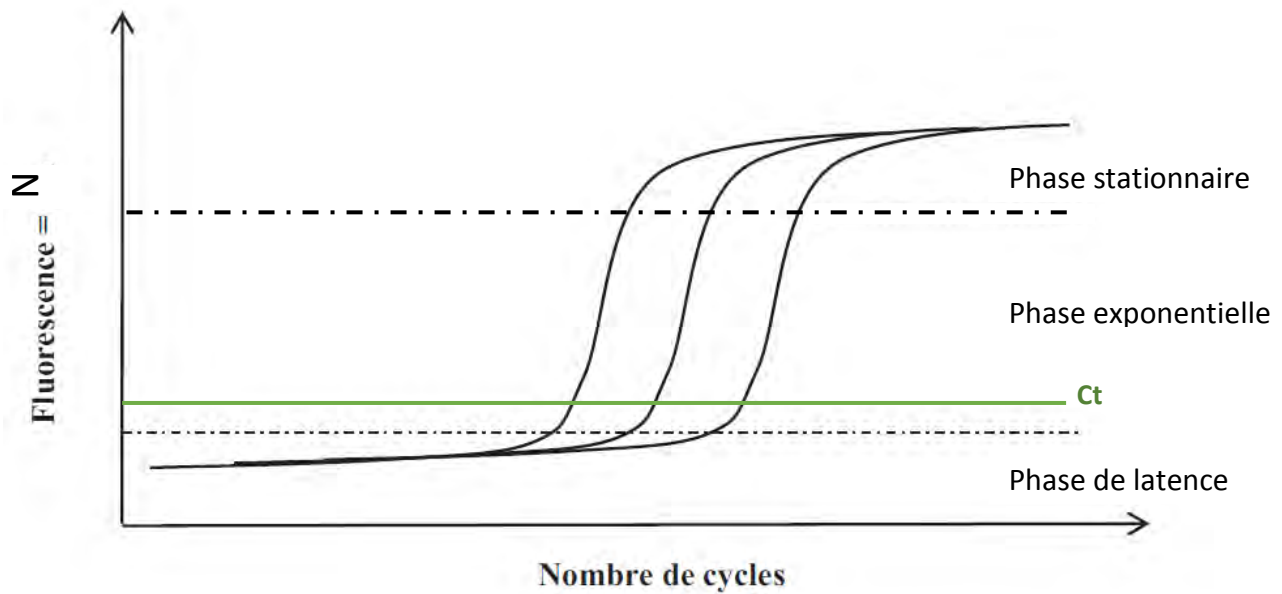


Figure 35 : Représentation de l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cycles au cours d'une amplification en qPCR. Ct : Cycle threshold

La quantification a été réalisée par la méthode des “ $\Delta\Delta Ct$ ” de Livack *et al.*, 2001 nécessitant l'utilisation de gènes de référence sans réaliser de droites de standards ni de connaître la valeur absolue du nombre de copies dans les échantillons. Les résultats ont été exprimés par un rapport gènes cibles/gènes de référence de chaque échantillon et normalisés par le rapport gènes cibles/gènes de référence des échantillons calibresurs, les échantillons témoins. Cette méthode nécessite que l'efficacité (E) des PCR soit le plus proche de 100 %, sinon, les calculs sont faussés en introduisant un biais dans le calcul. La PCR est décrite par l'équation suivante : $N = N_0 \times (1 + E^{Cp})$ avec “N” le nombre de molécules au cycle “Cp”, “ N_0 ” le nombre initial de molécules, “E” l'efficacité de la PCR et “Cp” le cycle seuil.

Pour déterminer le “ $\Delta\Delta Ct$ ”, dans une première étape, le rapport “gènes cibles/gènes de référence” pour chaque échantillon et échantillon témoins sont calculés. Dans une seconde étape, le rapport obtenu pour chaque échantillon est divisé par le rapport obtenu pour l'échantillon calibreur.

Donc avec “R” pour gènes de référence et “C” pour gènes cibles, on peut écrire les équations suivantes : $N_C = N_{0C} \times E_C^{CpC}$ et $N_R = N_{0R} \times E_R^{CpR}$ qui sont les équations de l'amplification PCR pour le gène cible et le gène de référence aux “Cp” respectifs des 2 gènes.

Avec “S” pour échantillons et “T” pour témoins, on peut calculer le “ $\Delta\Delta Ct$ ” avec l'équation suivante :

$$\frac{\frac{N_{C(S)}}{N_{R(S)}}}{\frac{N_{C(T)}}{N_{R(T)}}} = \frac{\frac{N_{0C(S)} \times E_C^{CpC(S)}}{N_{0R(S)} \times E_R^{CpR(S)}}}{\frac{N_{0C(T)} \times E_C^{CpC(T)}}{N_{0R(T)} \times E_R^{CpR(T)}}} = \frac{Ratio_{Echantillon(S)}}{Ratio_{Témoins(T)}} = 1$$

En effet, au "Ct", Cycle threshold, (cycle seuil déterminant le début de la phase exponentielle de l'amplification PCR) (Figure 35), le nombre de copies détectées des gènes cibles (C) et de référence (R) ne sont pas les mêmes mais le ratio " N_C / N_R " est constant et identique pour le témoin (T) et l'échantillon (S). Le "Ct" représentant une intensité de fluorescence, même si le témoin et l'échantillon ont un "Cp" différents, au "Ct" ils ont le même nombre de molécules (Figure 35). Donc $Ratio(S)/Ratio(T) = 1$.

On obtient donc après simplification :

$$\frac{\frac{N_{0C(S)}}{N_{0R(S)}}}{\frac{N_{0C(T)}}{N_{0R(T)}}} = \frac{\frac{E_C^{CpC(S)}}{E_R^{CpR(S)}}}{\frac{E_C^{CpC(T)}}{E_R^{CpR(T)}}} = \frac{E_C^{CpC(S)}}{E_R^{CpR(S)}} \times \frac{E_R^{CpR(T)}}{E_C^{CpC(T)}} = E_C^{-(CpC(S) - CpC(T))} \times E_R^{-(CpR(T) - CpR(S))}$$

Si l'efficacité des deux PCR est identique ($E = E_C = E_R$) et de 100 %, on peut écrire :

$$2^{-(CpC(S) - CpC(T) + CpR(T) - CpR(S))} = 2^{-((CpC(S) - CpR(S)) - (CpC(T) - CpR(T)))} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ii. Vérification de l'efficacité des amorces en plaque à 384 puits

Les amorces ont été dessinées dans les ORFs des séquences obtenues par le séquençage du transcriptome à l'aide du logiciel ePrimer3 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::eprimer3>) afin d'obtenir des produits PCR d'environ 180 pb dont les séquences sont disponibles en Annexe 3. Leur efficacité a été évaluée en plaque à 384 puits sur un pool d'ADNc représentatif de chaque condition. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 10 µL contenant le mix SsoFast™ EvaGreen® Supermixes à 1X final (BioRad, France), 0,5 µM d'amorce sens et anti-sens, 2 µL d'ADNc. Le cycle PCR est composé d'une étape de 20 secondes à 95 °C suivis de 40 cycles de deux étapes avec une étape d'une seconde à 95 °C puis de 20 secondes à 60°C, à la fin de laquelle l'intensité de fluorescence est mesurée. À la fin des 40 cycles, une courbe de fusion pour chaque échantillon a été réalisée avec une étape de 15 secondes à 95 °C suivie d'une étape de 1 minute à 60 °C puis d'une mesure en continu de la fluorescence concomitante avec une augmentation de 0,05 °C par seconde jusqu'à 95°C. Les amorces présentant une mauvaise efficacité (plus de 105 et moins de 95 %) ont été redessinées et testées à nouveau.

Une fois l'efficacité des amorces validée, les réactions de RT-qPCR ont été réalisées sur une puce Fluidigme Biomark (96 x 96). Une plaque à 96 puits contenant les mix d'amorces "sens" et "anti-sens" et une autre plaque à 96 puits contenant les cDNA ont été déposées sur le plateau PlaGe. Les équipes sur place se sont chargées de réaliser la puce. Le principe de la puce Biomark est de réaliser les réactions de RT-qPCR dans un volume réactionnel d'un nanolitre (Figure 36).



Figure 36 : Puce Biomark 96x96

Le traitement statistique des valeurs a été réalisé à partir des calculs de $\Delta\Delta$ Ct, à l'aide du package Limma du logiciel R (Ritchie *et al.* 2015). Les fonctions principales utilisées dans le script sont la fonction "lmfit", "contrast.fit" et "eBayes".

d. Localisation de l'expression de cinq gènes par Hybridation In Situ (HIS) sur embryon de *R. balthica*

Les cinq gènes utilisés pour l'HIS ont été choisis parmi les contigs différentiellement exprimés lors de l'étude du séquençage en conditions différentielles et dont les séquences codent pour la Béta Tubuline, la Dentine, Chordin-like, l'Acétylcholine estérase et enfin la Fibrilline. Le gène de la Béta tubuline nous a servi de contrôle positif. Le dessin des amorces a été réalisé sur les ORF des contigs d'intérêts à l'aide du logiciel ePrimer3 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::eprimer3>) afin d'obtenir des fragments PCR d'environ 700 pb (Tableau 10).

Tableau 10 : Couples d'amorces utilisées pour la construction des sondes

Identifiant du contig	Fonction	Nom de l'amorce	Séquences	Taille (pb)
Rp1_contig_31167	Dentin	I.S.F1	CCTGTCGCAGCTGTTAGACA	701
		I.S.R1	GGCCGAGTGTTGACAGATGA	
Rp1_contig_01993	Kielin/Chordin	I.S.F2	GCACTGACTCGGGTATTGCT	704
		I.S.R2	TTGTACACACGAGCCTGTGG	
Rp1_ACES.1.2	Acétylcholine estérase	I.S.F3	TGTCCTTGACGTCTCACAGC	704
		I.S.R3	CTAACCGGACAGGATCAGCC	
Rp1_LOC101861648.2.2	Fibrilline	I.S.F4	CCAGGAACACTAACCCCGAC	705
		I.S.R4	GCCCCACAAGCTTACACTCT	
Rp1_TBB	Tubuline bêta	I.S.F5	TGTTTCCGCACCCTGAAACT	700
		I.S.R5	CACCTTCTCCTCCTCCTCA	

i. Clonage des ADNc des gènes sélectionnés

Les fragments de gènes d'intérêts ont été amplifiés par PCR. La PCR a été réalisée à partir des ADNc obtenus pour l'étude en RT-qPCR (III.b.) dans un volume final de 25 µL contenant les dNTP à 0,2 mM final, le MgCl₂ à 1,5 mM, du tampon PCR à 1X (sans MgCl₂), et les amorces sens et anti-sens à 0,5 µM final, 2 µL d'ADNc et 1,25U de Taq polymérase (Invitrogen, France). Le programme PCR appliqué consistait en un cycle de 5 minutes à 95°C suivi par 35 cycles de 1 minute à 95 °C, 1minute à 60°C et de 30 secondes à 72°C pour finir par 10 minutes à 72°C (Multigene, Labnet, France). Les produits PCR ont ensuite été purifiés par extraction sur gel à l'aide du kit GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, France) selon les recommandations du fournisseur. Les fragments purifiés ont ensuite été clonés dans le vecteur pCR®II-TOPO® TA du kit TOPO® TA Cloning® Kit, Dual promotor (Invitrogen, France), possédant deux promoteurs spécifiques aux deux ARN polymérases SP6 et T7 (Figure 37) de chaque côté du site polylinker.

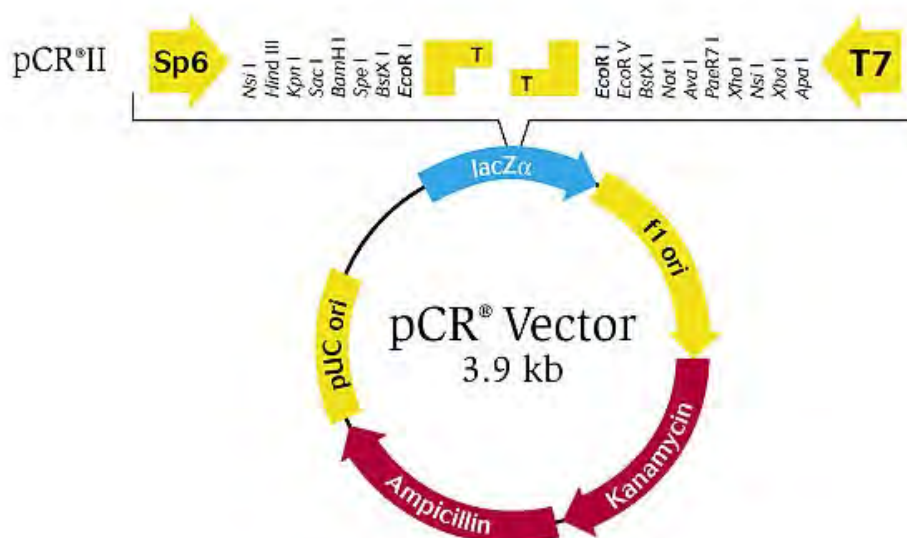


Figure 37 : Carte de restriction du vecteur "PCRII TOPO Vector".

Le clonage a été réalisé selon les recommandations du fournisseur, avec un ratio insert/vecteur de 1:1 et de 3:1. Les vecteurs ont été insérés dans la souche bactérienne *Escherichia coli* (*E. coli*) chimiquement compétente (de génotype : F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-) du kit Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells. La transformation a été réalisée selon les recommandations du fournisseur. Les colonies d'intérêt ont été cultivées dans 7 mL de LB liquide contenant 100 µg/mL d'ampicilline puis les plasmides extraits sur 2 ml de culture bactérienne à l'aide du kit PureLink® HiPure Plasmid miniprep Kit (Invitrogen, France) selon les recommandations du fournisseur. Après vérification par PCR et séquençage (plateau Get purpan) de la présence et de l'orientation des inserts, une maxiculture des clones bactériens validés a été réalisée suivie d'une maxipréparation de l'ADN

plasmidique à l'aide du kit PureLink® HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit selon les recommandations du fabricant.

ii. Synthèse des sondes par transcription *in vitro*

Une fois le sens d'insertion obtenu par le séquençage, les plasmides ont été linéarisés avec des enzymes de restrictions coupant une seule fois le vecteur et ne possédant pas de site de coupure sur la séquence de l'insert (Figure 38).

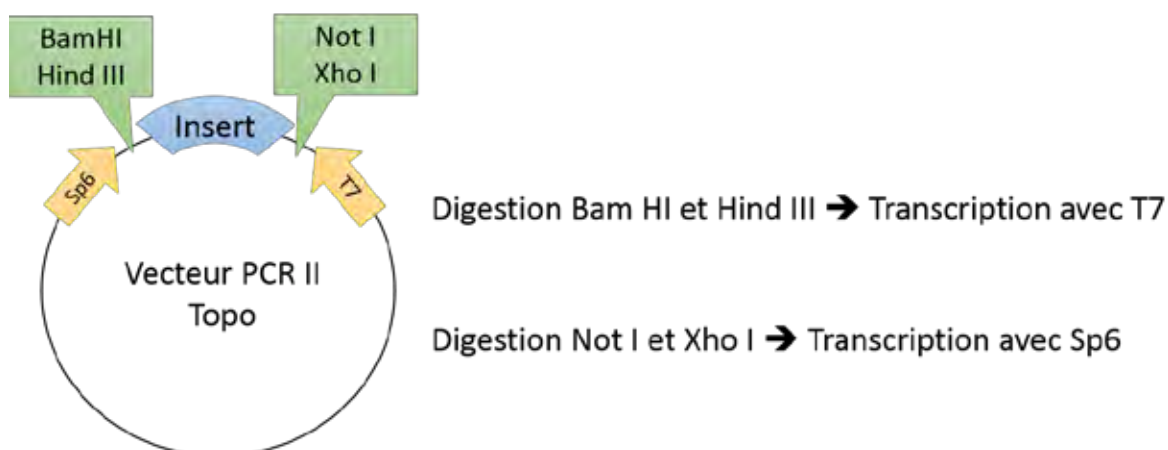


Figure 38 : Position des sites de restrictions et des sites d'initiations de transcription. BamHI, HindIII, NotI, XhoI : Sites de coupure pour les enzymes de restriction BamHI, HindIII, NotI, XhoI ; Sp6 et T7 : Promoteurs des ARN polymérases Sp6 et T7

Les sondes sens et anti-sens ont été synthétisées par transcription *in vitro*. La réaction a été réalisée dans un volume de 20 µL contenant 1 µg de vecteur linéarisé, du tampon à 1X (Invitrogen, France), les nucléotides ATP, GTP, CTP à 0,4 mM (Invitrogen, France), les nucléotides UTP à 0,27 mM (Invitrogen, France) et les UTP marqués à la digoxygénine (dig-UTP) à 0,38 mM (Roche, France) et 20U d'ARN polymérase T7 ou SP6 (Invitrogen, France). La transcription a été réalisée 2 heures à 37°C. La quantité d'ARN synthétisés a été évaluée par Dot Blot sur membrane de nylon avec une solution standard d'ARN marqués à la digoxygénine, DIG-labeled Control RNA (Roche, France) (diluée de 10 ng/µL à 10 pg/µL) et avec les sondes sens et anti-sens diluées de 5 ng/µL à 5 pg/µL. La fixation, le blocage des sites non spécifiques et la révélation ont été réalisés selon les recommandations du protocole Roche DIG Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization (VIII, 59-64).

iii. Hybridation *In Situ in toto* sur embryons de *R. balthica*

L'exposition des mollusques aux sondes marquées a été réalisée à l'aide d'un protocole adapté de Zimmerman *et al.*, 2013, Wei *et al.*, 2011 et de Hohagen *et al.*, 2015. Les mollusques précédemment exposés à de l'eau ANOR pour la condition témoin ou à la concentration de 10 µg/L d'oxazépam ont été isolés au stade véligère tardif. Les mollusques ont été récoltés puis immédiatement fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (masse/volume) pendant une nuit.

Les échantillons fixés ont ensuite été lavés 3 fois 5 minutes à température ambiante dans une solution de PBST 1X (Tampon Salin Phosphate 1X, Tween 20 à 0,1%) puis déshydratés par des bains successifs de 5 minutes de méthanol à 25, 50, 75 % de méthanol puis 2 bains de 5 minutes dans 100 % de méthanol. Après 1 heure dans un nouveau volume de méthanol, les échantillons déshydratés ont été stockés à -20 °C. Les échantillons ont été ensuite réhydratés en réalisant les mêmes bains que précédemment mais dans l'ordre inverse en finissant par 2 lavages de 5 minutes dans du PBST 1X. Les échantillons réhydratés ont été ensuite disséqués afin d'ôter la gangue et la membrane vitelline. Les embryons ont été perméabilisés au SDS à 0,5 % durant 10 minutes puis à la protéinase K à 35 µg/mL (dans le buffer suivant : 50 mM Tris à pH 7,5, 50 mM EDTA en eau DEPC) 10 minutes à température ambiante. La protéinase K a été inactivée par 2 bains de 5 minutes d'une solution de glycine à 0.2 % (masse/volume) dans du PBST 1X. Les échantillons ont été post-fixés 30 minutes à température ambiante dans du PFA 4% en PBST après 3 rinçages de 5 minutes dans du PBST 1X. Après 2 lavages de 5 minutes dans du PBST 1X, les embryons ont été traités 2 fois 15 minutes au DEPC 0,1 % dans du PBST (inactivation des RNAases). Suite à 3 lavages au PBST, les échantillons ont été préhybridés d'abord dans une solution composée de 50 % de PBST 1X et 50 % de solution d'hybridation (50 % de formamide, tampon Salin Sodium Citrate (SSC) à 5X, 50 µg/mL d'héparine, 100 µg/mL d'ADN de sperme de saumon, Tween 20 à 0,1 %) 5 minutes à température ambiante puis 5 minutes dans 100 % de solution d'hybridation à température ambiante et enfin durant 2 h15 dans ce même bain sous agitation, la solution ayant été renouvelée à l'issue des 15 premières minutes d'incubation. Les embryons ont ensuite été hybridés une nuit à 55°C dans la solution d'hybridation contenant les sondes d'ARN marquées au Dig-UTP diluées aux 1:500^e (soit entre 60 et 120 ng/mL selon les sondes) et au 1/1000^e (soit 30ng/ml) pour la sonde Béta Tubuline. Les sondes ont été préalablement dénaturées 10 minutes à 70 °C puis immédiatement refroidies à 4°C. Les embryons ont ensuite été lavés 3 fois 15 minutes à 55 °C dans la solution I (50 % formamide, SSC 5X, Tween 20 à 0,1 %) puis une fois à 55°C avec une solution composée à 50% de solution I et de 50% de solution II (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl à pH 7,5 et Tween 20 à 0,1 %). Les échantillons ont été ensuite lavés 3 fois 5 minutes avec la solution II puis incubés 2 fois 30 minutes dans la solution II contenant de la RNase A (100 µg/µL) et de la RNase T1 (100 U/µL) à 37 °C. Les échantillons ont ensuite été lavés 2 fois 30 minutes à 55 °C avec la solution III (50 % formamide, SSC 2X, Tween 20 à 0,1 %) puis 3 fois 5 minutes dans du PBST 1X à température ambiante. Les échantillons ont été bloqués 2 fois 1 heure dans une solution de PBST:BSA à 100 mg/mL (Bovine serum albumin) à 10 °C. La solution de blocage a été éliminée puis le marquage a été réalisé pendant 10 heures à 10 °C avec une solution d'anticorps Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments from sheep à 0,75 U/µL (Roche, France), diluée au 1 :3000^e dans la solution de PBST:BSA.

Les échantillons ont été lavés 15 fois 10 minutes avec une solution de PBST 1X à température ambiante puis 2 fois 10 minutes avec du tampon 3 (0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1 M Tris à pH 9,5). La coloration a été initiée à l'aide d'une solution de NBT:BCIP (Roche, France) diluée au 1 :50^{ème} dans le tampon 3 sans MgCl₂. La coloration a été stoppée après 4 heures pour la Béta Tubuline et après 18 heures pour les autres gènes. Les échantillons ont ensuite été lavés 3 fois 10 minutes avec du PBST 1X, 2 fois 5 minutes avec une solution de glycine à 0,1 M et à pH 2, 3 fois 5 minutes dans du PBST 1X puis post-fixées 12h à 4 °C avec une solution de PFA à 4 % /PBST 1X. Les échantillons ont ensuite été lavés 2 fois 10 minutes dans du PBST 1X puis dans une solution de glycérol à 50% et enfin stockés dans une solution de glycérol à 80 % à 4 °C.

e. Extraction de l'ARN total de *S. polychroa* et traitement statistique pour l'étude de la réponse transcriptomique par RT-qPCR

Au terme de l'exposition, 7 planaires par répliques et par condition ont été isolées à raison d'une planaire par tube. Chaque planaire a été conservée dans 100 µL de RNA later (Ambion by Life Technologies, France) avant de réaliser l'extraction d'ARN. Le broyage a été réalisé avec 1000 µL de TRIzol® Reagent (Life Technologie, France) ajouté au mélange RNA later/planaire à l'aide de pistons stériles RNase et DNase free. Par la suite, l'extraction, la précipitation et le lavage des ARNs ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur (TRIzol® Reagent, Life Technologies, France). Les ARNs ont ensuite été solubilisés dans 20 µL d'eau traitée au DEPC (diéthyle-pyrocabonate, Sigma, France).

Les échantillons d'ARNs extraits ont été traités à la DNase I avec le kit DNA Free kit (Ambion by Life Technologies, France) selon les recommandations du fabricant, afin d'éliminer la présence d'ADN dans les échantillons. La qualité et la concentration ont été mesurées avec un Nanodrop 2000TM (Thermo Scientifique, France) puis les échantillons ont été stockés à -80 °C.

Une reverse transcription (RT) a ensuite été réalisée sur 500 ng d'ARN total dilués dans 10 µL d'eau traitée au DEPC. La réaction de transcription a été réalisée avec des random hexamer, à l'aide du kit M-MLV (Invitrogen, France) selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc synthétisés ont été ensuite dilués au 1/5^e pour diluer les inhibiteurs de PCR présents dans les échantillons.

La méthodologie utilisée pour l'amplification en RT-qPCR de l'étude transcriptomique est la même que celle du III. a.. Le protocole utilisé pour le dessin et la validation des amorces est identique au III. a., mais l'étude en puce Fluidigm (Biomarck) a été réalisée sur 2 puces différentes car il y avait cette fois 14 échantillons par conditions à tester avec 3 conditions par médicaments. Ainsi nous avons réalisé une puce avec les échantillons issus des planaires exposées à l'oxazépam, sertraline ainsi que de 7 témoins. La deuxième puce a été réalisée avec ceux issus des planaires exposées à la

carbamazépine, la cyamémazine ainsi que de 7 témoins. La méthode utilisée pour le traitement statistique des résultats est la même que celle du III.a..

f. Dosage de l'activité hydrolytique de la trypsine

L'activité enzymatique de la trypsine a été déterminée selon la méthode de Garcia-Carreño et Haard (1993), adaptée de Charron 2014 et adaptée à *S. polychroa* (García-Carreño and Haard 1993; Charron 2014). Cette technique utilise comme substrat le N α -benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA) (Sigma-Aldrich®, France). La trypsine, par hydrolyse de la liaison amide du substrat, libère deux composés, la N α -benzoyl-L arginine (N α -BA) et la p-nitroaniline (pNA) (produit de couleur jaune avec un λ_{max} de 410 nm). Ainsi, la formation de pNA peut être suivie en mesurant l'absorbance de ce produit à 410 nm (Figure 39).

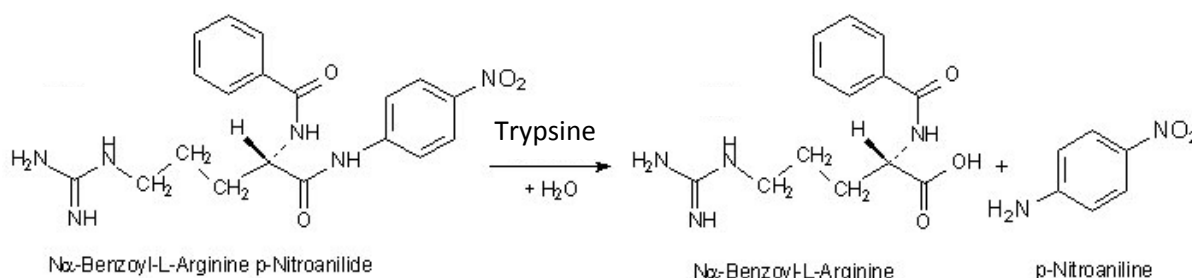


Figure 39 : Réaction de l'hydrolyse du BAPNA en N α -BA et pNA par la trypsine.

Trois planaires par réplicat de chaque condition ont été poolées dans un tube de 1,5 mL et conservées à -80 °C pour réaliser le dosage de l'activité hydrolytique de la trypsine. Le broyage des échantillons a été réalisé dans 15 μ L de tampon de broyage Tris-HCl (0,01M à pH 7) par mg de tissu à l'aide d'un piston jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 15000 x g pendant 30 min à 4 °C. Vingt microlitres de surnageant ont été utilisés pour le dosage des protéines totales des échantillons, le reste du surnageant étant utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique de la trypsine. Les tubes ont été conservés à -80 °C.

La concentration en protéines totale des échantillons a été déterminée selon la méthode de Bradford (1976) en diluant les échantillons au 1/3. Un millilitre de liquide de Bradford a été ajouté à 20 μ L de cette dilution et le mélange a été vortexé puis placé 30 minutes à l'obscurité. La densité optique de l'échantillon a été alors mesurée au lecteur de plaque Infinite®200 PRO (TECAN, France) à une longueur d'onde de 595 nm. Une gamme étalon a été réalisée parallèlement à partir de 4 concentrations de sérum d'albumine bovine (BSA) à 125, 250, 500 et 750 μ g/mL afin de déterminer les concentrations de protéines présentes dans l'échantillon et exprimées en mg/mL. Des blancs ont été réalisés en remplaçant le volume d'échantillon par un volume de tampon de broyage Tris-HCl.

Le dosage de l'activité de la trypsine a été réalisé avec une solution de BAPNA à 3mM et à pH 8, préparé avec un tampon Tris-Base (50mM), CaCl_2 (20mM) et DMSO (diméthylsulfoxyde). Au moment du dosage enzymatique, 0,5 mL de substrat a été ajouté aux 0,2 mL d'extrait enzymatique. L'échantillon a été ensuite incubé 10 minutes à 45 °C. Pour interrompre la réaction, 0,5 mL d'acide acétique à 30% a été ajouté au mélange. La quantité de produits formés à l'issue de la réaction a été mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 410 nm. Des blancs ont été également préparés en incubant l'extrait enzymatique seul et en ajoutant le substrat après l'acide acétique. Le calcul de l'activité enzymatique de chaque enzyme a été réalisé à partir d'une gamme étalon de p-nitroaniline (Sigma-Aldrich®, France) avec des concentrations comprises entre 0 et 0,3 mM. Les activités enzymatiques obtenues ont été ramenées à la quantité de protéines totale dans l'échantillon et exprimées en Katal/mg de protéines.

L'analyse des résultats a conduit à un traitement statistique afin de déterminer les différences significatives entre chaque essai par rapport au témoin. Les tests ont été réalisés à l'aide du logiciel R (version 3.2.3). Un modèle linéaire généralisé (GLM) de type ANOVA a été appliqué sur les résultats puis les résidus de l'ANOVA ont été représentés graphiquement afin de vérifier l'homoscédasticité des résultats. Ensuite, un test post-hoc de Student avec une correction de Bonferroni ont été réalisés. Pour finir, un test de Duncan avec un degré de confiance de 0,95 a permis d'assigner les groupes d'appartenances de chaque condition.

CHAPITRE 3 : LES PSYCHOTROPES PERTURBENT-ILS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU *R. BALTHICA* ?

I. Cinétiques de dégradation des psychotropes

Afin de nous assurer que les molécules ne se dégradent pas au cours de l'exposition des embryons de mollusques nous avons réalisé une cinétique de dégradation par HPLC des 4 molécules étudiées pendant 10 jours (pour l'exposition des planaires, les solutions de médicaments ont été renouvelées tous les 2 ou 3 jours).

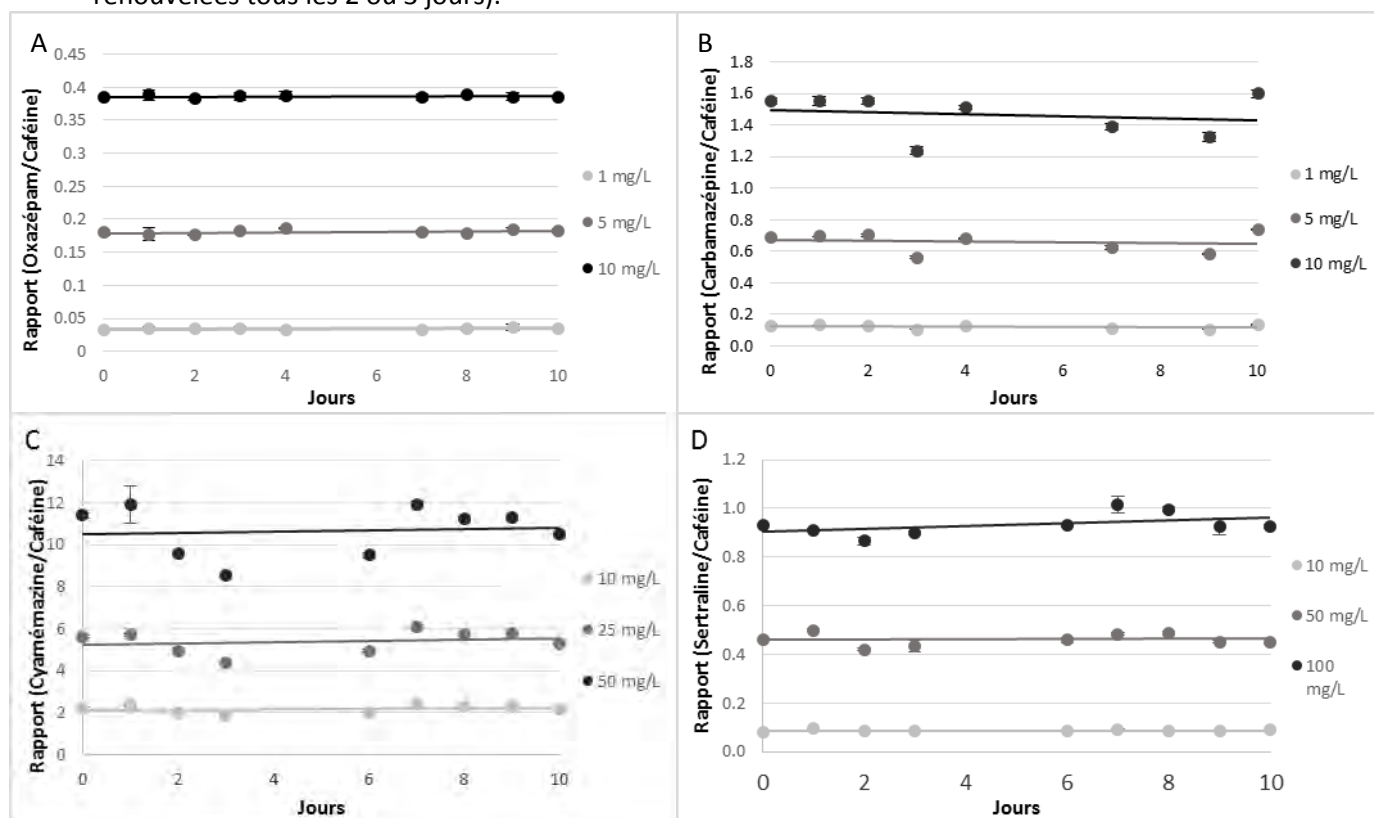


Figure 40 : Cinétique de dégradation de l'oxazépam (A), la carbamazépine (B), la cyamémazine (C) et la sertraline (D) dans les conditions d'exposition des embryons de mollusques, mais sans les organismes. Les rapports ont été calculés à l'aide d'un standard interne très stable au cours du temps (la caféine).

La figure 40 présente les résultats de la cinétique de dégradation des molécules médicamenteuses en condition d'exposition des embryons de mollusques. On peut constater que ces molécules ne se dégradent pas au cours des 10 jours d'exposition des embryons de *Radix*. Le volume d'un mollusque juvénile (environ $0,05 \text{ mm}^3$ ($500 \times 400 \times 250 \text{ }\mu\text{m}$)) ne représente que 0,013 % du volume d'exposition (300 μL), nous faisons l'hypothèse qu'au cours des 10 jours d'exposition le mollusque ne peut pas absorber toutes les molécules de médicaments et reste donc en contact avec celui-ci tout au long de l'exposition.

II. Étude de l'embryotoxicité de quatre psychotropes sur le *R. balthica*

Cette première partie est consacrée à l'étude de l'impact de chaque psychotrope sur le développement embryonnaire du *R. balthica*. Afin d'étudier l'effet de ces molécules, nous avons choisi de suivre le développement d'embryons de *R. balthica* exposés du stade trochophore jusqu'à l'éclosion. Le retard d'éclosion des embryons a été mesuré après 8 jours d'exposition aux médicaments, puis comparé aux témoins que nous avons analysés.

a. Étude des perturbations du développement embryonnaire du *R. balthica* exposé à l'oxazépam (OXZ)

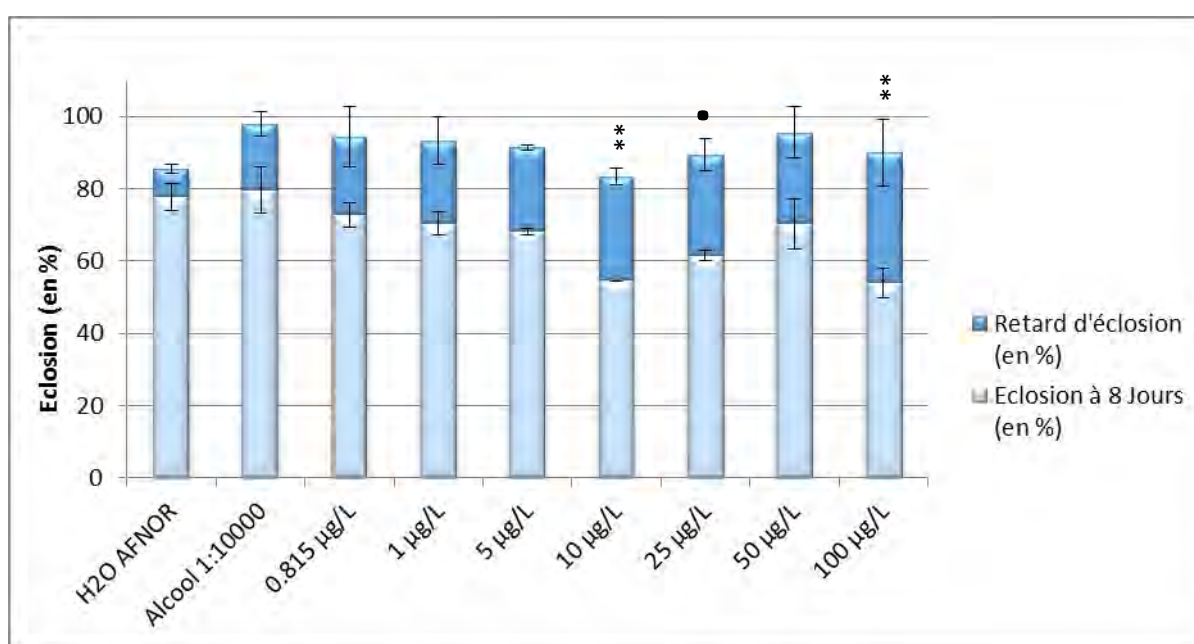


Figure 41 : Évaluation de la toxicité embryonnaire de l'oxazépam sur le mollusque *R. balthica*. (% moyen $\pm$ ET) (Test du χ^2 , p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

La figure 41 représente le taux d'éclosion moyen des mollusques exposés à différentes concentrations d'OXZ. Les valeurs moyennes des deux témoins (H₂O AFNOR et Alcool 1:10000) ne montrent pas de différence significative. Les pourcentages d'éclosion à 8 jours pour l'eau AFNOR et l'alcool (1:10000) sont respectivement de 77,7 % et de 79,5 %. De ce fait, on peut considérer que l'alcool n'a pas d'effet sur le taux d'éclosion du *R. balthica* et valide ainsi notre méthode de solubilisation des molécules. Par la suite, la significativité des résultats a été déterminée par comparaison du témoin alcool aux expositions à l'OXZ. Les organismes exposés à 10 (p-value < 0.05), 25 (p-value = 0.096) et à 100 µg/L (p-value < 0.05) d'OXZ présentent un retard significatif d'éclosion. A l'issue de ce test d'embryotoxicité, on peut déterminer pour l'OXZ une LOEC à 10 µg/L et une NOEC à 5 µg/L. Deux pics d'inhibition du développement embryonnaire peuvent être observés (de 10 à 25

et 100 µg/L) avec entre les deux un développement embryonnaire normal pour la concentration 50 µg/L.

b. Étude des perturbations du développement embryonnaire du *R. balthica* exposé à la carbamazépine (CBZ)

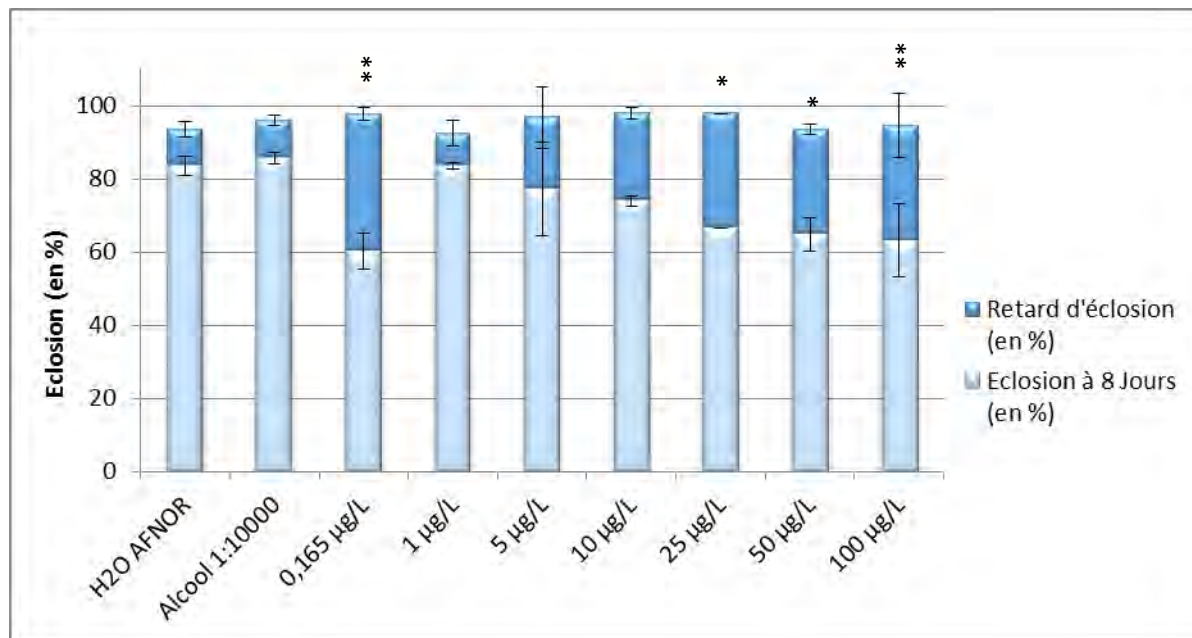


Figure 42 : Évaluation de la toxicité embryonnaire de la carbamazépine sur le mollusque *R. balthica*. (% moyen $\pm$ ET) (Test du χ^2 , p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

Les résultats des tests d'embryotoxicité de la carbamazépine sont présentés sur la figure 42. Les organismes exposés à 0,165, 25, 50 et 100 µg/L de CBZ présentent un retard significatif d'éclosion par comparaison au témoin alcool. A l'issue de ce test d'embryotoxicité, on peut déterminer pour la CBZ une LOEC à 0,165 µg/L. On observe, comme pour l'OXZ, deux pics d'inhibition du développement embryonnaire (0,165 et 25 à 100 µg/L) avec entre les deux plages d'inhibition un développement embryonnaire sans retard d'éclosion significatif.

c. Étude des perturbations du développement embryonnaire du *R. balthica* exposé à la cyamémazine (CYZ)

Les organismes exposés à 100 µg/L de CYZ présentent un retard significatif d'éclosion par comparaison au témoin alcool. Grâce à ce test d'embryotoxicité, on peut déterminer pour la CYZ une LOEC à 100 µg/L et une NOEC à 50 µg/L (Figure 43).

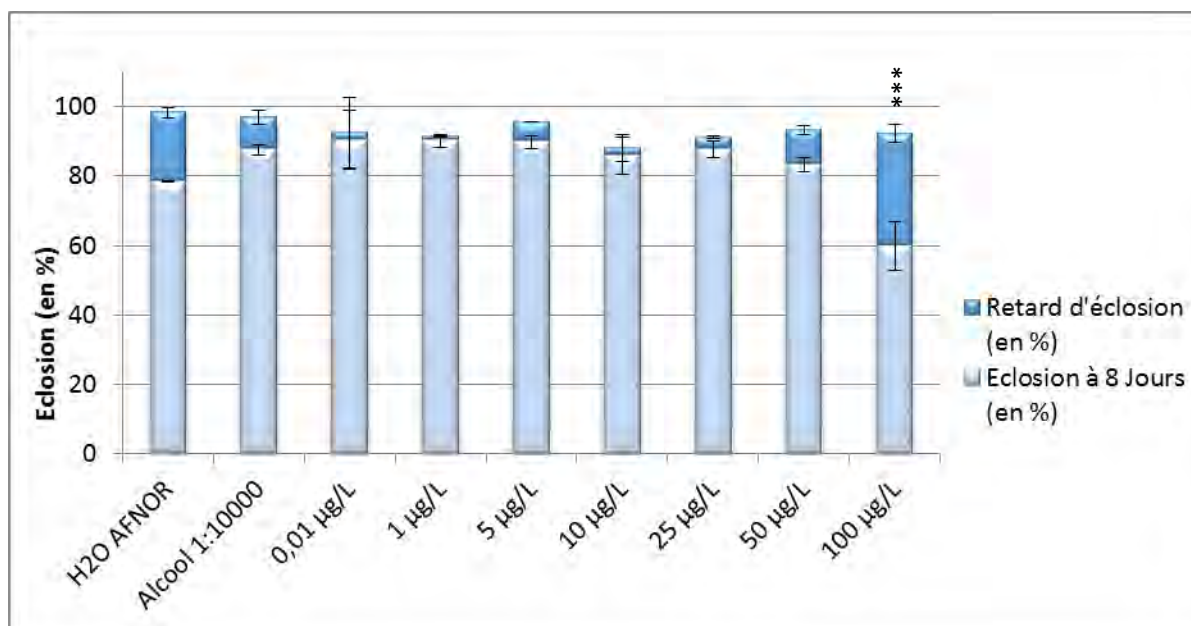


Figure 43 : Évaluation de la toxicité embryonnaire de la cyamémazine sur le mollusque *R. balthica*. (% moyen $\pm$ ET) (Test du χ^2 , p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

d. Étude des perturbations du développement embryonnaire du *R. balthica* exposé à la sertraline (SRT)

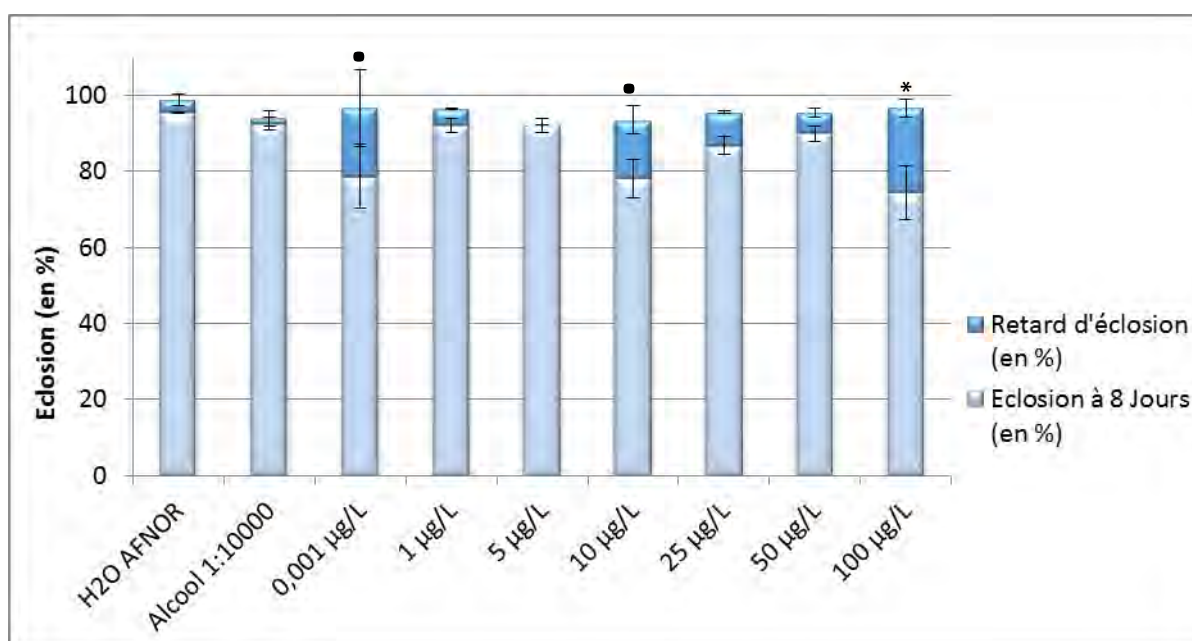


Figure 44 : Évaluation de la toxicité embryonnaire de la sertraline sur le mollusque *R. balthica*. (% moyen $\pm$ ET) (Test du χ^2 , p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

La figure 44 présente les résultats du test d'embryotoxicité de la sertraline. Les organismes exposés à 0,001, 10 et 100 µg/L de SRT présentent un retard significatif d'éclosion par comparaison au témoin alcool avec des p-values respectives de 0,099, 0,079 et < 0,05. A l'issue de ce test d'embryotoxicité, on peut déterminer pour la SRT une LOEC à 0,001 µg/L (Figure 44).

e. Bilan et discussion de l'embryotoxicité des 4 médicaments sur le *R. balthica*

Le développement embryonnaire est composé de plusieurs phases durant lesquelles de nombreuses protéines sont synthétisées et interviennent dans le centre d'acquisition du plan d'organisation (polarisation, feuillet et organogenèse). Cette étape du développement d'un organisme est donc très sensible à toutes variations ou contaminations physico-chimiques et biologiques. Le développement embryonnaire étant le stade où les organismes sont les plus sensibles, nous avons supposé que les psychotropes pourraient impacter ce stade chez le *R. balthica*.

L'exposition des embryons de *R. balthica* à chacune des quatre molécules médicamenteuses étudiées a permis de déterminer l'effet de ces médicaments sur le développement embryonnaire du *Radix* représenté par le retard à l'éclosion (Tableau 11). On peut constater que les effets sont molécules dépendants et que le *Radix* n'a pas le même seuil de sensibilité pour toutes les molécules. Pour l'OXZ, on a pu mesurer une LOEC à 10 µg/L, alors que pour la CBZ on a relevé une LOEC à 0,165 µg/L. Enfin, pour la CYZ et la SRT, on enregistre deux LOEC respectives de 100 et 0,001 µg/L. Ces résultats suggèrent que, concernant ce paramètre, le *Radix* est plus sensible à la SRT et à la CBZ qu'à l'OXZ et à la CYZ.

Tableau 11: Bilan des perturbations du développement embryonnaire du *Radix* par les psychotropes

	Eclosion à 8 jours	Eclosion à plus de 8 jours
Témoin Alcool	≈ 88 % d'éclosion	≈ 99 % d'éclosion
Oxazépam	⊃ 10, 25 et 100 µg/L	Pas d'effet
Carbamazépine	⊃ 0,165, 25, 50 et 100 µg/L	Pas d'effet
Cyamémazine	⊃ 100 µg/L	Pas d'effet
Sertraline	⊃ 0,001, 10 et 100 µg/L	Pas d'effet

i. Oxazépam

L'OXZ retarde significativement le développement embryonnaire du *Radix* de façon non linéaire. On constate un retard du développement embryonnaire pour une exposition à 10 et 25 µg/L, à 50 µg/L on ne constate aucun effet significatif de l'OXZ et enfin on retrouve un effet pour une exposition à 100 µg/L d'OXZ. Les travaux de Huerta *et al.* (2016) montrent que l'OXZ inhibe le déplacement du poisson *Pimephales promelas* à 4,7 µg/L, mais n'a pas d'effet à 0,8 et 30,6 µg/L. Une quantification de l'OXZ dans différents compartiments du poisson après exposition à différentes concentrations d'OXZ a également été réalisée dans cette étude, suivie d'un calcul des facteurs de bioconcentration (FBC). Il en résulte que la bioconcentration de l'OXZ est fonction du tissu étudié ainsi que de la concentration d'exposition, comme le montre cette étude ainsi que celle d'Heynen *et al.*, 2016. Les auteurs (Huerta *et al.* 2016) observent un FBC de 10 pour la plus faible concentration étudiée (0,8 µg/L) et de 3,3 pour la plus forte concentration étudiée (30,6 µg/L) (Huerta *et al.* 2016).

Dans le cerveau, on constate des FBC très différents de ceux du plasma avec un FBC de 51 pour une exposition des organismes à 0,8 µg/L et un FBC de 4,8 pour une exposition à 30,6 µg/L. Il est évident que la bioconcentration de l'OXZ est dépendante de la concentration de l'OXZ dans le plasma, puisque c'est celui-ci qui perfuse les différents organes. Les plus forts taux d'OXZ ont été retrouvés dans le cerveau et le foie des poissons. Ces résultats montrent que l'OXZ s'accumule différemment dans les organes d'un organisme aquatique en fonction de la concentration en médicament du milieu dans lequel il est exposé. Ceci pourrait partiellement expliquer les effets doses-spécifiques de l'OXZ sur le développement embryonnaire du *Radix*. En effet, chaque concentration utilisée pourrait entraîner une bioconcentration et donc une concentration différente d'OXZ dans les organes. L'OXZ pourrait donc atteindre des seuils de réponses spécifiques des différents processus cellulaires de manière organes-spécifiques. Ce phénomène de réponses doses-spécifiques a également été observé sur des organismes aquatiques exposés à d'autres antidépresseurs (Ankley *et al.* 2010; Minguez *et al.* 2014; Estévez-Calvar *et al.* 2016).

ii. Carbamazépine

Comme on a pu le voir dans les résultats, la carbamazépine à 0,165, 25, 50 et 100 µg/L allonge le temps nécessaire aux embryons de *R. balthica* pour arriver à l'éclosion. L'étude de Bendz *et al.* (2005) a évalué la toxicité de la CBZ sur l'activité du gammare (*Gammarus pulex*). Cette étude montre une LOEC de 0,01 µg/L, soit 10 fois plus faible que celle du *Radix*. Cependant, cette étude évalue une réponse comportementale (la mobilité) du gammare et non un effet sur le développement embryonnaire. Contrairement à notre étude, qui a montré un retard de développement pour les embryons de *Radix* exposés à la CBZ, van den Brandhof and Montforts (2010), ont quant à eux, montré un effet embryotoxique de la CBZ sur les larves de poisson-zèbre exposées 72h à 12,5 mg/L, qui se manifeste par une courbure de la queue. L'équipe d'Oropesa *et al.* (2016) a montré que la CBZ n'a pas d'effet sur l'exposition directe d'embryons de *D. magna*. Par contre, ils ont montré que l'exposition maternelle de *D. magna* à des concentrations de CBZ de 10 à 200 µg/L impacte le développement embryonnaire de la descendance. Jusqu'à 61% des juvéniles présentaient des anomalies morphologiques comme une courbure de l'extrémité apicale du manteau (la région caudale), anomalie la plus fréquemment rencontrée suite à l'exposition à la CBZ (Oropesa *et al.* 2016). La CBZ induit donc des effets transgénérationnels sur la daphnie. Pour poursuivre nos travaux, il serait donc intéressant de mener des études de l'impact transgénérationnel des psychotropes sur le *Radix*. Mu et LeBlanc (2002) qui ont mis en évidence la présence d'anomalies du développement chez les embryons de daphnies exposés à la CBZ expliquent ce phénomène par la diminution du taux de 20-Hydroxyecdysone (20-HE ou ecdysone) dans l'organisme, hormone qui contrôle chez les arthropodes, l'embryogenèse, la mue et la métamorphose. En effet, les études de Subramoniam

(2000) et de Mu et LeBlanc (2002) montrent que la CBZ empêche la migration de l'ecdysone maternelle vers les embryons de daphnie, seule source d'ecdystéroïde des stades précoces du développement embryonnaire et principale hormone impliquée dans le contrôle de l'embryogenèse. Des résultats similaires de Mu et LeBlanc (2002), montrent que le fenarimol (un fongicide) agit, de la même façon que la CBZ, comme un anti-ecdystéroïde en diminuant les taux d'ecdysone endogène chez *D. magna*. Comme l'ont montré Whitehead et Sellheyer, 1982 l'ecdysone est présente chez les mollusques et intervient lors de la calcification de la coquille chez *L. stagnalis*. Ainsi, le retard d'éclosion observé lors du test d'embryotoxicité pourrait être en partie liée à l'inhibition de l'ecdysone et même provoquer une mauvaise calcification de la coquille des *Radix*. De plus, ces résultats suggèrent que la CBZ pourrait aussi impacter la descendance des *Radix* dont les parents auraient été exposés à la CBZ.

iii. Cyamémazine

La CYZ semble peu impacter le développement des embryons de *Radix*. En effet, on observe un retard de développement significatif uniquement pour une concentration à 100 µg/L. Chez le poisson médaka, la CYZ est la molécule présentant la plus faible toxicité des molécules testées (Chiffre *et al.* 2016). Cette étude portant sur la toxicité de plusieurs molécules médicamenteuses sur le poisson médaka (*Oryzias latipes*), propose une LOEC (létalité) à 1220 µg/L, soit environ 10 fois plus élevée que la LOEC du *Radix*. Morlière *et al.* (2004) ont évalué la toxicité de la CYZ sur une culture de fibroblastes humains et de kératinocytes humains. Il ressort de cette étude des DL₅₀ respectives de 80,8 µg/L (0,25 µM) et de 160 µg/L (0,5 µM). La toxicité de la CYZ a aussi été évaluée par l'étude de Crumb *et al.* (2006), portant sur l'impact de la CYZ sur les courants ioniques de cellules rénales embryonnaires humaines (HEK 293) et sur myocytes humains. Il en résulte que la CYZ à 323 µg/L (1µM) diminue significativement le flux d'ions calciums de 18%. Les flux de potassium et de sodium ne semblent pas être impactés. L'impact de la CYZ sur les flux calciques pourrait être à l'origine du retard de développement chez le *Radix*. Les ions calciums sont souvent à l'origine de nombreux grands mécanismes cellulaires tels que l'exocytose, la contraction musculaire ou encore la conduction nerveuse (Heidelberger *et al.* 1994; Jung and Craig 2008). De ce fait, le retard d'éclosion observé pourrait en partie provenir de l'inhibition partielle des flux calciques.

iv. Sertraline

Plusieurs études montrent que l'exposition à la SRT entraîne des effets non linéaires et à de faibles concentrations. L'étude de Chiffre *et al.* (2016) a montré que la SRT a un effet létal à de faibles concentrations sur des larves de poissons médaka, dès 10 µg/L. Les travaux d'Estèvez-Calvar *et al.*, (2016) ont montré des effets létaux et d'immobilisations significatifs sur *Brachionus plicatilis* exposé 48h à de faibles concentrations de SRT. Ils observent un effet à 0,001 µg/L, équivalent à une

concentration environnementale de la SRT, puis les effets disparaissent pour de plus fortes concentrations en SRT. D'autres études montrent un impact de la SRT à de faibles concentrations : une CE_{50} de 67 $\mu\text{g/L}$ chez *C. gigas* (Minguez *et al.* 2014), une vitesse de déplacement significativement augmentée sur *E. marinus* dès 0,01 $\mu\text{g/L}$ (Bossus *et al.* 2014), une CE_{50} de 206 $\mu\text{g/L}$ et une LOEC de 10 $\mu\text{g/L}$ sur des embryons de moules *Mytilus galloprovincialis* (Estévez-Calvar *et al.* 2016). Tout comme dans les travaux d'Estévez-Calvar *et al.*, (2016), nous observons un effet de la SRT à 0,001 $\mu\text{g/L}$ puis aucun effet significatif n'est observable pour de plus fortes concentrations, puis on retrouve l'effet à 10 puis à 100 $\mu\text{g/L}$. Ces résultats suggèrent que la SRT a un effet non linéaire et spécifique de la concentration étudiée, comme il l'a été décrit précédemment sur d'autres organismes aquatiques exposés à des antidépresseurs (Ankley *et al.* 2010; Minguez *et al.* 2014; Estévez-Calvar *et al.* 2016; Huerta *et al.* 2016). Chez les mammifères, comme chez les invertébrés, il a été montré que la sérotonine intervient dans de nombreux processus du développement embryonnaire (Sullivan and Levin 2016). La sertraline étant un inhibiteur de la recapture de la sérotonine, on peut supposer que cette molécule perturbe les gradients de sérotonine au sein de l'embryon, pouvant être à l'origine des retards d'éclosion observés pour les concentrations environnementales citées ci-dessus.

v. *Bilan*

Si nous nous intéressons aux effets environnementaux des psychotropes, seules la CBZ et la SRT perturbent le développement embryonnaire des Radix aux concentrations d'occurrence en milieux aquatiques, respectivement 0,165 et 0,001 $\mu\text{g/L}$, laissant suggérer un impact sur les populations de ce mollusque. En effet, les œufs de Radix sont pondus directement sur le substrat et ne sont protégés que par la gangue qui est perméable à de nombreuses molécules (observations personnelles). Malgré cette gangue, ces œufs sont la proie de nombreux prédateurs tels que les écrevisses, les poissons ou encore les oiseaux. Ainsi, plus la durée du développement embryonnaire est longue, notamment en présence de psychotropes, plus les embryons de Radix sont susceptibles d'être consommés par un prédateur avant leur éclosion. Cela pourrait donc conduire à une diminution des effectifs des populations de Radix exposées à ces deux molécules dans l'environnement. La chute des effectifs de Radix (consommateur primaire) dans les cours d'eau pourrait conduire à favoriser la croissance des algues et des bactéries contenues dans les biofilms benthiques normalement consommée par les mollusques. On peut donc imaginer que les retards de développement observés chez le Radix peuvent être transposés à d'autres mollusques dulçaquicoles. Ainsi, un déséquilibre entre les différents niveaux trophiques pourrait apparaître dans les cours d'eau exposés aux psychotropes. C'est donc toute l'organisation et le fonctionnement des écosystèmes qui vont être perturbés par une exposition aux psychotropes. Nos résultats tendent à envisager que les

réseaux trophiques des cours d'eau soumis à ce type de contaminants seront déstructurés au risque de voir l'extinction de certaines espèces très sensibles à la réorganisation et à la pollution des cours d'eau. De ce fait, il pourrait être intéressant de faire des études transgénérationnelles afin de mettre en avant une adaptation ou au contraire une disparition des populations des organismes exposés aux psychotropes. De la même manière, des études en mésocosmes en prenant en compte l'ensemble d'une structure trophique pourrait permettre d'appréhender les effets envisagés de désorganisation du fonctionnement et de la structure d'un écosystème. Pourrait-il y avoir une réorganisation ? Une adaptation ? ou au contraire, une forte inhibition de la dynamique des populations ?

III. Séquençage du transcriptome et analyse en différentiel de la réponse transcriptomique du *R. balthica* exposé à l'oxazépam

Le séquençage du transcriptome de *R. balthica* a été réalisé en conditions différentielles avec deux conditions d'exposition à l'oxazépam, 10 µg/L (TA) et 0,815 µg/L (TB) et une condition témoin (Alcool 1:10000). Six répliquats par condition ont été séquencés. Les traitements bio-informatiques tels que l'assemblage des "reads" (fragment de 200 paires de bases (pb) issu du séquençage), l'annotation des contigs issus de l'assemblage et la création d'un tableau de données regroupant le nombre de fois où chaque contig (en ligne) a été compté dans chaque répliquat, ont été réalisés par la plateforme de bio-informatique UMIAT (UR0875, INRA, Castanet-Tolosan). Les séquences des 18 librairies ont été soumises sur l'Archive Européenne des Nucléotides (ENA) et sont en libre accès avec le numéro d'accèsion PRJEB12711 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB12711>). L'ensemble des résultats de cette partie a été soumis et accepté pour publication dans le journal "Ecotoxicology".

a. Analyse du séquençage

i. Description

Le séquençage des 18 librairies a produit un total de 503 171 850 reads représentés sur la figure 45. La quantité de reads obtenus par librairie varie entre 8 millions et 18 millions.

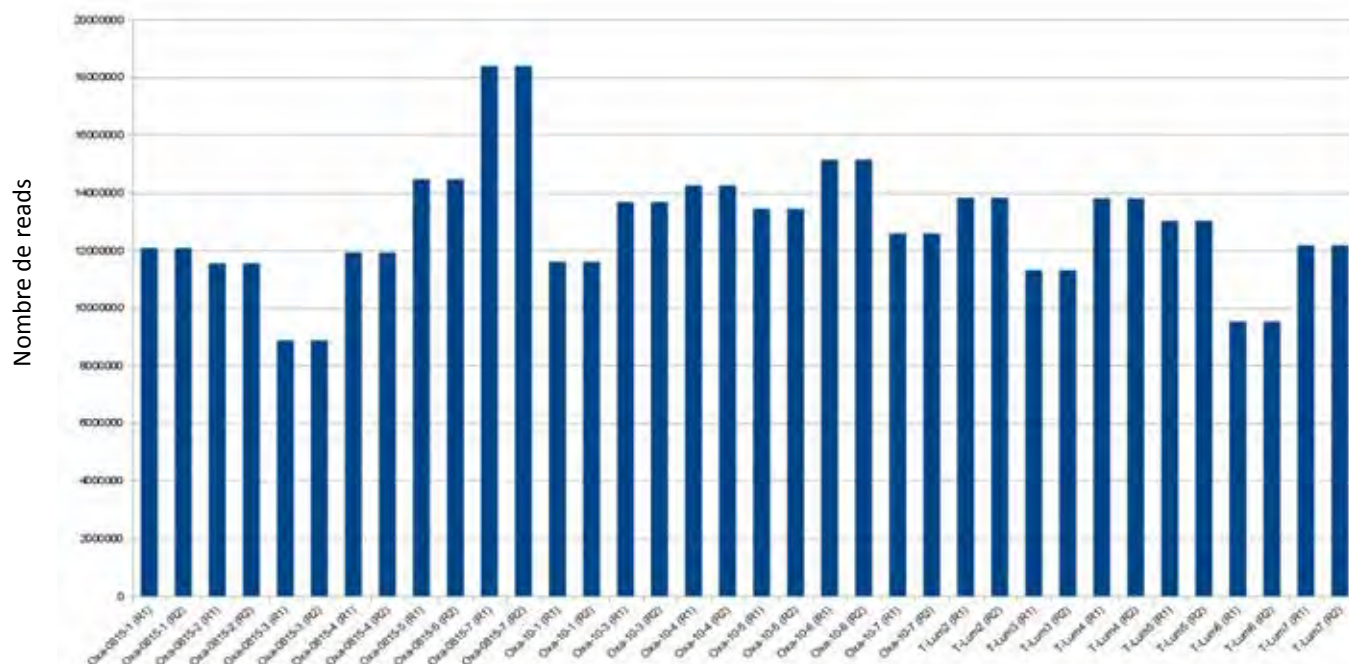


Figure 45 : Représentation du nombre de reads obtenus après le séquençage de chaque librairie

Après séquençage, une recherche des contaminations a permis d’apprécier la qualité de la préparation des échantillons et donc *in fine* la qualité du transcriptome (Figure 46). Les

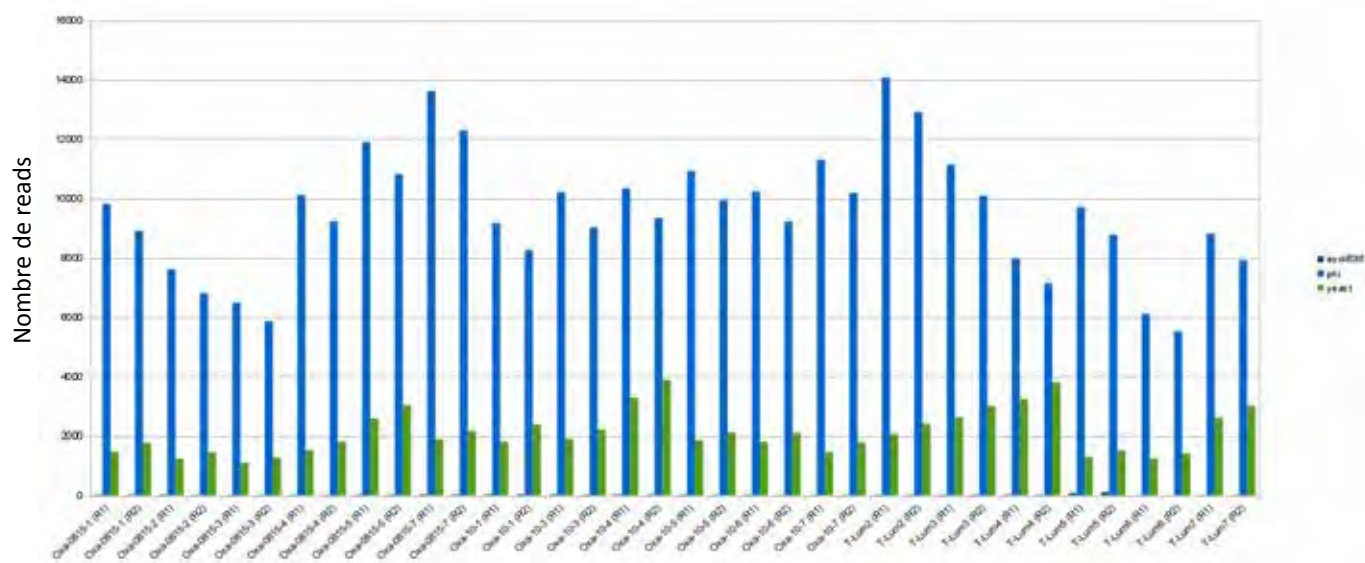


Figure 46 : Représentation de la contamination moyenne de chaque librairie. Bleu majoritaire : *E. coli* 536, Vert : Levures, Bleu clair : phi174

La quantité de reads contaminants pour chaque échantillon est corrélable avec la quantité totale de reads de l’échantillon (Figure 45). On observe donc en moyenne pour la contamination par *E. coli* 536, 800 reads contaminants par millions de reads de l’échantillon. Pour la contamination par phi X174, on observe une contamination très faible d’environ 150 reads par millions de reads de l’échantillon.

Avant l’assemblage, il a été nécessaire de réaliser un nettoyage des séquences afin d’éliminer les fragments trop courts et les fragments redondants présents en très grand nombre. Cette étape a

été réalisée à l'aide des logiciels Trim_galore et Trinity qui améliorent grandement la qualité de l'assemblage. La figure 47, présente le nombre de reads par réplicat pour chaque condition.

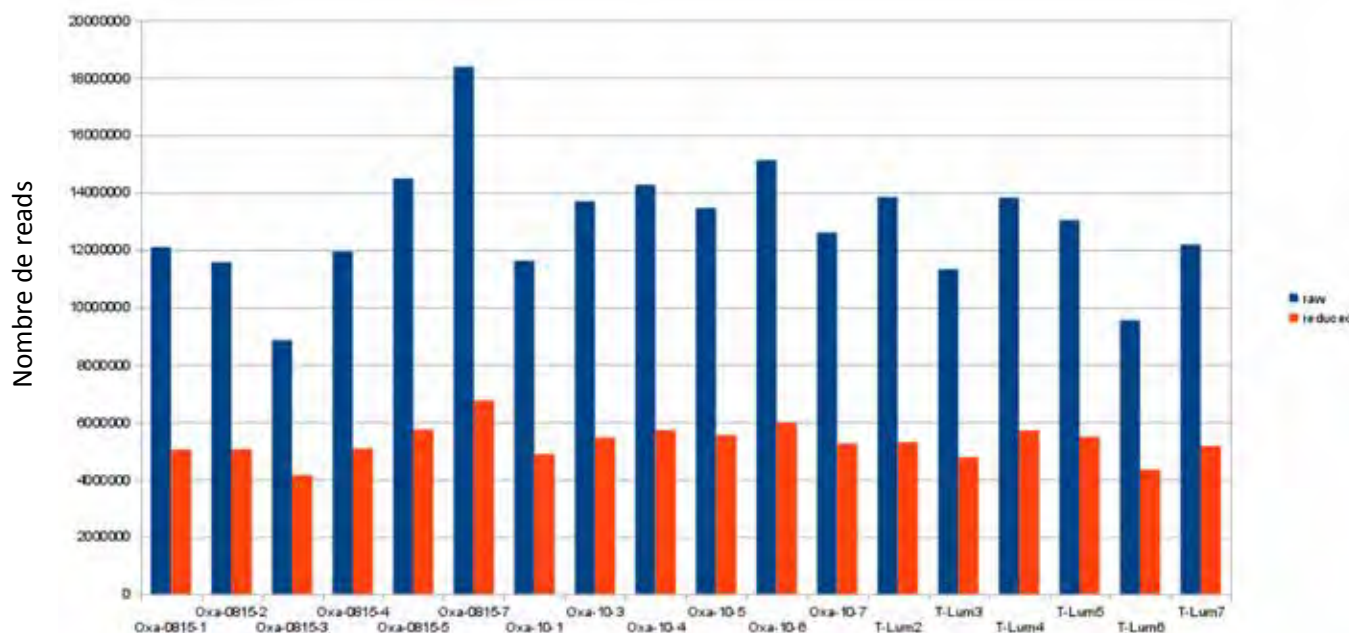


Figure 47 : Graphique représentant le nombre de reads après "nettoyage" des fragments trop courts, trop longs ou redondants.

Le nettoyage des reads a permis d'éliminer un total de 39 759 772 reads, aboutissant au final à un total de 463 412 078 reads.

ii. Bilan

La quantité de reads obtenus lors du séquençage d'un transcriptome varie en fonction de l'espèce étudiée, du nombre d'individus dans l'échantillon, du nombre de transcrits présents ainsi que de la complexité transcriptomique de l'espèce (épissage alternatif plus ou moins important).

La contamination observée lors du contrôle après séquençage ne dépasse pas les contaminations classiques rencontrées lors des études de séquençage et n'altère en rien la qualité des résultats (Strong *et al.* 2014).

b. Analyse de l'assemblage et du réalignement (mapping) des reads.

i. Assemblage

L'assemblage des reads aboutit à 56 435 contigs (fragments de séquences nucléotidiques) de tailles variables, ici entre 200 et 42 475pb (Figure 48).

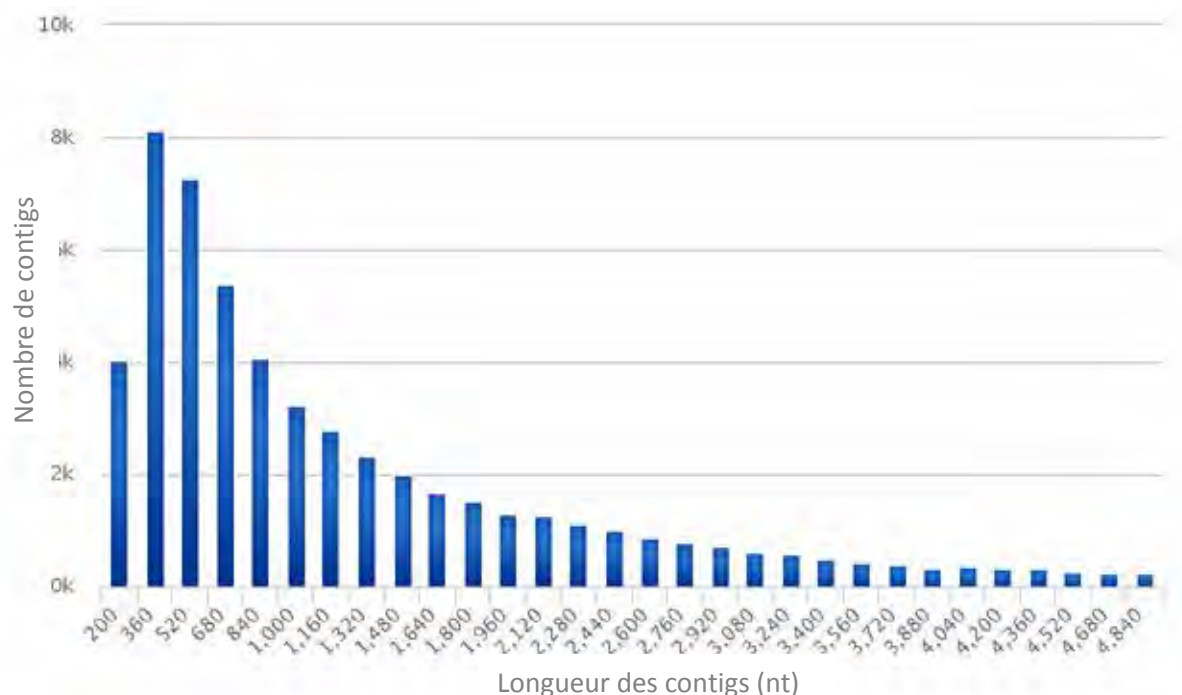


Figure 48 : Diagramme représentant le nombre de contigs en fonction de leur taille (en nt)

La majorité des contigs (51,2 %) a une taille inférieure à 1000 pb (1kb). Parmi la totalité des contigs, 0,5 % ont une taille supérieure à 10kb. La taille moyenne des contigs est de 1580 pb. Les séquences sont composées en moyenne de 31,24% d'adénine (A), 31,18% de thymine (T), 18,77% de guanine (G) et 18,81% de cytosine (C). La profondeur moyenne de séquençage des contigs est de 378,96 reads par contigs.

ii. Le mapping des reads

Le réalignement des reads contre les contigs permet de quantifier l'expression de chaque contig. La figure 49 montre le pourcentage de reads ayant trouvés une homologie sur un contig (en rouge) et le pourcentage de reads n'ayant pas trouvés d'homologie (en bleu). En moyenne, 97% des reads ont trouvé un contig.

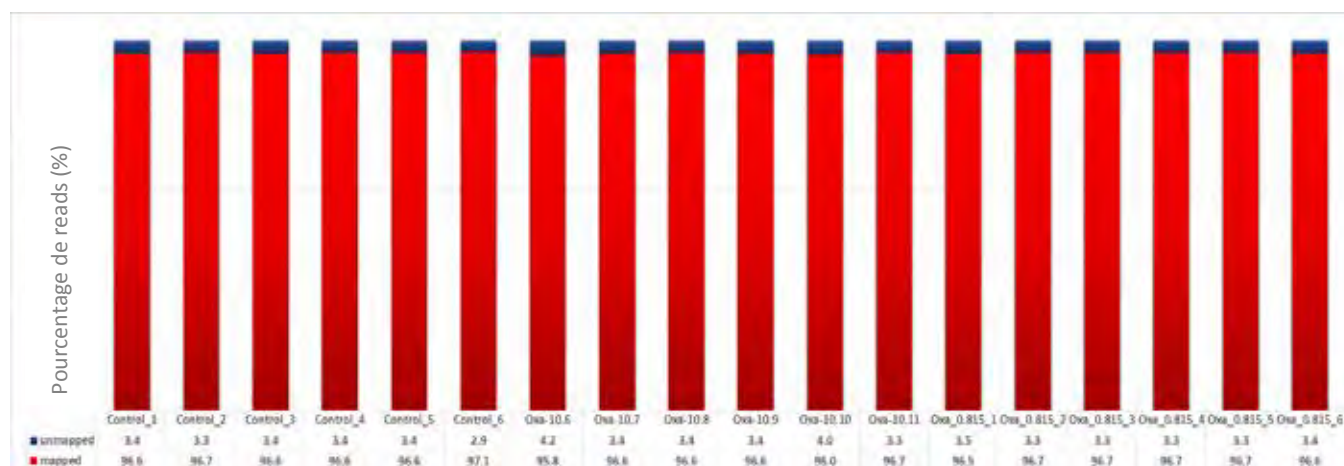


Figure 49 : Représentation de l'efficacité du réalignement des reads. Rouge : pourcentage de reads ayant trouvées un contig ; Bleu : reads n'ayant pas trouvé de contigs

L'ensemble des résultats obtenu à l'issue du séquençage et de l'assemblage est résumé dans le tableau 12. Ces résultats montrent une bonne qualité des séquences et des contigs obtenus, notamment au travers du faible pourcentage de reads n'ayant pas trouvé de cibles lors du mapping.

Tableau 12 : Résultat du nettoyage des contigs	
Catégorie	
Reads avant nettoyage	503 171 850
Reads supprimées	39 759 772
Reads après nettoyage	463 412 078
Contigs assemblés	56 435
Longueur moyenne des contigs (pb)	1 596,68
Profondeur moyenne des contigs	378,96
Pourcentage moyen de reads mappés par librairie (%)	97%

iii. Détection des Insertions, Délétions (INDEL) et des polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP)

La détection des INDELs et des SNPs a été réalisée avec l'algorithme GATK qui a permis d'identifié 455 826 SNPs (92,4 % des variants) et 37 517 INDELs (7,6% des variants) avec 19 628 insertions et 17 889 délétions, 4 et 3,6 % des variants respectivement.

iv. Bilan

L'assemblage du transcriptome a produit un total de 56 435 contigs avec une longueur moyenne de 1 579,68 pb qui permet d'augmenter la probabilité de trouver un cadre de lecture (Open Reading Frame (ORF)) complet. De plus, cela facilite la prédiction des annotations fonctionnelles des contigs. L'annotation fonctionnelle a permis de prédire une fonction pour 44,91 % des contigs. Une longueur moyenne de contigs trop grande pourrait être problématique à cause de la forte probabilité de trouver plus d'un ORF sur le même contig, ce qui pourrait introduire un biais dans le traitement de l'expression différentielle des contigs. La longueur moyenne des contigs de notre étude est suffisante pour l'obtention d'ORF complets ou presque, sur la plupart des contigs.

c. Annotation des contigs

L'annotation des contigs a été réalisée par BLAST contre la base de données RefSeqProt qui a permis d'annoter 24,55% des contigs, contre la base de *L. stagnalis* qui a permis d'annoter 7,85% des contigs, contre la base de *B. glabrata* qui a permis d'annoter 5,54 % des contigs, contre la base de *L. gigantea* qui a permis d'annoter 3,57 % des contigs, contre la base de *C. gigas* qui a permis

d'annoter 1,94 % des contigs et enfin contre SwissProt qui a permis d'annoter 1,46 % des contigs. Seul 44,91 % des 56 435 contigs ont été annotés (Figure 50).

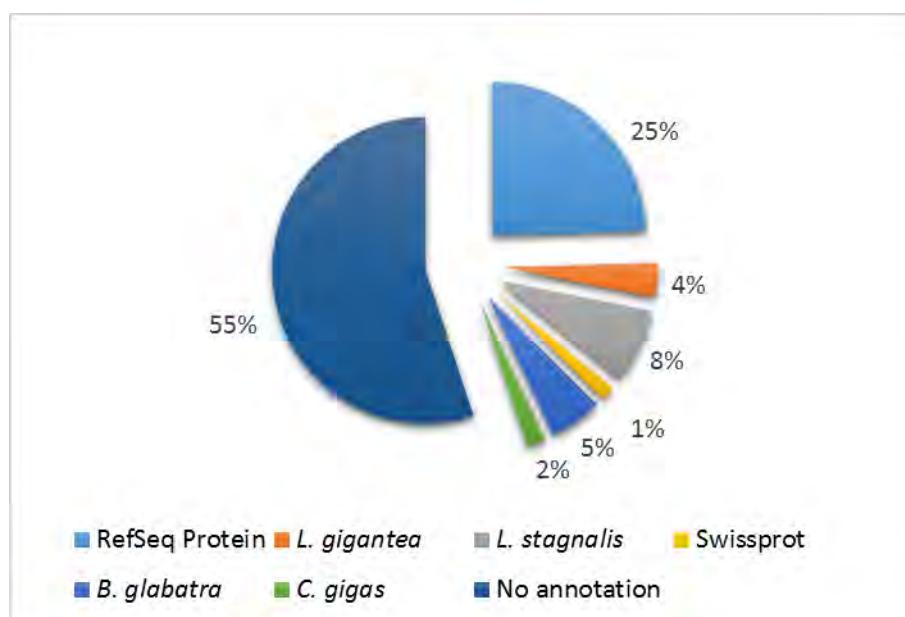


Figure 50 : Résultat de l'annotation des séquences. (BLAST contre les banques de données RefSeqProt, SwissProt et contre les séquences de *L. stagnalis*, de *B. glabatra*, de *L. gigantea* et de *C. gigas*)

L'annotation fonctionnelle a donc permis de prédire une fonction pour 44,91 % des contigs et lorsque cela était possible, de leur assigner un GO-term (ou GO-code pour Gene Ontology code). La classification des GO-term selon le logiciel en ligne WEGO-plot (Ye *et al.* 2006) (Figure 51) révèle que la classe la plus représentée est la classe "Processus Biologiques". Dans la classe "Composant cellulaire", les sous-classes les plus représentées sont "Cellule" et "Compartiment Cellulaire". Dans la classe "Fonctions moléculaires", les sous-classes les plus représentées sont "Fixation" et "Catalytique" et dans la classe "Processus Biologique", les sous-classes les plus représentées sont "Processus Cellulaire", "Processus Métaboliques" et "Pigmentation" (Figure 51). Parmi les ontologies, les sous-classes les moins représentées sont "Transport Protéique Auxiliaire", "Métallochaperone" et "Marqueur Protéique" pour la classe "Fonctions Moléculaire" et pour la classe "Processus Biologique", les moins représentées sont "Locomotion", "Reproduction" et "Processus de Reproduction".

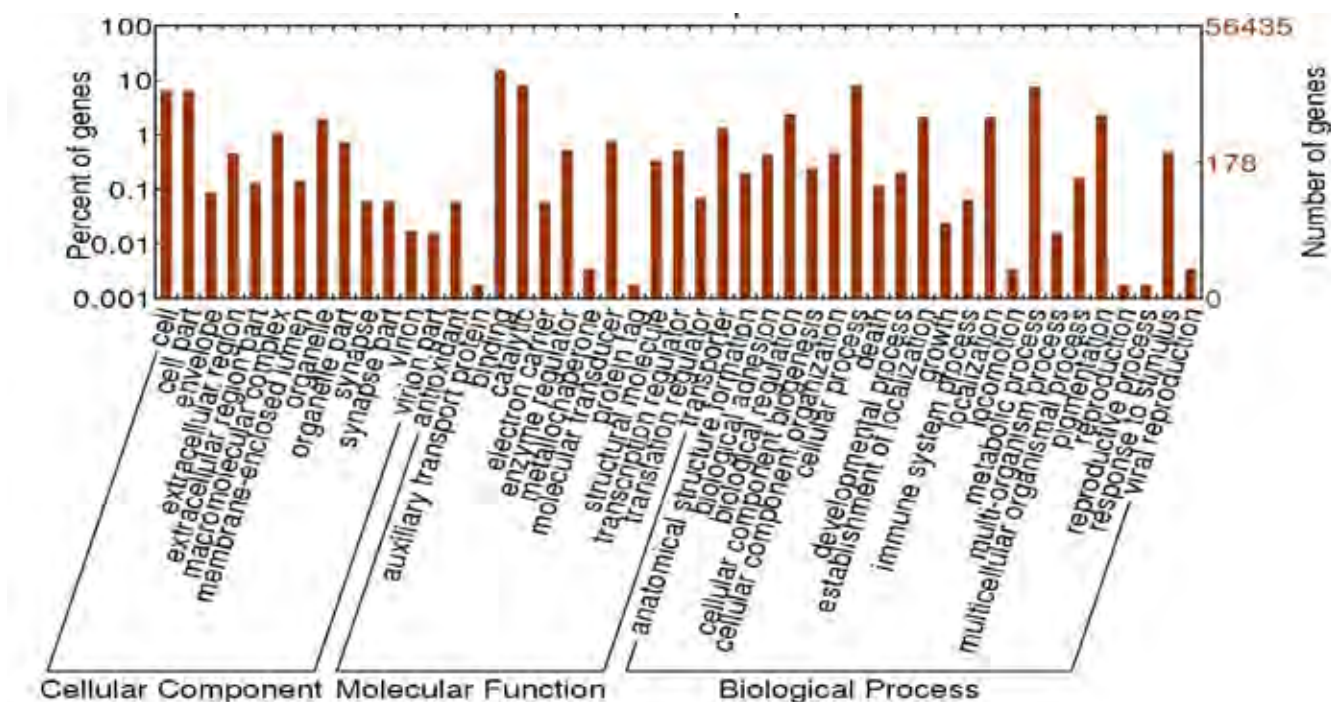


Figure 51 : Représentation graphique obtenue par le classement des GO-term de chaque contig séquencé (Logiciel WEGO-plot)

d. Résultats de l'analyse de l'expression en différentiel

i. Les contigs différentiellement exprimés

Le traitement bio-informatique du différentiel d'expression réalisé à l'aide du "DESeq package" sur le logiciel R a permis de révéler 144 contigs différentiellement exprimés (DE) dont 59 surexprimés et 85 inhibés pour la comparaison du traitement à 10 µg/L d'oxazépam (TA) et du traitement témoin exposé à l'éthanol dilué au 1/10000^{ème} dans l'eau AFNOR. Parmi la totalité de ces contigs, seuls 34 % ont été annotés avec une fonction biologique (Tableau 13, voir Annexe 4 pour plus d'information).

Tableau 13 : Fold change et fonctions putatives des contigs différentiellement exprimés de <i>R. balthica</i> exposé à l'oxazépam					
Inhibés (Témoin VS TA)					
Nom du Contig	Best hit accession	Best Hit Description	Fold Change	*Moyenne de base Témoin ± ES	*Moyenne de base TA ± ES
Rp1_MORC4.2.2	XP_003317669	PREDICTED: MORC family CW-type zinc finger protein 4, partial [<i>Pan troglodytes</i>]	0,058	24±5,266	9±0,056
Rp1_LOC101853696	XP_005098306	PREDICTED: Dentin sialophosphoprotein-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,077	137,166±26,359	16,75±6,736
Rp1_CBR1	XP_003763459	PREDICTED: Carbonyl reductase [NADPH] 1 [<i>Sarcophilus harrisi</i>]	0,105	23,666±4,565	3,75±0,905
Rp1_LOC101849541.1.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,285	25,333±3,527	7,833±1,275
Rp1_LOC100533548	XP_005111242	PREDICTED: ADAM10 [<i>Aplysia californica</i>]	0,292	60,666±4,772	20,333±4,046
Rp1_LOC101849541.2.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,307	448,333±37,911	155,333±27,543
Rp1_LOC101849541.7.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,328	47,5±3,413	17,666±3,116
Rp1_LOC101863642.4.7	XP_005112974	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101863642 [<i>Aplysia californica</i>]	0,337	383±42,401	144,5±30,494
Rp1_LOC101859258.1.3	XP_005102942	PREDICTED: Protocadherin Fat 4-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,358	28,666±5,308	17±1,914
Rp1_LOC101848170.2.2	XP_005091177	PREDICTED: Translation factor GUF1, mitochondrial-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,403	500,833±70,119	222,5±29,686
Rp1_LOC102304721.1.2	XP_005916073	PREDICTED: Probable E3 ubiquitin-protein ligase DTX2-like isoform X2 [<i>Haplochromis burtoni</i>]	0,406	85,166±8,526	38,333±7,927
Rp1_contig_38610	E6ZJA8	Uncharacterised Beta-ketoacyl synthase [<i>Dicentrarchus labrax</i>]	0,436	3816,333±460,636	1894,5±335,145
Rp1_LOC101863302	XP_005110056	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101863302 isoform X4 [<i>Aplysia californica</i>]	0,460	98,166±12,365	49±5,756
Rp1_LOC101857002	XP_005091492	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101857002 isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	0,551	110,166±9,713	66,166±4,812
Rp1_MUA3	P34576	MUA3_CAEEL Transmembrane cell adhesion receptor mua-3 OS [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	0,565	108,5±12,489	66,333±2,928

Tableau 13 : suite					
Rp1_LOC101861648.2.2	XP_005093946	PREDICTED: Fibrillin-1-like, partial [<i>Aplysia californica</i>]	0,609	1338,166±128,803	892,833±49,565
Rp1_LOC101860152.2.3	XP_005093674	PREDICTED: Cytochrome P450 3A29-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,617	174±17,597	117,666±9,888
Rp1_LOC101858677	XP_005089513	PREDICTED: Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein 2-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	0,642	648,166±23,823	463,5±50,693
Rp1_contig_01695	K1PY10	Uncharacterised Putative L-threonine 3-dehydrogenase [<i>Crassostrea gigas</i>]	0,646	974,5±41,089	697,833±81,021
Rp1_contig_41364	K1R2K2	Uncharacterised Periostin [<i>Crassostrea gigas</i>]	0,647	3198,5±270,65	2235,5±99,937
Rp1_SMPD1	XP_006203669	PREDICTED: Sphingomyelin phosphodiesterase [<i>Vicugna pacos</i>]	0,657	396,833±24,529	285,5±21,757
Rp1_MEGF6.8.16	Q80V70	MOUSE Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6 OS [<i>Mus musculus</i>]	0,671	2598,333±118,261	1943,333±191,665
Rp1_contig_33698	EKC35365	EKC35365 Description : Periostin	0,682	21966,166±1304,926	16588,666±1534,585
Rp1_LOC101849024.2.2	XP_005091185	PREDICTED: Pericentriolar material 1 protein-like isoform X5 [<i>Aplysia californica</i>]	0,686	651,666±40,431	497,166±47,953
Rp1_LOC101845316.7.8	XP_005096296	PREDICTED: Multidrug resistance-associated protein 1-like isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	0,697	725,666±52,696	551,5±27,176
Rp1_LOC101852369.1.2	XP_005089594	PREDICTED: Dedicator of cytokinesis protein 7-like isoform X6 [<i>Aplysia californica</i>]	0,702	686,833±40,101	530,666±53,328
Rp1_contig_13954	K1Q965	Uncharacterised Protein NEF1 [<i>Crassostrea gigas</i>]	0,720	1341,5±108,633	1063,833±87,979
Rp1_LOC101853823	XP_005110352	PREDICTED: Beta-galactosidase-1-like protein 2-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,728	733±50,165	592,833±63,809
Rp1_contig_36971	XP_005106678.1	PREDICTED: glutathione S-transferase 3-like [<i>Aplysia californica</i>]	0,730	7958,5±475,205	6421,666±569,551
Rp1_LOC101862537	XP_005110307	PREDICTED: Calumenin-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	0,733	2587±230,12	2079,666±160,24
Rp1_contig_36978	A0A0B2V9E1	Uncharacterised Ribonuclease [<i>Toxocara canis</i>]	0,737	3025±159,88	2462,333±169,66
Rp1_contig_38047	K1QC26	Uncharacterised Plasma alpha-L-fucosidase [<i>Crassostrea gigas</i>]	0,745	4598,833±236,61	3776±320,939

Tableau 13 : suite

Surexprimés (Control VS TA)

Nom du Contig	Best hit accession	Best Hit Description	Fold Change	*Moyenne de base Témoin ± ES	*Moyenne de base TA ± ES
Rp1_LOC101739898	XP_004933588	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101739898 [<i>Bombyx mori</i>]	1,447	137±6,547	218,166±10,885
Rp1_LOC101859955.2.2	XP_005103957	PREDICTED: Ganglioside GM2 activator-like [<i>Aplysia californica</i>]	1,454	186±9,103	297,333±18,503
Rp1_contig_12968	EKC33205	Uncharacterised receptor-type tyrosine-protein phosphatase T [<i>Crassostrea gigas</i>]	1,459	209,166±21,764	328,166±11,379
Rp1_LOC101856763	XP_005088876	PREDICTED: Puromycin-sensitive aminopeptidase-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	1,507	2183,833±133,516	3615,666±254,056
Rp1_contig_09129	EKC22995	EKC22995 Description : Amidase	1,545	464,666±30,827	781,5±32,602
Rp1_LOC101855555.1.3	XP_005096347	PREDICTED: Centrosomal protein POC5-like isoform X3 [<i>Aplysia californica</i>]	1,636	53,5±5,858	96,333±9,506
Rp1_LOC101860999.31.45	XP_005107325	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101860999 [<i>Aplysia californica</i>]	1,735	39,833±2,971	75,833±5,81
Rp1_LOC101853280.2.2	XP_005112645	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101853280 [<i>Aplysia californica</i>]	1,784	120,833±8,348	234,5±10,871
Rp1_contig_29006	XP_005301846	PREDICTED: Lysine-specific demethylase 6A-like isoform X8 [<i>Chrysemys picta bellii</i>]	1,999	41,5±6,662	91,333±12,139
Rp1_PFE0815w	XP_001351720	tRNA pseudouridine synthase, putative [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	2,042	131,666±21,975	296±26,051
Rp1_LOC101857261.15.28	XP_005102678	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101857261 isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	2,066	34,166±2,638	79±9,479
Rp1_contig_13618	K1QT99	Uncharacterised Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor [<i>Crassostrea gigas</i>]	2,236	78,833±8,182	200±34,366
Rp1_LOC101732139.2.2	XP_004919413	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101732139 [<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>]	2,673	37,333±9,52	107±9,458

Tableau 13 : suite

Rp1_contig_28236	XP_002734505	PREDICTED: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1-like [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>]	2,999	9,666±1,308	32,333±5,874
Rp1_LOC373215	XP_798111	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: Deleted in malignant brain tumors 1 protein [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	3,101	128,166±35,765	419,166±69,306
Surexprimés (Control VS TB)					
Nom du Contig	Best hit accession	Best Hit Description	Fold Change	*Moyenne de base Témoin ± ES	*Moyenne de base TB ± ES
Rp1_contig_20905	K1QXB6	Otopetrin superfamily, PREDICTED: otopetrin-2-like [<i>Aplysia californica</i>]	1,644	211,833±20,984	385,5±40,41
* Moyenne de base sont les moyenne du nombre de contigs pour chacun des 6 répliquas (± Erreur Standard)					
* Témoin réfère à la condition témoin, TA réfère à l'exposition à 10 µg/L d'oxazépam et TB réfère à l'exposition à 0,815µg/L d'oxazépam.					

L'analyse des contigs du TA (10 µg/L d'oxazépam) montre que les contigs les plus inhibés avec un "Fold Change" (FC, ratio du nombre moyen de contigs de la condition d'exposition divisé par le nombre moyen de contigs de la condition témoin) compris entre 0,058 et 0,328 codent des protéines annotées comme étant Morc protéine (Members of the conserved Microrchidia family), la Dentin Sialophosphoprotéine (DSPP), la Carbonyl réductase et/ou encore des ADAM (A Disintegrin And Metaloprotéase) (Tableau 13). Les contigs les moins inhibés ayant un "Fold Change" compris entre 0,728 et 0,745 codent des protéines comme étant la Béta-galactosidase, la Caluménine, une Ribonucléase et une L-Fructosidase. Les contigs les moins surexprimés du TA ayant un "Fold Change" compris entre 1,454 et 1,507 codent des protéines prédites comme un Activateur Ganglioside (Activator Gangliosid), récepteur à activité Tyrosine kinase (Tyrosine receptor protein) ou encore une Aminopeptidase (Puromycin sensitive aminopeptidase). Les plus surexprimés des contigs ont un "Fold Change" compris entre 2,236 et 3,101 et codent des protéines prédites comme étant une Hémagglutinine, une MAP Kinase (Mitogen activated protein kinase (MAPK)) et une protéine impliquée dans les tumeurs malignes du cerveau (Deleted in malignant brain tumors protein). Pour le traitement B (0,815 µg/L), le seul contig annoté était surexprimé avec un "Fold Change" de 1,644 et code une protéine ayant comme fonction prédite une Otopetrine (Tableau 13).

ii. Annotation fonctionnelle des contigs DE

Tous les GO-terms des 144 contigs DE du TA et TB ont été classés et représentés graphiquement en trois catégories à l'aide du logiciel en ligne WEGO plot (Figure 52). Seuls les contigs du TA ont permis de réaliser le graphique, les 2 contigs DE du TB n'ayant été retrouvés dans aucune catégorie. La catégorie la plus enrichie était celle des "Molecular Function" avec quatre fonctions dominantes, "Binding", "Catalytic", "Hydrolase" et "Ion binding".

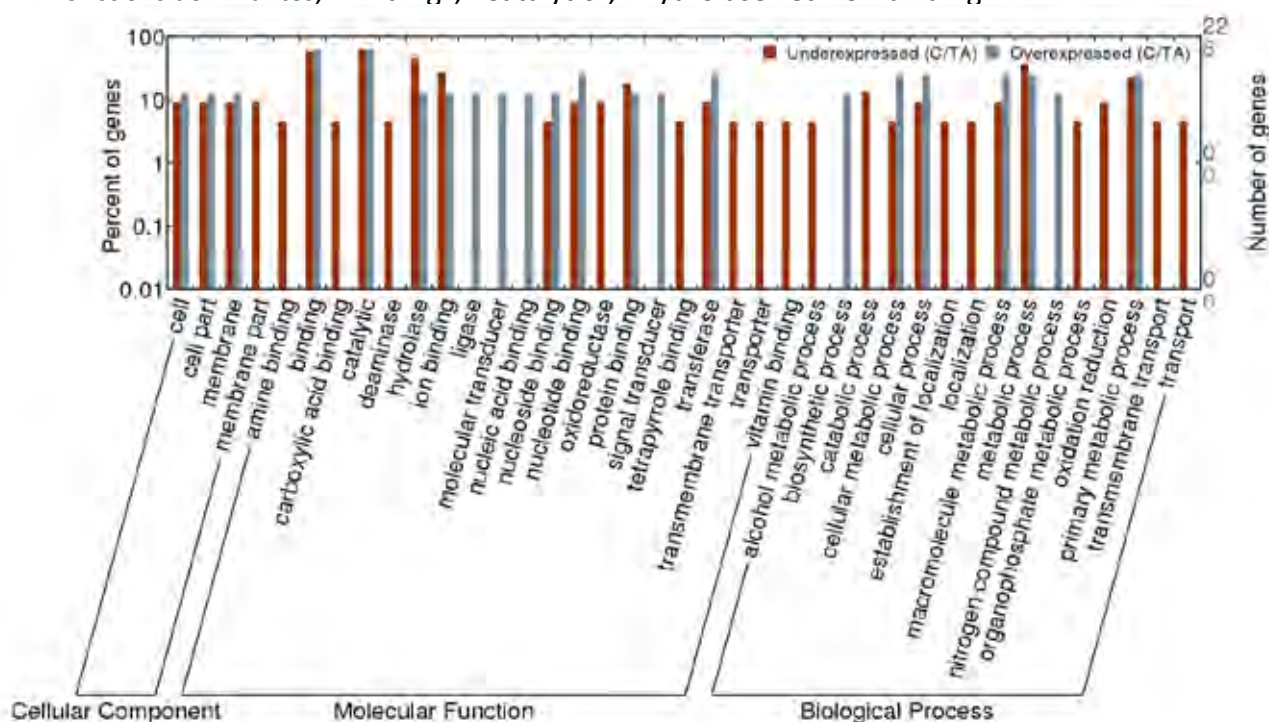


Figure 52 : Représentation graphique de la classification des GO-term des contigs différentiellement exprimés en présence d'oxazépam. (Logiciel WEGO-plot)

Les contigs DE pour TA ont été classés selon la hiérarchie BRITE à l'aide de KEGG Mapper qui classe les contigs en fonction de leurs "K numbers" (terme spécifique de l'annotation KEGG obtenu par analyse des séquences) et selon trois ontologies, "Metabolism", "Genetic Information Processing" et "Signalling and Cellular Processes". La classe la plus représentée est "Metabolism" avec la sous-catégorie "Enzyme", enrichie avec 15 contigs (Figure 53). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus suite au classement utilisant les GO terms (Figure 52). La fonction "Catalyse" tout comme la sous-catégorie "Enzymes" sont les plus représentées. Parmi les contigs DE, les enzymes constituent la partie majoritaire des contigs DE annotés.

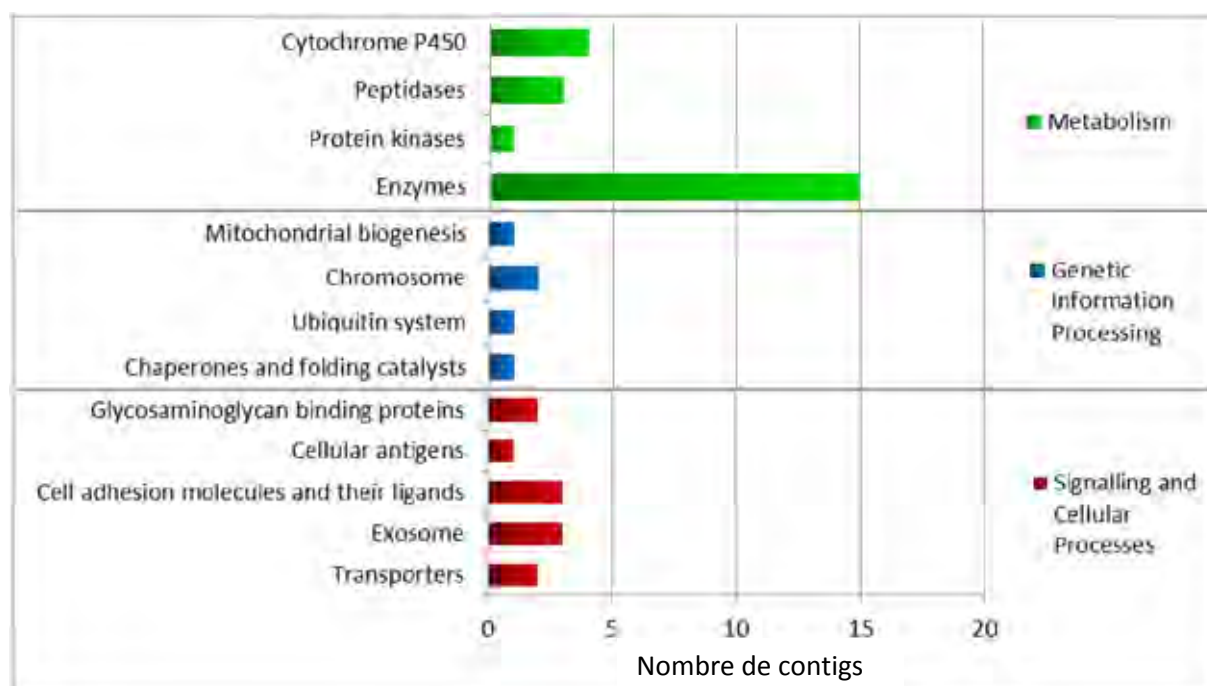


Figure 53 : Représentation de la classification des K numbers selon les trois ontologies KEGG, "Métabolisme", "Genetic Information Processing" et "Signalling and cellular Processes". (Logiciel KEGG Mapper)

Le logiciel KOBAS 2.0 a été utilisé pour identifier significativement les voies KEGG les plus représentées (Tableau 14). Les 2 contigs DE du traitement B n'ont pas été retrouvés dans une voie de signalisation KEGG. Les 6 voies les plus enrichies par les contigs DE du TA étaient "Notch signalling pathway" avec 5 contigs, "Chemical carcinogenesis" enrichie avec 2 contigs, "Arachidonic acid metabolism" avec 2 contigs assimilés à cette voie, "Epithelial cell signaling in *Helicobacter pylori*" enrichie avec 2 contigs, "Extracellular matrix receptor (ECM-receptor) interaction" avec 2 contigs assimilés à cette voie et "Aminobenzoate degradation" enrichie avec 1 contig (Tableau 14).

Tableau 14 : Les voies KEGG les plus enrichies par les contigs différentiellement exprimés (p -value corrigée $< 0,05$)

Identifiant de la voie	Voie	Contigs surexprimés et inhibés	p value corrigée
ko04330	Notch signaling pathway	5	2.774E-07
ko05204	Chemical carcinogenesis	2	3.914E-02
ko00590	Arachidonic acid metabolism	2	3.914E-02
ko05120	Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> Infection	2	5.428E-02
ko04512	ECM-receptor interaction	2	5.428E-02
ko00627	Aminobenzoate degradation	1	8.040E-02
* L'enrichissement des voies KEGG a été réalisé en utilisant les K numbers de chaque contig différentiellement exprimés par l'exposition au TA			

Le logiciel KEGG Mapper a été aussi utilisé pour la prédiction de modules de voies impactées des 144 contigs DE du TA. Les 2 contigs DE du TB n'ont pas suffi à la prédiction de module. Les résultats suggèrent 6 modules principalement impactés dont "Notch signalling pathway" (ko04330) avec 5 contigs inhibés (Rp1_LOC101849541.1.7, Rp1_LOC101849541.2.7, Rp1_LOC101849541.7.7, Rp1_LOC100533548 et Rp1_LOC102304721.1.2) puis les voies "Chemical carcinogenesis" (ko05204), "Arachidonic metabolism" (ko00590), "Epithelial cell signalling" (ko5120), "ECM-receptor interaction" (ko04512) avec 2 contigs impactés et enfin la voie "Aminobenzoate degradation" (ko00627).

iii. Bilan de l'analyse de l'expression différentielle du RNASeq

- Faible annotation des séquences et analyse en différentielle

Parmi la totalité des contigs dont l'expression est modulée, seuls 34 % ont été annotés avec une fonction. Les autres contigs non annotés peuvent coder des protéines non caractérisées à ce jour, des ARNs non codants parfois impliqués dans la régulation de la transcription ou encore des séquences de régions UTR (Régions non Traduites de l'anglais *Untranslated region*). On ne peut pas écarter la possibilité d'avoir des contigs contenant des erreurs d'assemblage ou encore issus d'assemblages partiels. L'absence de génome de référence, le faible taux de données d'annotation fonctionnelle est l'étude portant sur un organisme "non modèle" (tel que notre étude) limitent l'efficacité d'annotation des séquences (Schunter *et al.* 2014). Pour le traitement B, seuls 2 contigs ont été révélés différentiellement exprimés (DE). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce faible nombre de contigs DE. Tout d'abord, l'absence de génome de référence limite l'assemblage et peut amener parfois à la création de contigs chimères avec deux voire plusieurs ORF sur un seul contigs. Schunter *et al.* (2014) ont démontré que le nombre d'isoformes de contigs augmente avec la longueur des contigs, principalement à cause de l'épissage alternatif et diminue donc fortement l'efficacité de l'analyse en différentielle. Nous avons une longueur moyenne de contigs de

1596,68 pb, considérée comme longs d'après la littérature. Ce dernier paramètre est dépendant des scripts souvent spécifiques à chaque laboratoire, rendant l'analyse difficile ou impossible à reproduire. Ceci affecte aussi l'assemblage, l'annotation et la puissance de l'analyse en différentielle. De plus, la méthode utilisée pour le traitement bio-informatique pourrait être trop stringente et ainsi éliminer certains faux négatifs. Plusieurs contigs pourraient donc ne pas apparaître DE alors qu'ils le sont (Grabherr *et al.* 2011). Une autre hypothèse pourrait être que la faible concentration en oxazépam affecte le transcriptome de *R. balthica*, mais qu'au moment des prélèvements, l'organisme soit dans une phase de régulation post-transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle ne permettant plus de voir les effets transcriptomiques. En effet, comme l'ont montré Rola *et al.* (2012) chez *Mytilus edulis* exposée à un site pollué, l'activité de la catalase est augmentée dans les muscles alors que l'expression du gène codant la catalase n'est pas modulée. Ils ont aussi montré une surexpression du gène codant la SOD (Superoxyde dismutase) dans les muscles, mais aucune augmentation de l'activité de la protéine (Rola *et al.* 2012). Cette étude renforce l'hypothèse que de faibles concentrations en xénobiotiques tels que l'oxazépam pourraient significativement impacter différents niveaux du système biologique à des temps différents. Cependant, on peut aussi supposer que ces faibles effets pourraient être aussi dus à la courte durée d'exposition des organismes.

- L'oxazépam impacte la voie de signalisation Notch

En accord avec les résultats obtenus par l'identification des voies KEGG les plus enrichies, le premier module prédit était la voie de signalisation Notch (M00682) avec 5 contigs inhibés (Rp1_LOC101849541.1.7, Rp1_LOC101849541.2.7, Rp1_LOC101849541.7.7, Rp1_LOC100533548 et Rp1_LOC102304721.1.2). Trois de ces contigs (Rp1_LOC101849541.1.7, Rp1_LOC101849541.2.7, Rp1_LOC101849541.7.7) codent des parties chevauchantes de la même protéine ADAM 17. Ceci nous permet de conclure à une erreur d'assemblage. Les deux autres contigs, Rp1_LOC100533548 et Rp1_LOC102304721.1.2, codent respectivement les protéines ADAM 10 et Deltex. Comme décrit par Weinmaster et ses collaborateurs (Weinmaster *et al.* 1992; Weinmaster 1997; Weinmaster 1998; Weinmaster 2000), la voie de signalisation Notch est une cascade d'événements complexes et très conservée chez les organismes eucaryotes, qui aboutit à la modulation du profil d'expression de plusieurs gènes. Le signal de la voie Notch est principalement initié par un contact cellule/cellule et déclenche une succession de réactions utilisant plusieurs protéines partenaires telles que des métalloprotéines (protéines de la famille ADAM) ou encore des ubiquitines transférases (comme la protéine Deltex). Notre étude révèle une inhibition de trois contigs codant 2 protéines de la famille ADAM (ADAM 10 et ADAM 17) et une protéine prédite comme Deltex (DTX). Les protéines de la famille ADAM réalisent la deuxième coupure du récepteur cellulaire de surface, nécessaire pour la troisième coupure de la protéine Notch qui libère le domaine cytoplasmique Notch de la membrane

plasmique (NICD de l'anglais Notch Intra-Cellular Domaine). La protéine ADAM 17 (appelée aussi TACE) est aussi impliquée dans beaucoup d'autres voies ayant un rôle essentiel dans l'élaboration de nombreuses protéines comme les cytokines de type facteur de nécrose tumorale (TNF de l'anglais Tumor Necrosis Factor) (Peschon *et al.* 1998). De plus, il a été montré que les TNF peuvent être inhibés par les benzodiazépines chez les mammifères comme la souris (Nelson *et al.* 2002; Levin *et al.* 2004; Scheller *et al.* 2011; Dreytmueller *et al.* 2015). Nos résultats sont en accord avec les études de Levin *et al.* (2004), Nelson *et al.* (2002) and Scheller *et al.* (2011), qui démontrent l'inhibition de la protéine TACE par plusieurs composés de type benzodiazépine hydroxamate. Dans notre étude, acceptant l'hypothèse que la voie de signalisation Notch joue le même rôle chez le *R. balthica* que chez les mammifères, l'inhibition des métalloprotéases pourrait inhiber la forme active du domaine cytoplasmique de Notch et donc inhiber la transcription de gènes cibles. La protéine Notch pourrait être directement inhibée par les benzodiazépines. En effet, comme l'ont montré Gavai *et al.*, 2015, les molécules de type benzodiazépine comme le 2-oxo-1,4-benzodiazépin-3-yl-succinamide inhibent les enzymes γ -sécrétase nécessaires au déclenchement du signal du récepteur Notch. Le rôle de la protéine Deltex dans la voie de signalisation Notch n'est pas clair, plusieurs études récentes suggèrent cependant qu'elle interagit avec plusieurs protéines partenaires dans le cytoplasme et dans le noyau afin d'inhiber ou d'activer la transcription des gènes cibles de la voie Notch (Diederich *et al.* 1994; Matsuno *et al.* 1995; Weinmaster 1997; Baron 2012). Le gène codant la protéine Deltex est un gène cible de la voie Notch. L'inhibition de Notch pourrait donc inhiber aussi Deltex et donc perturber en cascade la transcription de nombreux gènes cibles (Deftos *et al.* 1998). L'inhibition du gène *deltex* pourrait également résulter de l'inhibition de Notch via l'inhibition des gènes *ADAM*. L'inhibition de la voie pourrait avoir un impact sur plusieurs mécanismes tels que le développement des neurones et des muscles, sur la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire et donc sur le processus d'embryogenèse en général. On pourrait alors suggérer que le retard d'éclosion observé pourrait être lié à une embryogenèse plus lente, en lien avec les perturbations de la voie Notch. Bien que nous n'ayons pas observé d'effets tératogènes après éclosion, l'impact de l'oxazépam sur cette voie de signalisation pourrait laisser envisager des perturbations de la fitness des organismes.

- L'oxazépam impacte la voie de signalisation c-Jun MAP kinase

Le contig (Rp1_contig_28236) est surexprimé par l'exposition des *Radix* à l'oxazépam et code une protéine prédite comme étant une sérine/thréonine protéine kinase, la *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2* (MAP3K2 protéine), potentiellement impliquée dans trois modules (trois voies MAPK), *c-Jun N-terminal kinase* aussi appelée JNK (M00688), p38 (M00689) et *Extracellular signal-Regulated Kinase* aussi appelée ERK (M00690). Cependant, la MAP3K2 est principalement impliquée dans la voie MAP-JNK. Comme démontré par Takeda and Ichijo (2002), la

voie de signalisation JNK utilise trois classes de sérine/thréonine kinase, les MAPK, MAPK Kinase (MAPKK ou MEK) et MAPKK Kinase (MAPKKK). La protéine MAP3K2 est la première sérine/thréonine kinase phosphorylée dans la voie JNK. La voie JNK est connue pour être principalement activée en réponse à un stress environnemental tel que les UVs, un choc de température, un choc osmotique ou encore par des cytokines pro-inflammatoires et des interleukines-1 (TNF) (Takeda and Ichijo 2002). De plus, il a été montré que la voie Notch et la voie du Facteur NF-kappa B nucléaire (NF- κ B) peuvent inhiber la voie MAP-JNK *via* la protéine d'inhibition de la croissance et d'induction des dommages à l'ADN Gadd45 (de l'anglais Growth arrest and DNA-damage-inducible) intervenant en tant que récepteur au stress (Elsharkawy *et al.* 2005; Maniati *et al.* 2011). Nous pouvons alors supposer qu'une inhibition de Notch par l'oxazépam pourrait permettre, *via* d'autres acteurs, d'activer la voie MAP-JNK telle que nous l'observons. Cependant, un seul contig représentant le module MAP-JNK prédit par le logiciel "KEGG module reconstruct" est surexprimé. Les contigs codants des protéines partenaires de MAP3K2 ne sont pas différentiellement exprimées. Ceci pourrait être dû aux méthodes bio-informatiques utilisées (trop stringentes) qui auraient éliminé des résultats positifs. La bonne qualité de l'assemblage des contigs étant essentielle à l'analyse en différentielle, la perte de certaines informations pourrait aussi être due à l'absence d'un génome séquencé pour cet organisme qui a vraisemblablement impacté la qualité de notre assemblage.

- L'oxazépam impacte la voie de biosynthèse des catécholamines

Le module de la voie de biosynthèse des Catécholamines (CAs) (Catecholamine biosynthesis, M00042) a également été révélé par l'analyse KEGG avec un contig surexprimé (Rp1_contig_36516) codant la Dopamine β -hydroxylase (DBH). Les CAs forment une classe de neurotransmetteurs principalement représentée par la Dopamine (DA) et ses métabolites, la Noradrénaline (NA) et l'Adrénaline (A). Ces trois CAs sont synthétisées à partir d'un acide aminé précurseur la L-tyrosine, *via* l'action de 4 enzymes principales. La DBH hydrolyse la DA produisant la NA (Flatmark 2000). Dans notre étude, nous avons utilisé l'oxazépam, un agoniste des récepteurs GABA. Comme l'ont montré Richetto *et al.* (2015) sur le modèle biologique *Mus musculus*, l'allostérie positive de la sous-unité $\alpha 5$ du récepteur GABA pourrait être particulièrement utile pour atténuer une hyperactivité pathologique du système dopaminergique. La surexpression de la DBH suggère une surproduction de NA qui pourrait aussi affecter la voie de synthèse de la Noradrénaline et de l'Adrénaline. Cette hypothèse est en accord avec les résultats publiés par Heikkinen *et al.* (2008). Ils ont montré une modulation de la transmission du signal glutamatergique par les benzodiazépines qui touche les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et qui module la quantité de DA libérée dans le noyau accumbens (associé au plaisir, incitation à la violence...), augmentant les impacts des benzodiazépines. Même si seul un contig apparaît DE dans ce module, il est important de prendre en

compte ce résultat puisque ce neurotransmetteur est impliqué dans beaucoup de processus biologiques tels que la conduction nerveuse de cellule à cellule, le mouvement, l'alimentation, le comportement, soit autant de processus physiologiques importants pour la fitness des populations.

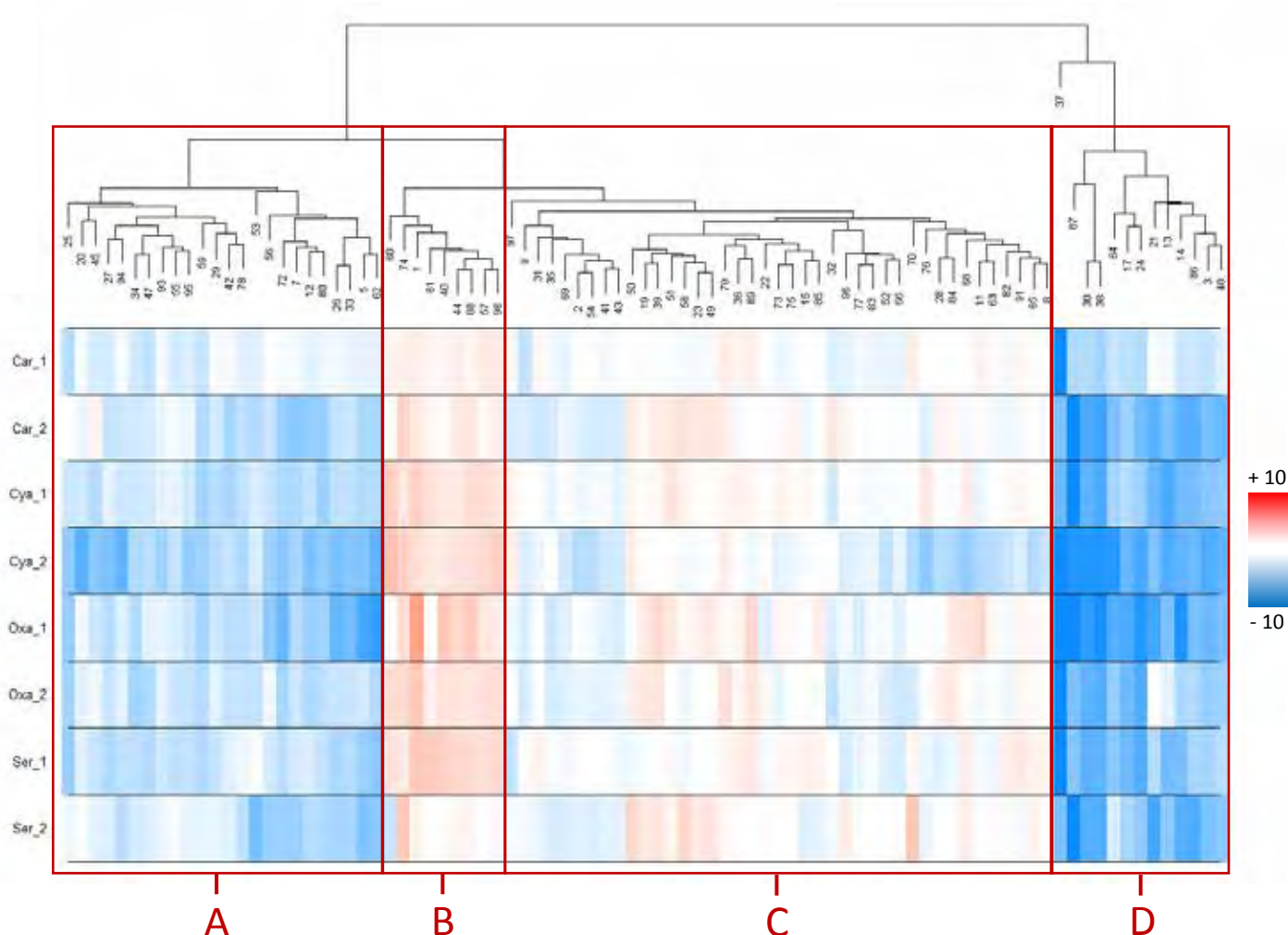
- L'oxazépam impacte la voie de biosynthèse des polyamines

Le dernier module impacté est la voie de biosynthèse de la Polyamine (Polyamine biosynthesis, M00133) avec un contig inhibé (Rp1_contig_38845) codant l'Agmatinase (AGMAT). La voie de biosynthèse conventionnelle transformant l'arginine en polyamines utilise des enzymes telles que l'Arginase et l'Ornithine décarboxylase (ODC1). Plusieurs études montrent l'existence d'une voie de biosynthèse alternative transformant l'arginine en putrescine qui utilise l'Arginine décarboxylase (ADC) et l'Agmatinase (AGMAT) (Halaris and Plietz 2007; Wang *et al.* 2014). Il semblerait que ces deux voies soient complémentaires l'une de l'autre. Cela suggère une possible diminution de la quantité de polyamines telles que la Putrescine, la Spermine et la Spermidine, qui pourrait perturber les voies de régulations de la synthèse d'ADN et des protéines, la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), la prolifération cellulaire et la différenciation des tissus. L'inhibition de l'AGMAT pourrait aussi déclencher une augmentation de la quantité d'Agmatine (précurseur de la putrescine) et ainsi perturber les processus cellulaires impliquant l'Agmatine tels que le transport du calcium *via* les canaux calciums (Ca^{2+}) voltage dépendant, entraînant des perturbations de la conduction nerveuse des neurones adrénergiques, sérotoninergiques et cholinergiques (Reis and Regunathan 2000). De plus, l'Agmatine peut aussi moduler la libération de Glutamate et de Noradrénaline (Halaris and Plietz 2007). De ce fait, la modulation de la production d'Agmatine va directement impacter les conductions nerveuses glutamatergique et noradrénergique. Notre étude est en accord avec ces résultats, suggérant que les benzodiazépines perturbent la conduction nerveuse de la Noradrénaline et de la Dopamine. En effet, l'oxazépam est utilisé chez l'Homme pour son agonisme avec le GABA, capable d'inhiber la conduction nerveuse gabaergique et ainsi atténuer les crises d'épilepsie. En plus d'impacter la conduction nerveuse gabaergique, la perturbation de la voie de biosynthèse des polyamines chez le *Radix* laisserait suggérer que l'oxazépam perturbe aussi les voies de la Noradrénaline et de la Dopamine chez ce dernier.

IV. Les psychotropes impactent-ils le transcriptome du *R. balthica* ?

L'analyse en différentielle du transcriptome nous a permis d'identifier la modulation de l'expression de plusieurs gènes suite à l'exposition à l'oxazépam. Nous avons donc sélectionné 94 gènes dont la plupart était différentiellement exprimés en RNA Seq Diff, mais aussi quelques gènes de détoxification et de la voie de signalisation Notch, puis nous avons étudié leur expression par RT-

qPCR pour deux conditions d'exposition à chaque médicament. Les résultats de cette étude sont exprimés en Fold Change issu du calcul par la méthode du $\Delta\Delta Ct$.



La figure 54 permet de classer chaque gène en fonction de son profil d'expression pour chaque condition. On observe donc 4 clusters majoritaires dont les clusters A et D, composés de gènes majoritairement inhibés pour toutes les conditions d'expositions testées. Le cluster B regroupe les gènes majoritairement surexprimés dans toutes les conditions et le C est composé de gènes dont le profil est plutôt neutre (non différentiellement exprimé) ou surexprimé dans une condition et inhibé dans l'autre. La significativité des résultats n'étant pas représentée sur la figure 54, nous avons réalisé un volcanoplot avec toutes les conditions confondues (Figure 55) afin de présenter la significativité ($-\log_{10}(p\text{Value})$) de chaque gène pour chaque condition en fonction de leur ratio d'expression ($\log_2(\text{FoldChange})$). Les résultats de cette figure suggèrent que les 94 gènes sélectionnés à partir du RNA seq en différentiel sont majoritairement inhibés lorsque les embryons de mollusques sont exposés à des molécules médicamenteuses.

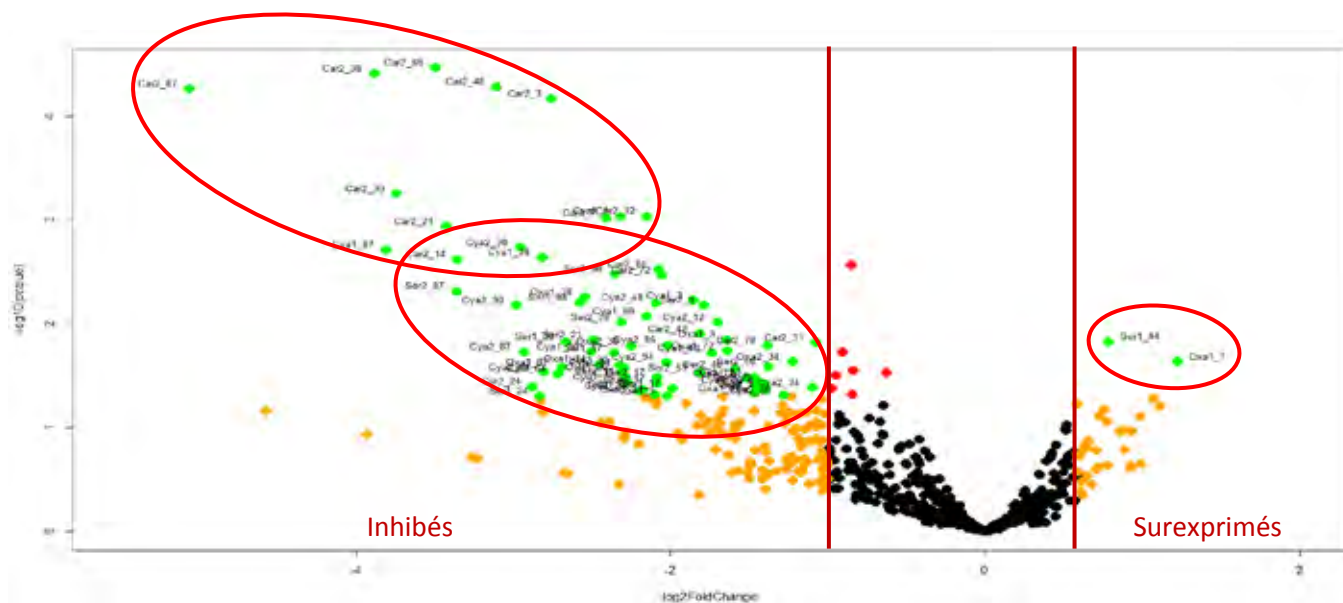


Figure 55 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour chaque condition d'exposition. $\log_2(\text{FoldChange})$: Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$; $-\log_{10}(\text{pvalue})$: $-\log$ de base 10 de la pvalue obtenue par le calcul des ratios d'expressions ; Orange : Gènes inhibés ou surexprimés avec $p\text{value} > 0.05$; Vert : Gènes inhibés ou surexprimés avec $p\text{value} < 0.005$; Noir et Rouges : Gènes non différenciellement exprimés.

a. Impacts de l'oxazépam évalués sur 94 gènes par RT-qPCR

La figure 56 représente la répartition des 94 gènes dans chacune des deux conditions d'expositions à l'OXZ (0,815 et 10 $\mu\text{g/L}$) en fonction de leur ratio d'expression et de la significativité.

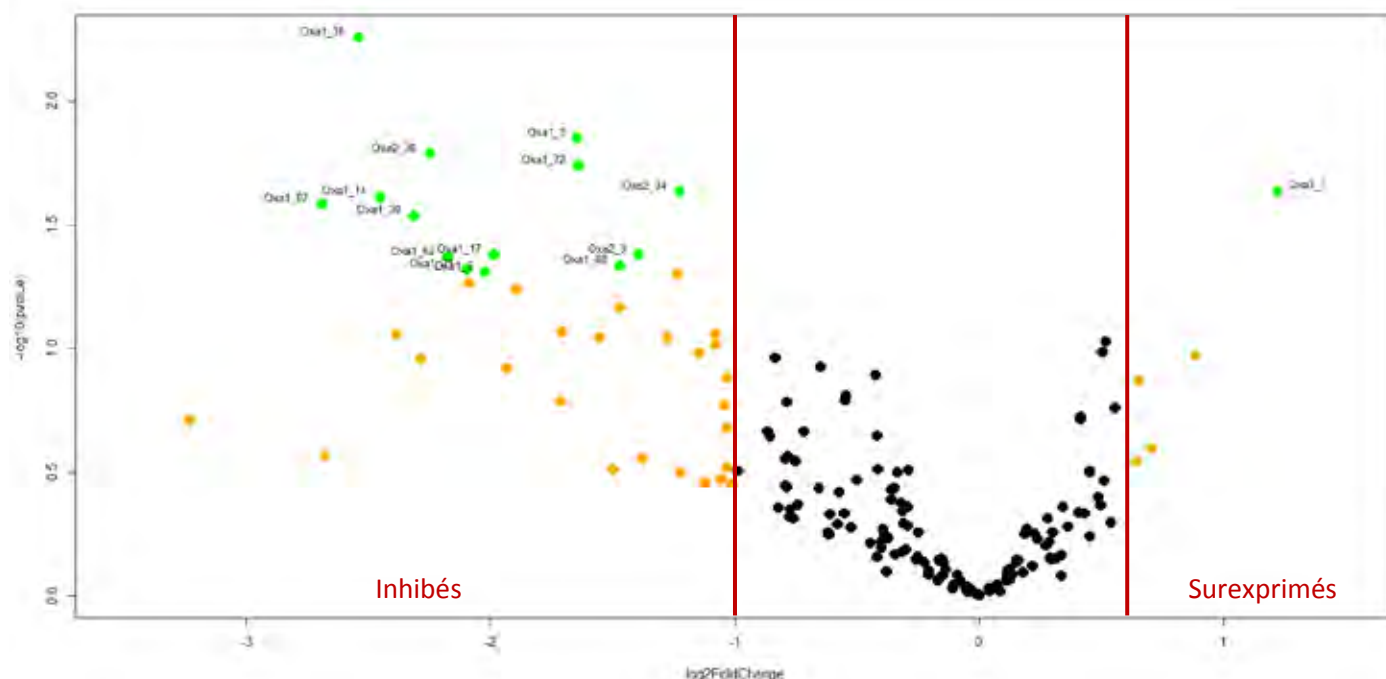


Figure 56 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à l'oxazépam. Ox1_gène : oxazépam à 10 $\mu\text{g/L}$; Ox2_gène : oxazépam à 0,815 $\mu\text{g/L}$; $\log_2(\text{FoldChange})$: Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$; $-\log_{10}(\text{pvalue})$: $-\log$ de base 10 de la p-value obtenue lors du calcul des ratios d'expressions ; Orange : Gènes inhibés ou surexprimés avec $p\text{value} > 0.05$; Vert : Gènes inhibés ou surexprimés avec $p\text{value} < 0.005$; Noir : Gènes non différenciellement exprimés.

Comme on peut le voir sur la figure 56, l'OXZ a un effet global inhibiteur sur l'expression des 94 gènes étudiés. On compte 11 gènes significativement impactés lors d'une exposition à 10 $\mu\text{g/L}$ et 3

gènes significativement inhibés lors d'une exposition à 0,815 µg/L d'OXZ. Seul un gène est significativement surexprimé suite à l'exposition des embryons à 10 µg/L d'OXZ. On peut donc dresser un pattern des gènes dont l'expression est significativement modulée lorsque les mollusques sont exposés à l'OXZ (Tableau 15).

Tableau 15 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à l'oxazépan				
N° gène	N° accession	Fonction	Log ₂ (Fold Change)	
			Oxa_0,815	Oxa_10
1	Rp1_ACES.1.2	Acétylcholinestérase		1,22
3	Rp1_contig_00864	Ribosomal Protein L 18	-1,40	-1,65
5	Rp1_contig_01288	Dopamine-β-Hydroxylase		-2,03
14	Rp1_contig_09129	Amidase		-2,45
17	Rp1_contig_12968	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase T		-1,99
21	Rp1_contig_13954	Uncharacterised Protein		-2,10
30	Rp1_contig_25496	Uncharacterised Protein		-2,31
34	Rp1_contig_33362	Uncharacterised Protein	-1,23	
38	Rp1_contig_35127	Uncharacterised Protein	-2,25	-2,54
48	Rp1_LOC100533548	ADAM10		-1,47
62	Rp1_LOC101853696	Dentin sialophosphoprotéine		-2,18
72	Rp1_LOC101859054	Matriline		-1,64
87	Rp1_MEGF6.8.16	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6		-2,69

L'étude fonctionnelle de ces gènes impactés nous a permis de caractériser les différents processus métaboliques susceptibles d'être perturbés par l'inhibition ou la surexpression d'un ou de plusieurs gènes. Les résultats du tableau 15 sont en accord avec les principales fonctions déjà mises en évidence lors de l'étude par RNA Seq en différentiel. Les principales fonctions impactées sont la biosynthèse des catécholamines, le métabolisme des acides aminés, la biodégradation des xénobiotiques, la conduction nerveuse des synapses cholinergiques, l'adhésion et le cycle cellulaire, les processus de biominéralisation, la signalisation cellulaire et le traitement de l'information génétique.

b. Impacts de la carbamazépine évalués sur 94 gènes par RT-qPCR

La figure 57 représente la répartition des 94 gènes dans chacune des deux conditions d'expositions à la CBZ (0,165 et 25 µg/L) en fonction de leur ratio d'expression et de la significativité.

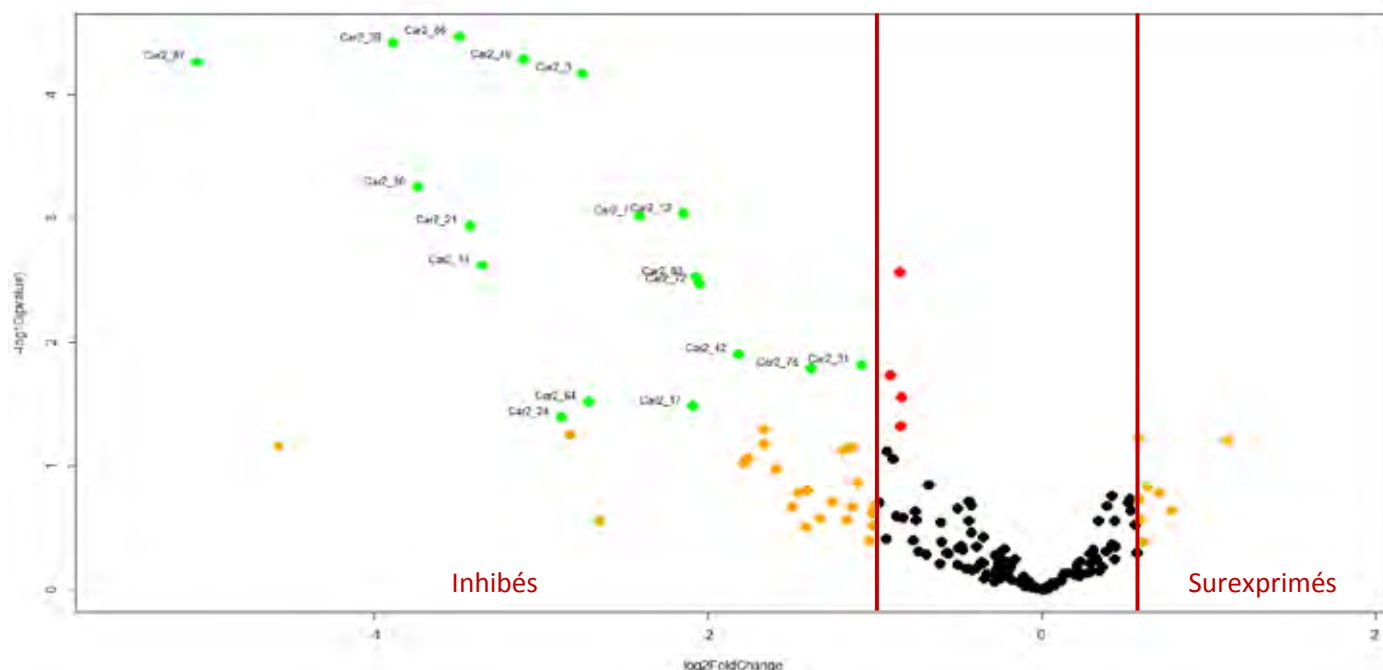


Figure 57 : Représentation graphique de type volcano plot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la carbamazépine. Car1_gène : carbamazépine à 0,165 $\mu\text{g/L}$; Car2_gène : carbamazépine à 25 $\mu\text{g/L}$; $\log_2(\text{FoldChange})$: Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$; $-\log_{10}(\text{pvalue})$: - log de base 10 de la pvalue obtenue lors du calcul des ratios d'expressions ; Orange : Gènes inhibés ou surexprimés avec pvalue > 0.05 ; Vert : Gènes inhibés ou surexprimés avec pvalue < 0.005 ; Noir et Rouge : Gènes non différentiellement exprimés

L'effet global inhibiteur de la CBZ sur les 94 gènes sélectionnés à partir de l'étude en RNA Seq est représenté par la figure 57. On constate que la CBZ a un effet inhibiteur uniquement pour la concentration 25 $\mu\text{g/L}$. On compte 18 gènes significativement inhibés pour la plus forte concentration de CBZ. Pour l'exposition à une solution de CBZ à 0,165 $\mu\text{g/L}$, on ne constate pas d'effet significatif sur les 94 gènes étudiés. Malgré un impact de la CBZ sur le développement embryonnaire du *Radix* à la concentration environnementale (0,165 $\mu\text{g/L}$), on ne constate pas de gènes significativement impactés par ce médicament. En fait, en prélevant les premiers organismes éclos (en même temps que l'éclosion des témoins) pour l'extraction d'ARN, nous avons certainement sélectionné les organismes les moins impactés par la CBZ ou ceux s'étant adaptés à la présence de CBZ, sans provoquer d'effet. De plus, le fait de prélever des organismes ayant éclos signifie que le développement embryonnaire est fini et que le retard de développement embryonnaire observé n'est pas nécessairement lié à une perturbation transcriptomique. La plus faible concentration peut impacter le développement, mais pas l'organisme une fois formé, d'où la deuxième hypothèse soulevée qui serait que la concentration 0,165 $\mu\text{g/L}$ serait trop faible pour perturber les processus métaboliques et/ou trop faibles pour initier un mécanisme de réponse par les organismes.

Tableau 16 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la carbamazépine				
N° gène	N° accession	Fonction	Log ₂ (Fold Change)	
			Car_0,165	Car_25
3	Rp1_contig_00864	Ribosomal Protein L 18		-2,76
7	Rp1_contig_01993	Kielin/chordin		-2,40
12	Rp1_contig_05989	Uncharacterised Protein		-2,15
14	Rp1_contig_09129	Amidase		-3,35
17	Rp1_contig_12968	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase T		-2,08
21	Rp1_contig_13954	Uncharacterised Protein		-3,43
24	Rp1_contig_19175	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3-like		-2,88
30	Rp1_contig_25496	Uncharacterised Protein		-3,74
31	Rp1_contig_28236	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2-like (MAP3K2)		-1,08
38	Rp1_contig_35127	Uncharacterised Protein		-3,89
42	Rp1_contig_38047	Alpha-L-fucosidase		-1,82
48	Rp1_LOC100533548	ADAM 10		-3,10
64	Rp1_LOC101855107.1.4	Sushi nidogen and EGF domain		-2,71
72	Rp1_LOC101859054	Matrilin		-2,05
78	Rp1_LOC101862413.2.3	Fibropellin		-1,38
80	Rp1_LOC101863302	Uncharacterised Protein		-2,07
86	Rp1_LOC763190	Sushi nidogen and EGF domain		-3,50
87	Rp1_MEGF6.8.16	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6		-5,06

L'étude fonctionnelle des gènes dont l'expression est modulée par la CBZ à 25 µg/L est présentée dans le tableau 16. Ces résultats suggèrent que les principales fonctions impactées sont globalement les mêmes que lors d'une exposition à l'oxazépam. On retrouve le traitement de l'information génétique, l'adhésion et le cycle cellulaire, la signalisation cellulaire et le métabolisme des acides aminés et des glycanes.

c. Impacts de la cyamémazine évalués sur 94 gènes par RT-qPCR

La figure 58 représente la répartition des 94 gènes dans chacune des deux conditions d'expositions à la CYZ (0,01 et 100 µg/L) en fonction de leur ratio d'expression et de la significativité.

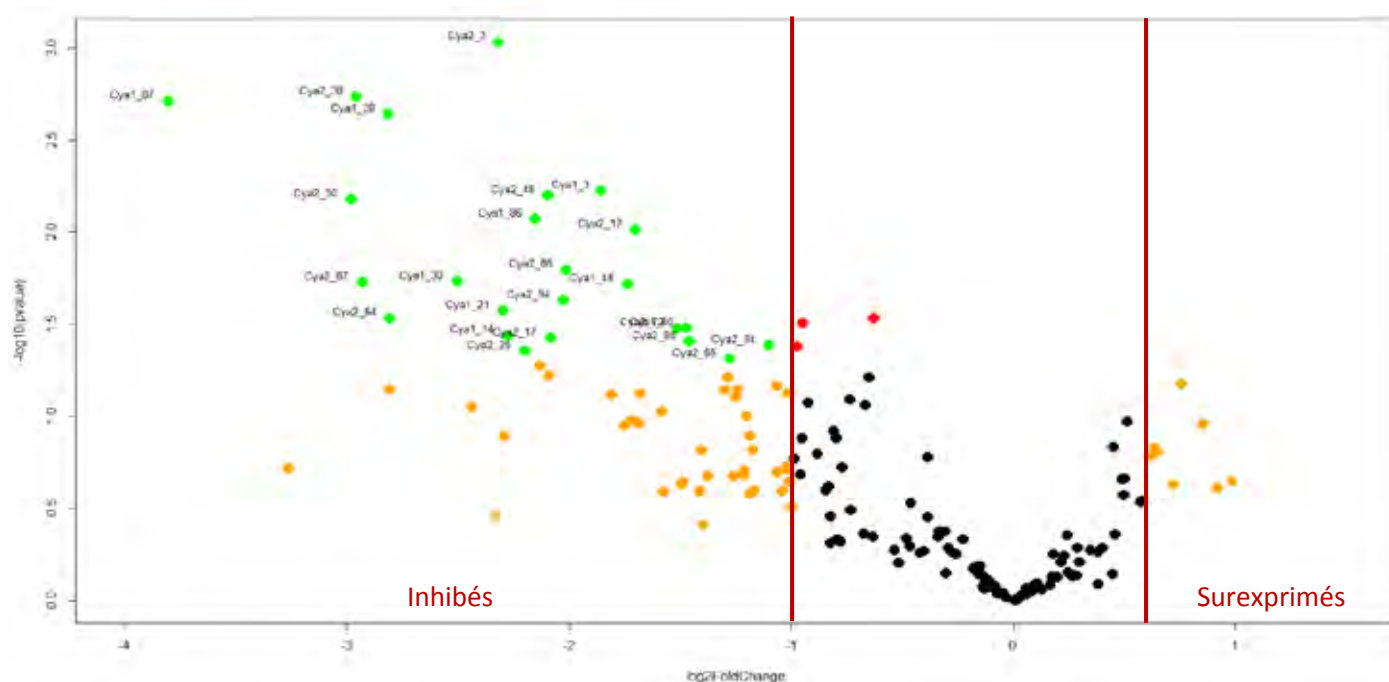


Figure 58 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la cyamémazine. Cya1_gène : cyamémazine à 0,165 µg/L ; Cya2_gène : cyamémazine à 100 µg/L ; $\log_2(\text{FoldChange})$: Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$; $-\log_{10}(\text{pvalue})$: - log de base 10 de la pvalue obtenue lors du calcul des ratios d'expressions ; Orange : Gènes inhibés ou surexprimés avec pvalue > 0.05 ; Vert : Gènes inhibés ou surexprimés avec pvalue < 0.005 ; Noir et Rouge : Gènes non différentiellement exprimés

L'expression des 94 gènes sélectionnés à partir de l'étude en RNA Seq lors d'une exposition à la CYZ est représentée par la figure 58. On constate que la CYZ a un effet uniquement inhibiteur, même à de faibles concentrations comme la concentration environnementale de 0,01 µg/L. On compte 9 gènes significativement impactés pour la plus faible concentration et 15 gènes significativement inhibés par une exposition des organismes à 100 µg/L de CYZ.

Tableau 17 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la cyamémazine				
N° gène	N° accession	Fonction	Log ₂ (Fold Chage)	
			Cya_0,01	Cya_100
3	Rp1_contig_00864	Ribosomal Protein L 18	-1,86	-2,32
12	Rp1_contig_05989	Uncharacterised Protein		-1,70
14	Rp1_contig_09129	Amidase	-2,28	
17	Rp1_contig_12968	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase T		-2,09
20	Rp1_contig_13618	Hemagglutinin		-2,20
21	Rp1_contig_13954	Uncharacterised Protein	-2,30	
30	Rp1_contig_25496	Uncharacterised Protein	-2,51	-2,98
34	Rp1_contig_33362	Uncharacterised Protein		-1,10
38	Rp1_contig_35127	Uncharacterised Protein	-2,81	-2,96
48	Rp1_LOC100533548	ADAM 10	-1,74	-2,09
56	Rp1_LOC101849541.1.7	ADAM 17		-1,28
64	Rp1_LOC101855107.1.4	Sushi nidogen and EGF domain		-2,81
72	Rp1_LOC101859054	Matrilin		-1,52
80	Rp1_LOC101863302	Uncharacterised Protein	-1,47	-1,46
86	Rp1_LOC763190	Sushi nidogen and EGF domain	-2,15	-2,02

Tableau 17: suite

87	Rp1_MEGF6.8.16	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6	-3,81	-2,93
94	Rp1_contig_08568	Furine		-2,03

Le tableau 17 montre les fonctions des gènes impactés par au moins une des conditions d'expositions à la CYZ. Les principaux processus du métabolisme impactés par la CYZ sont la signalisation cellulaire, l'adhésion et le cycle cellulaire, le traitement de l'information génétique, le métabolisme des acides aminés et la biodégradation des xénobiotiques.

d. Impacts de la sertraline évalués sur 94 gènes par RT-qPCR

La figure 59 représente la répartition des 94 gènes dans chacune des deux conditions d'expositions à la SRT (0,001 et 10 µg/L) en fonction de leur ratio d'expression et de la significativité.

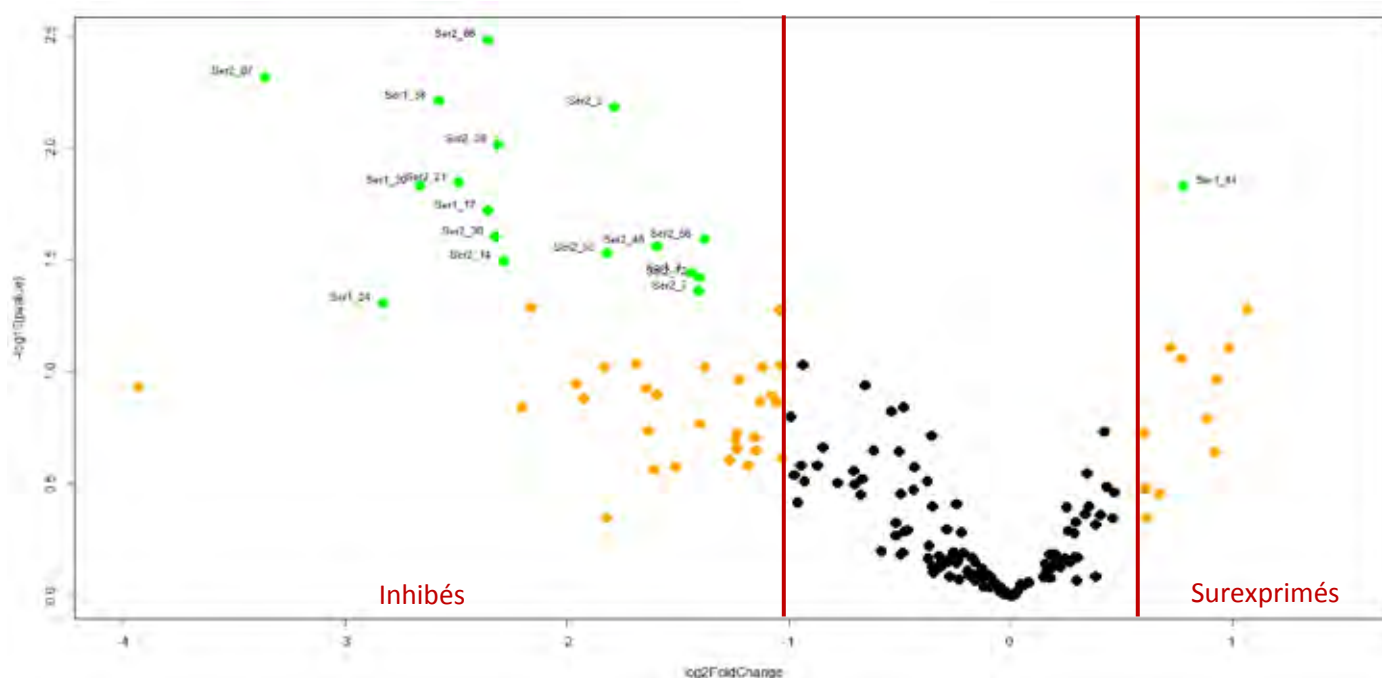


Figure 59 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la sertraline. Ser1_gène : sertraline à 0,001 µg/L ; Ser2_gène : sertraline à 10 µg/L ; log2(FoldChange) : Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta CT$; $-\log_{10}(pvalue)$: $-\log$ de base 10 de la pvalue obtenue lors du calcul des ratios d'expressions ; Orange : Gènes inhibés ou surexprimés avec pvalue > 0,05 ; Vert : Gènes inhibés ou surexprimés avec pvalue < 0,005 ; Noir : Gènes non différentiellement exprimés

L'expression des 94 gènes sélectionnés à partir de l'étude en RNA Seq lors d'une exposition à la SRT est représentée par la figure 59. On constate que la SRT a un effet majoritairement inhibiteur, même à de faibles concentrations comme la concentration environnementale de 0,001 µg/L. On compte 5 gènes significativement inhibés et un surexprimé pour la plus faible concentration et 12 gènes inhibés par une exposition des organismes à 10 µg/L de SRT.

Tableau 18 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la sertraline

N° gène	N° accession	Fonction	Log ₂ (Fold Change)	
			Ser_0,001	Ser_10
3	Rp1_contig_00864	Ribosomal Protein L 18	-1,44	-1,79
7	Rp1_contig_01993	Kielin/chordin		-1,41
14	Rp1_contig_09129	Amidase		-2,29
17	Rp1_contig_12968	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase T	-2,36	
21	Rp1_contig_13954	Uncharacterised Protein		-2,49
24	Rp1_contig_19175	Probable E3 ubiquitin-protein ligase DTX3-like	-2,83	
30	Rp1_contig_25496	Uncharacterised Protein	-2,66	-2,32
38	Rp1_contig_35127	Uncharacterised Protein	-2,58	-2,31
44	Rp1_contig_41364	Periostin	0,78	
48	Rp1_LOC100533548	ADAM 10		-1,59
53	Rp1_LOC101846931	Cytochrome P450 3A5		-1,82
56	Rp1_LOC101849541.1.7	ADAM 17		-1,38
72	Rp1_LOC101859054	Matrilin		-1,40
86	Rp1_LOC763190	Sushi nidogen and EGF domain		-2,36
87	Rp1_MEGF6.8.16	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6		-3,36

Le tableau 18 montre les fonctions des gènes impactés par au moins une des conditions d'expositions à la SRT. Les principaux processus métaboliques impactés par la SRT sont la signalisation cellulaire, l'adhésion, le cycle cellulaire, le traitement de l'information génétique, le métabolisme des acides aminés et la biodégradation des xénobiotiques.

e. Bilan et discussion de l'impact transcriptomique des psychotropes sur le *R. balthica*

L'étude en RT-qPCR de l'impact de chaque molécule sur le transcriptome du *Radix* a permis d'identifier 6 gènes dont l'expression est inhibée par les quatre médicaments. On trouve les gènes codant la protéine ribosomique L 18 (RPL18, Rp1_contig_00864), une protéine ayant une fonction Amidase (Rp1_contig_09129), un récepteur de type tyrosine-protéine phosphatase (Rp1_contig_12968), une métalloprotéine de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) : ADAM10 (Rp1_LOC100533548), la protéine Matrilin (Rp1_LOC101859054) et une protéine à de multiples domaines de facteur de croissance épidermique (MEGF-6, Rp1_MEGF6.8.16). La discussion autour du gène codant la protéine ADAM10 intervenant dans la voie de signalisation Notch a déjà été réalisée dans le chapitre II. d. ii. (Voir Chapitre 3. II. d. iii. et Mazzitelli *et al.* 2016). Il est intéressant de constater que les quatre molécules impactent la même voie de signalisation et ce de la même façon. Ainsi, on peut supposer que cette voie de signalisation, impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, la migration et la survie cellulaire est une réponse

spécifique de l'exposition des gastéropodes juvéniles à des psychotropes. Il pourrait être intéressant de voir si cette voie est impactée à l'identique chez les adultes. Le gène inhibé codant pour une protéine de type Amidase est impliqué dans la biodégradation des xénobiotiques (Kirkiacharian 2010). En effet une fois absorbés, les médicaments peuvent subir différentes phases de métabolisation avec une hydrolyse des fonctions esters par une Estérase ou encore une hydrolyse des fonctions amides par une Amidase (Kirkiacharian 2010). Les molécules utilisées dans notre étude sont des xénobiotiques potentiellement métabolisés par ces protéines. De ce fait, l'impact transcriptomique sur cette famille de gènes coïncide avec nos expérimentations. Le gène MEGF-6 codant une protéine de la famille des facteurs de croissance épidermique (EGF) est lui aussi inhibé par toutes les molécules testées. Les protéines EGF sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la signalisation cellulaire, les récepteurs membranaires ou encore dans la composition de la matrice extracellulaire (Yang *et al.* 1989; Davis 1990; Bisgrove *et al.* 1991). Comme l'a montré l'étude de Kesteren *et al.*, (2008) sur les neurones de *Lymnaea*, les EGF semblent aussi pouvoir réguler la formation des synapses cholinergiques chez les mollusques. Les 4 médicaments étudiés sont connus pour avoir des effets anticholinergiques chez l'Homme. La conduction nerveuse cholinergique étant très conservée à travers le règne animal, on peut supposer que les effets anticholinergiques puissent être aussi observés chez le *Radix*. Ainsi, l'inhibition du gène MEGF-6 pourrait participer à l'effet anticholinergique des psychotropes. L'inhibition de ce gène pourrait donc conduire à une perturbation de la formation des synapses cholinergiques chez le *Radix*, nécessaires à la contraction musculaire et donc au déplacement, mais aussi au battement cardiaque du mollusque. L'impact des quatre molécules sur l'expression de ce gène pourrait être en partie à l'origine du retard de développement embryonnaire observé pour les mêmes concentrations au cours du test d'embryotoxicité. Dans le même sens, le gène codant le récepteur de type tyrosine phosphatase T (PTPRT) est également inhibé dans notre étude. Cette protéine pourrait être également impliquée dans la formation et la régulation des synapses comme le montre l'étude de localisation sur culture de cellules rénales d'embryon humain de Lim *et al.*, (2009) et intervient aussi dans les processus d'adhésion cellulaire (Besco *et al.* 2006; Lim and Lee 2009; Lee 2015). Le gène codant la protéine RPL 18 apparaît lui aussi inhibé par l'exposition aux médicaments. Cette protéine est impliquée dans le processus majeur du transport des ARN et de la synthèse des protéines qui sont d'importantes fonctions pour la croissance cellulaire (Lempiäinen and Shore 2009). L'inhibition des gènes codant les protéines ribosomiques peut causer des anomalies du développement comme l'ont montré Uechi *et al.*, (2006). Bien que nous n'ayons pas observé d'anomalie du développement à la suite d'une exposition aux psychotropes, nous avons tout de même observé un retard du développement embryonnaire en lien avec la croissance cellulaire des embryons exposés aux 4 psychotropes, suggérant un lien avec l'inhibition du gène RPL 18. Il est étonnant de trouver une différence

significative de l'expression de ce gène qui est souvent (parfois à tort) utilisé comme gène de référence. Cependant, comme l'a montré l'étude de Puder *et al.* (1993), les cellules du cancer colorectal humain présentent une surexpression du gène *rpl18* par rapport à un tissu colorectal sain. Ces résultats montrent que l'expression de ce gène n'est pas toujours stable et peut être modulée par une maladie ou une exposition à un xénobiotique. Le dernier gène impacté par tous les médicaments code la Matriline. Cette protéine intervient principalement dans la stabilisation de la matrice extracellulaire (MEC) en formant un polymère à partir de plusieurs unités de Matriline pour former des structures supramoléculaires, résultant à la construction d'un réseau de filaments (Frank *et al.* 2002; Mason and Arndt 2004; Bai *et al.* 2013). Ces six gènes inhibés par chaque médicament interviennent dans de nombreux processus cellulaires. La mise en évidence de la modification de leur expression pourrait donc être corrélée aux perturbations du développement embryonnaire observées précédemment pour les psychotropes, mais aussi à des perturbations de la reproduction ou encore du déplacement. Ainsi, l'exposition des mollusques à ces psychotropes pourrait impacter les populations de *Radix* et plus largement de mollusques d'eau douce.

i. Effets spécifiques de l'oxazépam

L'OXZ inhibe spécifiquement l'expression de gènes codant la Dopamine-Beta-Hydroxylase (DBH) (Rp1_contig_01288) et la Dentine sialophosphoprotéine (Rp1_LOC101853696) et augmente l'expression du gène codant l'acétylcholinestérase (Rp1_ACES.1.2). Comme pour l'étude en RNAseq, les gènes de la Dopamine- β -hydroxylase et de l'Acétylcholinestérase (AChE) sont impliqués dans les processus de biosynthèse des catécholamines et donc de la conduction nerveuse dopaminergique, adrénergique et cholinergique. L'inhibition de la DBH par l'OXZ a été discutée dans le Chapitre 3. II. d. iii. et dans l'étude de Mazzitelli *et al.* (2016). L'inhibition de ce gène suggère donc un impact sur la biosynthèse des catécholamines, et donc de la conduction nerveuse adrénergique et noradrénergique. La surexpression de l'AChE pourrait induire une inhibition de la conduction cholinergique en dégradant l'acétylcholine avant même qu'elle n'arrive au niveau des récepteurs spécifiques. La revue de Kodirov (2011) montre que l'Acétylcholine (ACh) intervient dans le contrôle du fonctionnement cardiaque chez la *Lymnaea*, avec un effet inotrope négatif (diminution de l'amplitude des battements). Il a été montré que l'ACh à 5 μ M dépolarise de manière réversible la membrane des neurones cardiaques inhibiteurs chez la *Lymnaea*. Cette inhibition est renforcée par un blocage de l'AChE (Jurchenko *et al.* 1973a; Jurchenko *et al.* 1973b). Ainsi, une surexpression de l'AChE provoquée par une exposition à l'OXZ pourrait entraîner une diminution de l'ACh dans les synapses cholinergiques et donc augmenter l'amplitude des battements cardiaques chez le *Radix*. De plus, l'ACh étant dégradée par l'AChE, la surexpression de celle-ci par l'OXZ pourrait entraîner une diminution de l'ACh dans les synapses cholinergiques et donc une inhibition de la vitesse de

déplacement des *Radix* à cause d'une contraction musculaire moins efficace. Bien que nous n'ayons pas analysé le déplacement des *Radix* en présence de psychotropes, il serait intéressant de le faire en parallèle d'une étude d'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'Ach et le gène de l'AchE avec le dosage de l'activité AchE. Plusieurs études ont montré un lien de cause à effet entre l'exposition à l'OXZ et le déplacement des organismes. Ainsi, Huerta *et al.*, (2016) ont montré une diminution de la vitesse du déplacement du poisson *Pimephales promelas* exposé à une solution d'OXZ à 4,7 µg/L. A l'opposé de ces résultats, les travaux de Brodin *et al.*, (2013) montrent une augmentation de l'activité des poissons *Perca fluviatilis* exposés à des solutions d'OXZ de concentrations allant de 1,8 à 910 µg/L. De même, l'étude de Chiffre *et al.* (2016) a montré que l'activité du poisson *O. latipes* est augmentée lorsqu'il est exposé à de faibles concentrations d'oxazépam (1,8 et 10 µg/L). Bien que nous ayons observé une inhibition du gène de l'AchE suggérant une inhibition de la mobilité, ces deux dernières études montrent une augmentation de l'activité des organismes exposés à des psychotropes. Celle-ci pourrait également s'expliquer par d'autres perturbations des voies de signalisation par l'AchE. Enfin, les gènes codant la Dentin-sialophosphoprotéine et la Matriline interviennent dans la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC), notamment dans le processus de minéralisation de la MEC grâce à leur capacité de fixation du Ca^{2+} permettant la formation de l'hydroxyapatite (Linde 1989; Godovikova and Ritchie 2007; Yang *et al.* 2013). Une modification de l'expression du gène codant la Matriline, intervenant dans le processus de biominéralisation pourrait entraîner des malformations de la coquille (Huang *et al.* 2015), voire la synthèse d'une coquille moins résistante, rendant les mollusques plus vulnérables aux prédateurs et aux traitements abiotiques de l'environnement. De même, nous observons l'inhibition du gène codant la Dentine qui est une protéine impliquée dans les processus de biominéralisation comme celui de la coquille ou de la dent. Les odontoblastes chez les mollusques sont impliqués dans la formation de la dentine, le tissu minéral principal de la dent (Scheltema *et al.* 2003). Une inhibition du gène codant cette protéine au cours du développement du *Radix* pourrait entraîner des malformations de la radula du mollusque et donc perturber son alimentation et ses réserves énergétiques. *In fine*, ces perturbations pourraient aboutir à la modulation des populations de mollusques dans l'environnement.

ii. Effets spécifiques de la carbamazépine

La CBZ impacte le transcriptome du *Radix* à la concentration de 25 µg/L, mais aucun effet n'est détectable à la concentration environnementale. Cette molécule inhibe spécifiquement 4 gènes codant 4 protéines, une MAP3K2 (Rp1_contig_28236), une α -Fucosidase (Rp1_contig_38047), une Ubiquitine ligase (DTX3, Rp1_contig_19175) et une Fibropelline (Rp1_LOC101862413.2.3). Ils interviennent dans la signalisation cellulaire, l'apoptose, différentes étapes du cycle cellulaire ou

encore l'induction du mésoderme et de l'endoderme durant l'embryogenèse. Hermsen *et al.* (2013) ont étudié l'impact transcriptomique de deux psychotropes, dont la CBZ sur le développement embryonnaire du poisson-zèbre. Ils ont ainsi mis en évidence son effet sur de nombreuses voies cellulaires et moléculaires, comme on a pu le montrer dans notre étude. De nombreuses voies de biosynthèse sont modulées par les deux psychotropes, telles que la voie de signalisation PPAR, Nodal ou encore la voie de signalisation des inhibiteurs de fixation à l'ADN (Id signaling pathway) (Hermsen *et al.* 2013). La CBZ impacte aussi de nombreux gènes impliqués dans les voies de signalisations cellulaires et dans le développement de la crête neurale (Hermsen *et al.* 2013) chez le poisson zèbre. Ces résultats vont dans le même sens que l'effet de la CBZ sur le *Radix* avec notamment l'inhibition du gène codant la protéine Kielin/chordin-like ayant une fonction inductrice de cellules précurseur des cellules des crêtes neurales. Ainsi, on peut supposer que le retard observé sur le développement embryonnaire pourrait être lié à l'inhibition du gène Kielin/chordin-like suite à une exposition à 25 µg/L de CBZ. Le gène de la Fibropelline est un gène normalement très exprimé lors du développement embryonnaire du mollusque (Bisgrove *et al.* 1991). Comme le montre l'étude de Huang *et al.* (2012), le gène de la Fibropelline fait partie du cluster de gènes fortement exprimés au cours du développement du mollusque *Halotis diversicolor*. Aussi connue comme un facteur de croissance épidermique, cette protéine a été découverte pour la première fois chez l'oursin de mer avec une fonction dans le développement et la croissance (Hursh *et al.* 1987; Suyemitsu *et al.* 1989). Par son rôle dans les voies spécifiques de transduction du signal, l'inhibition de la Fibropelline pourrait conduire à des anomalies de développement (Yang *et al.* 1989; Kamei *et al.* 2000). Ainsi, l'inhibition de ce gène pourrait être à l'origine du retard de développement embryonnaire observé lors de l'étude d'embryotoxicité. Le dernier gène spécifiquement inhibé par la CBZ code la protéine α -fucosidase qui intervient dans le métabolisme des glycanes (glycosaminoglycane, glycosylphosphatidylinositol...) impliqué dans la signalisation cellulaire, la communication cellulaire et le système immunitaire. L'inhibition de ces gènes pourrait donc altérer la fonction immunitaire du mollusque, mais aussi perturber les différentes voies de signalisation particulièrement exprimées au cours du développement embryonnaire. Il serait donc intéressant de mener une étude des perturbations de l'immunité chez le *Radix* exposé aux psychotropes.

iii. Effets spécifiques de la cyamémazine

Les principaux gènes significativement inhibés par la CYZ à 100 µg/L sont des gènes codant des protéines impliquées dans la voie de signalisation Notch, (ADAM 17 (Rp1_LOC101849541.1.7)) et ADAM 10 (Rp1_LOC100533548)) et dans la maturation protéique (Furine, (Rp1_contig_08568)). Le rôle et l'impact de l'inhibition de ces trois gènes ont été discutés dans le chapitre II. d. ii. et dans l'étude de Mazzitelli *et al.* (2016) (Voir Chapitre 3. II. d. ii.). Comme l'ont montré de nombreuses

études (Diederich *et al.* 1994; Matsuno *et al.* 1995; Weinmaster 1997; Deftos *et al.* 1998; Schweisguth 2000; Baron 2012; Gavai *et al.* 2015), la voie de signalisation Notch est à l'origine de nombreux processus cellulaires impliqués dans de multiples processus biologiques tels que la signalisation cellulaire, la transcription de gènes cibles, le développement des neurones, des muscles, dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire. Un ou plusieurs de ces mécanismes intervenant dans le processus d'embryogenèse telle que la migration cellulaire étant à l'origine de l'organisation des feuillettes sont essentiels au bon développement des organismes. Un impact délétère de la CYZ sur la voie de signalisation Notch pourrait donc être à l'origine du retard de développement observé lors d'une exposition des embryons de *Radix* à la CYZ.

iv. Effets spécifiques de la sertraline

La SRT inhibe l'expression de 5 gènes à la concentration environnementale et inhibe 12 gènes à la concentration 10 µg/L, dont 3 sont communs aux deux conditions (2 contigs codant 2 protéines non caractérisées et le contig codant RPL 18). La SRT induit l'expression d'un contig codant la protéine Périostine. Parmi tous les contigs dont l'expression est modulée par la SRT, seuls deux sont spécifiques (Périostine et CYP3A5) à une exposition à la SRT et n'ont pas été discutés. Le gène codant une Périostine, avec les gènes codant DTX3, ADAM 10 et 17, MEGF-6 et Kielin/chordin-like sont impliqués majoritairement dans des processus de contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, de signalisation cellulaire ou encore d'adhésion et de migration cellulaires. En accord avec nos résultats, l'étude de Bossus *et al.* (2014) chez l'amphipode *Echinogammarus marinus* montre que la SRT impacte à de faibles concentrations (> à 0,01µg/L) l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la transduction du signal cellulaire (Arrestin), dans l'adhésion et la migration cellulaire (Neurocan core protein). Campos *et al.* (2013) montrent également un impact de deux inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine proche de la SRT (fluoxétine et fluvoxamine) sur le transcriptome de *Daphnia magna*. Ces résultats montrent un impact des SSRI sur la voie de biosynthèse de la sérotonine, sur le métabolisme du cycle de Krebs ou encore sur l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans les processus de morphogenèse ou de différenciation tissulaire (Campos *et al.* 2013). Ces résultats corroborent les observations réalisées suite à notre étude des modulations du transcriptome de *Radix* ainsi que le retard du développement embryonnaire suite à une exposition à la SRT. Cette molécule perturbe les processus d'adhésion et de migration cellulaire qui sont deux processus fondamentaux pour le bon déroulement du développement embryonnaire. Les impacts transcriptomiques de la SRT sur le *Radix* peuvent donc être corrélés avec les résultats de toxicité observés sur le développement d'embryons de *Radix*. A côté de ces gènes impliqués dans la signalisation et l'adhésion cellulaire, le gène CYP3A5, intervenant dans les processus de détoxification est également inhibé en présence de SRT. Ce gène qui intervient

dans la phase I de détoxification a pour fonction principale de métaboliser les molécules médicamenteuses de l'organisme. Nous pouvions donc nous attendre à une activation de ce gène. Son inhibition est probablement le résultat d'une interaction directe de la SRT sur l'expression du gène CYP3A5. Cette inhibition pourrait conduire à un ralentissement du processus de détoxification des *Radix* qui accentuerait les effets de cette molécule sur les différentes fonctions de l'organisme.

f. Comparaison de l'étude du RNAseq en différentielles et de l'étude en RT-qPCR

L'étude en RT-qPCR nous a permis d'une part de valider les résultats obtenus à la suite du RNAseq en différentiel, ainsi que d'affiner les résultats déjà observés. Ainsi, lorsque l'on compare la modulation des gènes en RT-qPCR et en RNAseq en différentiel, on constate que seuls 13 des 94 gènes (soit 14 %) testés en RT-qPCR valident le RNAseq. Parmi ces 13 gènes, l'Amidase et le Récepteur de type tyrosine phosphatase T sont inhibés en RT-qPCR et surexprimés après l'analyse du RNAseq en différentiel. L'expression des 11 autres gènes va dans le même sens pour les deux méthodes. La grosse différence observée entre le nombre de gènes dont l'expression est potentiellement impactée à la suite de l'étude du RNAseq en différentiel et ceux qui le sont réellement après analyse en RT-qPCR provient du fait que cette dernière est une méthode beaucoup plus reproductible et sensible. En effet, la méthode d'analyse en RT-qPCR utilise l'amplification d'un fragment du gène étudié pour lequel on pourra déterminer une quantité relative ou absolue. Cette méthode présente peu de biais si ce n'est le biais de l'expérimentateur et elle est très reproductible. La méthode du RNAseq en différentiel quant à elle présente plusieurs biais (notamment lorsque le génome de l'organisme n'a jamais été séquencé), tels qu'une amplification non spécifique, l'utilisation d'adaptateurs, les erreurs de séquençage, tous les reads séquencés ne matchent pas avec le transcriptome assemblé ou encore la présence de contigs chimères portant plusieurs ORFs. Ces biais sont renforcés par les méthodes utilisées lors des traitements des séquences nucléotidiques qui, pour l'assemblage, utilisent des scripts souvent propres à l'équipe qui le réalise. De plus, il existe plusieurs scripts utilisables lors de l'analyse de l'expression en différentielle des gènes qui ne possèdent pas toujours les mêmes traitements statistiques. Ainsi, avec deux méthodes de traitements en différentiel on peut obtenir plus ou moins de gènes différentiellement exprimés, suggérant l'utilisation de valeurs seuils différentes d'un traitement à l'autre. Cependant, l'utilisation du RNAseq en différentiel est très utile lorsqu'aucune donnée transcriptomique n'est disponible dans la littérature, mais présente le désavantage d'être moins spécifique que la méthode en RT-qPCR. Cependant, cette méthode permet tout de même de comparer la réponse du transcriptome d'un organisme entier (dans notre cas) à un stress. Même si on perd de l'information, cette méthode

permet de caractériser les effets d'un stress (physique, chimique, ou biologique) en identifiant les principales voies impactées.

V. Etude fonctionnelle de quelques gènes impactés par l'oxazépam

Afin d'aller plus loin dans l'étude de l'impact transcriptomique de l'oxazépam, nous avons réalisé une étude d'hybridation *in toto* de 5 gènes sur des embryons de *Radix* exposés ou non à l'oxazépam. Le but était d'une part de caractériser de possibles perturbations dans la localisation cellulaire de certains gènes impactés par l'oxazépam et d'autre part d'essayer de mieux comprendre la fonction de gènes non caractérisés chez le *R. balthica*. Cinq gènes ont été sélectionnés pour la réalisation de l'hybridation *in toto* : la Dentine (Rp1_contig_31167), la Kiéline/Chordine (Rpl_contig_01993), l'Acétylcholinestérase (Rp1_ACES.1.2), la Fibrilline (RP1_LOC101861648.2.2) et comme référence la β -Tubuline (Rp1_TBB).

Comme on peut l'observer sur la figure 60, l'expression de la β -Tubuline a lieu principalement dans le pied du mollusque. Nous n'avons pas constaté de différence de localisation de la β -Tubuline lorsque les mollusques sont exposés à l'oxazépam. L'étude de localisation des 4 autres gènes testés n'a pas permis d'observer de localisation ni dans la condition témoin ni dans la condition d'exposition à l'oxazépam. On peut expliquer ce problème expérimental par le faible taux d'expression de ces 4 contigs, limitant ainsi la révélation. Cette expérience a nécessité l'utilisation d'anticorps primaires anti-digoxigénine couplés à la Phosphatase Alcaline qui réduit le NBT/BCIP (révélateur) en un précipité bleu. Afin d'amplifier le signal pour ces 4 gènes, nous pourrions utiliser un anticorps primaire anti-digoxigénine et un anticorps secondaire anti-anticorps primaire couplé à la Phosphatase Alcaline.

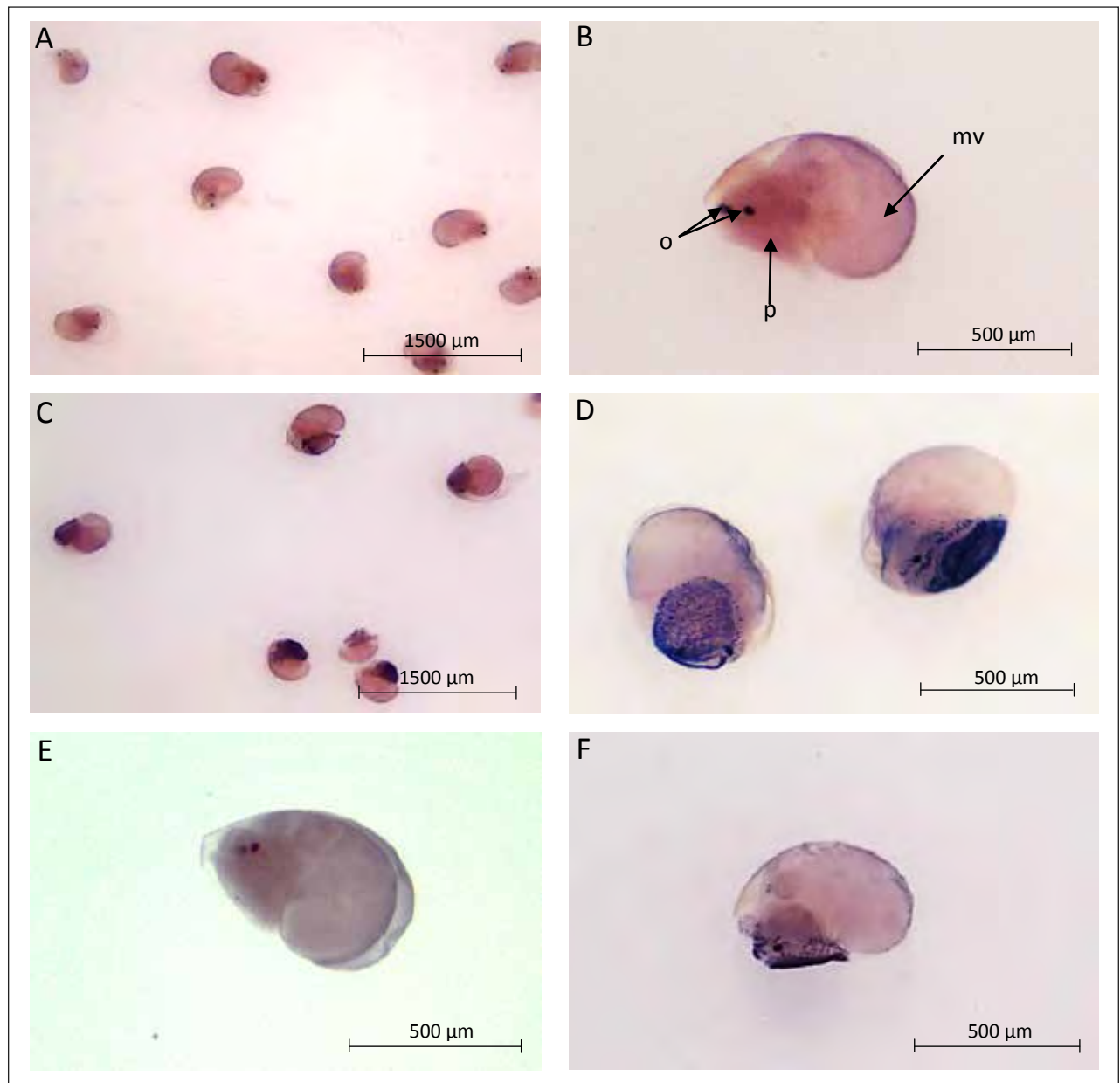


Figure 60 : Photographie de la localisation de la B-tubuline sur des embryons de *Radix* (10 jours post fécondation). A, B et E : Hybridation de la sonde sens de *Rp1_TBB* ; C, D et F : Hybridation de la sonde anti-sens de *Rp1_TBB* ; A, B, C et D : Embryons de *Radix* exposés à 10 µg/L d'oxazépam ; E et F : Embryons de *Radix* exposés aux conditions témoins ; mv : masse viscérale ; p : pied ; o : œil.

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSIONS DES EXPERIMENTATIONS MENEES SUR *S. POLYCHROA*

I. Les psychotropes perturbent-ils la mobilité de la planaire *S. polychroa* ?

Afin d'étudier la toxicité des psychotropes sur la mobilité de la planaire *S. polychroa*, nous avons exposé les organismes pendant 21 jours à chaque psychotrope. Les données représentent la distance moyenne parcourue par les planaires durant 2 minutes de déplacement dans une arène. Les déplacements ont été filmés tous les trois jours et les vidéos analysées à l'aide d'un logiciel de vidéo tracking (EthoVision, Noldus compagny).

a. Étude de la mobilité de *S. polychroa* exposée à l'oxazépam (OXZ)

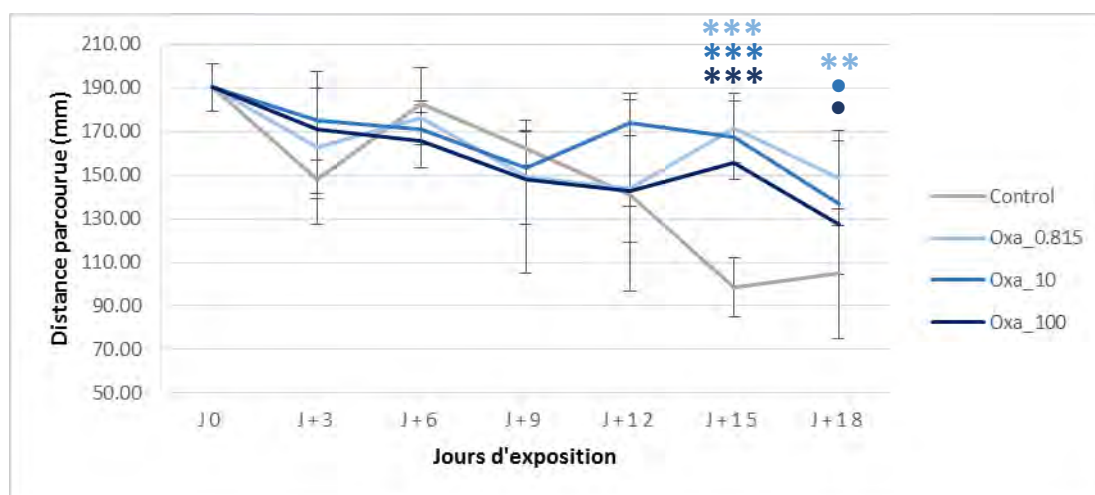


Figure 61 : Représentation graphique de l'impact de l'oxazépam sur la mobilité de la planaire *S. polychroa*. (Moyenne $\pm$ ET) (ANOVA puis test exact de Student, p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

La distance parcourue par les planaires témoins exposées à une solution d'eau AFNOR varie au cours du temps (Figure 61). Au cours des 12 premiers jours, la distance parcourue par ces planaires varie entre 150 et 190 mm. Au cours des six derniers jours, la distance parcourue par les témoins chute à environ 100 mm. L'allure des courbes de chaque condition montre que la mobilité chez les planaires exposées semble plus stable au cours du temps que celle des témoins (Figure 61). De plus, lorsque l'on compare la mobilité des planaires exposées aux 3 concentrations d'OXZ (0,815, 10 et 100 $\mu\text{g/L}$) avec celle des planaires témoins, on observe un effet stimulateur significatif de chaque concentration à partir de 15 jours d'exposition à l'OXZ. Ces résultats suggèrent qu'une exposition à long terme à l'OXZ stimule directement ou indirectement la mobilité de la planaire *S. polychroa*.

b. Étude des perturbations de la mobilité de la planaire *S. polychroa* exposée à la carbamazépine (CBZ)

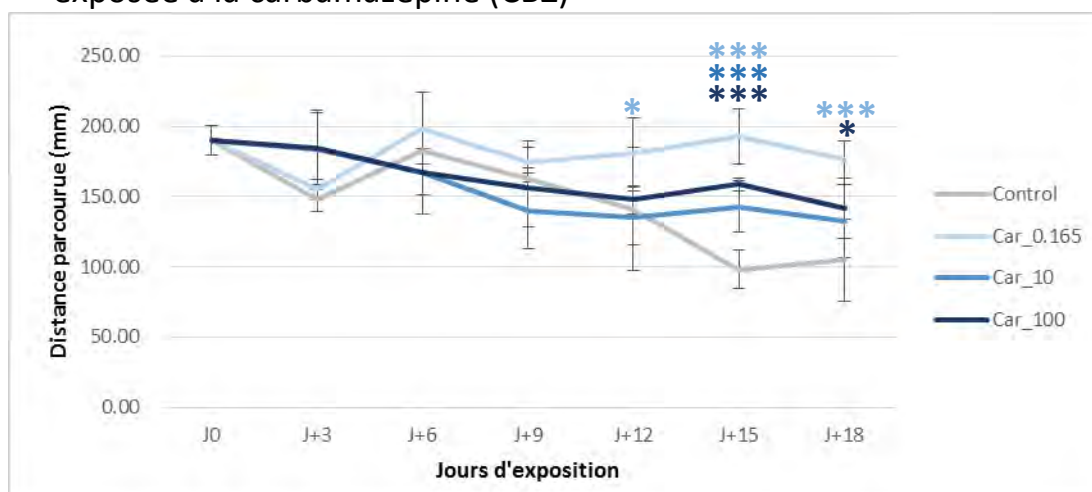


Figure 62 : Représentation graphique de l'impact de la carbamazépine sur la mobilité de la planaire *S. polychroa*. (Moyenne $\pm$ ET) (ANOVA puis test exact de Student, p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

La figure 62 présente la mobilité des planaires exposées à la CBZ. Au cours des 12 premiers jours, la distance parcourue par les planaires varie entre 150 et 200 mm. Au cours des six derniers jours, la distance parcourue par les témoins chute à environ 100 mm. L'allure des courbes de chaque condition montre que la mobilité chez les planaires exposées à la CBZ semble plus stable au cours du temps que la mobilité du témoin. Lorsque l'on compare la mobilité des planaires exposées aux 3 concentrations de CBZ (0,165, 10 et 100 $\mu\text{g/L}$) avec celle des planaires témoins, on observe un effet stimulateur significatif de chaque concentration après 15 jours d'exposition. Ces résultats suggèrent qu'une exposition à long terme à la CBZ stimule directement ou indirectement la mobilité de la planaire *S. polychroa*.

c. Étude de la mobilité de la planaire *S. polychroa* exposée à la cyamémazine (CYZ)

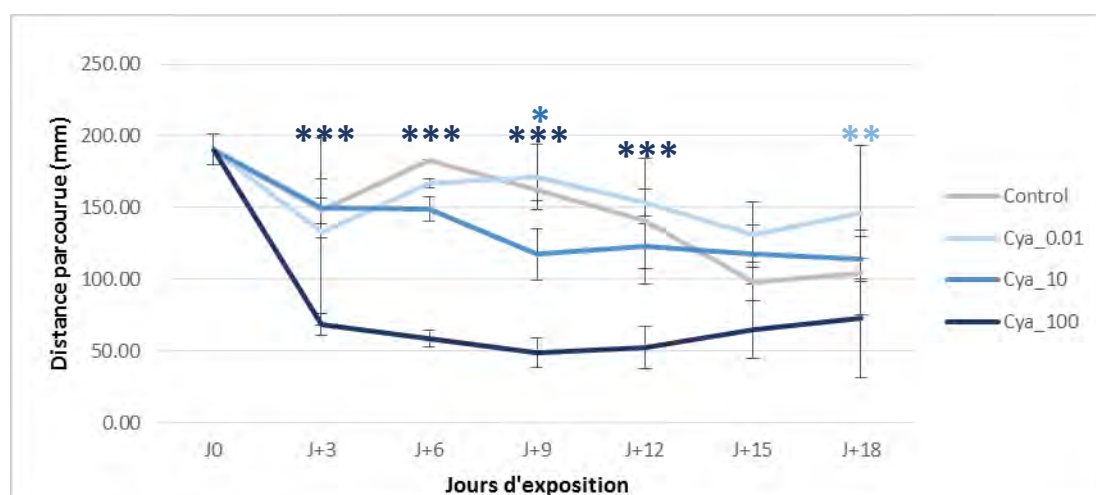


Figure 63 : Représentation graphique de l'impact de la cyamémazine sur la mobilité de la planaire *S. polychroa*. (Moyenne $\pm$ ET) (ANOVA puis test exact de Student, p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

La figure 63 présente le déplacement de la planaire exposée à la CYZ. Au cours des 12 premiers jours, la distance parcourue par les planaires témoins varie entre 150 et 190 mm. Au cours des six derniers jours, la distance parcourue par les témoins chute à environ 100 mm. L'exposition à court terme (12 jours) des planaires à une solution de CYZ à 0,01 µg/L n'a pas d'effet significatif sur la mobilité des planaires. L'allure de la courbe de la mobilité des planaires exposées à 10 µg/L semble plus stable au cours du temps que la mobilité du témoin. De plus, on constate une inhibition significative de la mobilité après 9 jours d'exposition à cette concentration. L'exposition des planaires à une solution de CYZ à 100 µg/L a un effet significatif inhibiteur de la mobilité à court terme (de 3 à 12 jours). Les planaires exposées à cette concentration se déplacent deux à trois fois moins (50 à 60 mm) que les témoins (150 à 190 mm).

d. Étude de la mobilité de la planaire *S. polychroa* exposée à la sertraline (SRT)

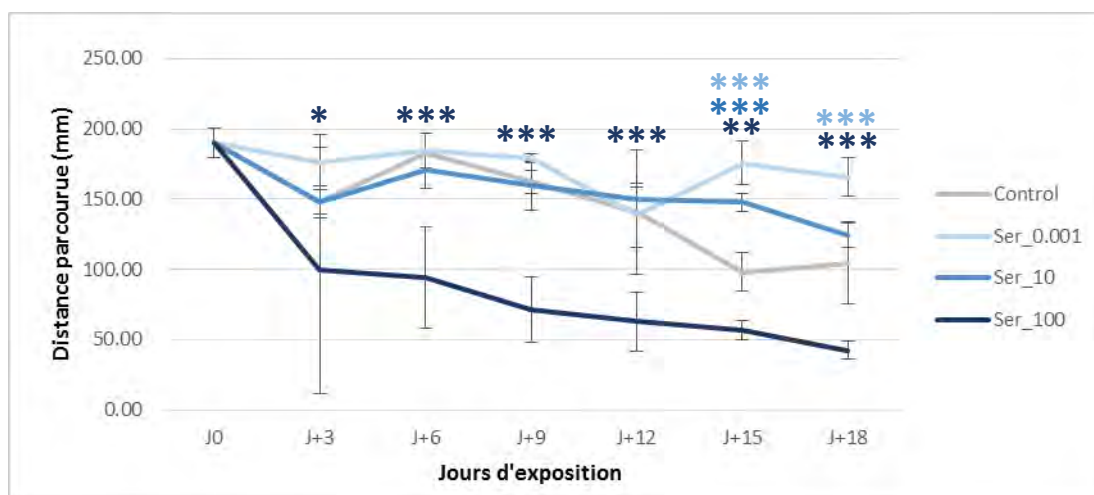


Figure 64 : Représentation graphique de l'impact de la sertraline sur la mobilité de la planaire *S. polychroa*. (Moyenne ± ET) (ANOVA puis test exact de Student, p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

Les effets de la SRT sur la mobilité de la planaire sont présentés par la figure 64. Au cours des 12 premiers jours, la distance parcourue par les planaires témoins et celles exposées aux 2 plus faibles concentrations varie entre 150 et 190 mm. Comme on a pu le constater avec les autres molécules, la mobilité des planaires exposées aux 2 plus faibles concentrations de SRT semble plus stable que celle des témoins avec moins de variations entre chaque période. De plus, on observe un effet stimulateur d'une exposition à long terme (15 à 18 jours) à ces deux concentrations de SRT sur la mobilité de la planaire *S. polychroa*. Par contre, une exposition à une solution de SRT à 100 µg/L inhibe significativement 0,5 à 1 fois le déplacement de la planaire *S. polychroa*.

e. Bilan et discussion des perturbations de la mobilité de la planaire par une exposition aux psychotropes

Les psychotropes ciblent principalement le système nerveux central chez les vertébrés et il a été montré que les planaires possèdent un système nerveux très développé, avec présence de neurones sérotoninergiques, gabaergiques, catécholaminergiques et peptidergiques comparables à ceux des vertébrés (Nishimura *et al.* 2008; Agata 2008; Cebrià 2008). De ce fait, nous nous sommes interrogés sur l'impact des psychotropes sur le système nerveux (SN) de la planaire en ciblant plusieurs fonctions comme la locomotion ou encore la régénération. Le tableau 19 dresse un bilan de l'ensemble des résultats décrits en I.a., I.b., I.c. et I.d..

Tableau 19 : Bilan des perturbations de la mobilité de la planaire par les psychotropes				
	Conc. environnementale	10 µg/L	100 µg/L	Allure des courbes
Oxazépam	↗ à long terme (15-18 jours)	↗ à long terme (15-18 jours)	↗ à long terme (15-18 jours)	Plus stables que le témoin
Carbamazépine	↗ à long terme (12-18 jours)	↗ à long terme (à 15 jours)	↗ à long terme (15-18 jours)	Plus stables que le témoin
Cyamémazine	↗ à long terme (à 18 jours)	↘ à court terme (à 9 jours)	↘ à court terme (3-12 jours)	Plus stables que le témoin
Sertraline	↗ à long terme (15-18 jours)	↗ à long terme (à 15 jours)	↘ à court et à long terme (3-18 jours)	Plus stables que le témoin

Comme le rappelle le tableau 19 ci-dessus, nous avons observé en général que la mobilité des planaires témoins varie beaucoup au cours du temps par rapport à celle des planaires exposées aux 4 molécules. Les psychotropes auraient donc un effet modulateur permettant une constance dans le déplacement des planaires. Ces molécules ayant pour la plupart un effet narcoleptique diminuant la perception des stimuli environnementaux chez l'Homme, ce même effet chez la planaire pourrait expliquer cette constance dans le déplacement par rapport au témoin.

i. Oxazépam

Les effets de l'OXZ sur la mobilité de *S. polychroa* sont visibles uniquement après 15 jours d'exposition. On observe de manière générale, une augmentation de la distance parcourue par les planaires exposées à long terme à l'OXZ. L'OXZ étant un agoniste du récepteur gabaergique (GABA_A), lui-même impliqué dans l'inhibition de la conduction nerveuse gabaergique, on aurait pu s'attendre à une inhibition de la mobilité comme l'a montré l'étude de Raffa *et al.* (2007). En effet, cette étude a évalué l'accoutumance à plusieurs benzodiazépines (midazolam, clorazépatate et zolpidem) des planaires *Dugesia dorotocephala* (*D. dorotocephala*) au travers de la mesure de la locomotion par rapport à des organismes témoins exposés à de l'eau. Il ressort de cette étude une inhibition de la mobilité chez les planaires exposées à ces trois benzodiazépines à des concentrations allant d'environ 3 µg/L à 3 mg/L (Raffa *et al.* 2007). Cependant, au cours de cette étude, la distance parcourue par les planaires a été mesurée après seulement une heure d'exposition aux solutions

médicamenteuses. Au cours de notre étude, nous avons mesuré l'effet de l'OXZ durant 18 jours. L'absence d'effet que nous observons à court terme pourrait être due à une accoutumance dès les trois premiers jours d'exposition, masquant ainsi tout effet sur le déplacement qui aurait pu être observé au cours des premières 24 h d'exposition. L'induction de la mobilité après 15 jours d'exposition à l'OXZ est en accord avec les travaux de Brodin *et al.* (2013) qui montrent une augmentation de l'activité de la perche (*Perca fluviatilis*) exposée 7 jours à faible (1,8 µg/L) et forte concentration (910 µg/L) d'OXZ. En ce sens, les travaux de Chiffre *et al.* (2016) montrent eux aussi une augmentation de la distance parcourue par des larves de poissons médaka (*O. latipes*) exposées 72 h à 10 et 100 µg/L. Bien que l'OXZ soit une molécule agoniste du GABA sur les neurones GABAergiques, qui chez l'Homme diminue la conduction nerveuse GABAergique dans le but d'inhiber les crises d'épilepsie et donc la contraction musculaire involontaire, nous observons une augmentation de la mobilité de la planaire y étant exposée à long terme. Ainsi, on peut supposer que l'OXZ agit certainement sur d'autres cibles amenant à une induction de la mobilité.

ii. Carbamazépine

L'impact de la CBZ sur la mobilité de la planaire est similaire à celui que l'on a observé après une exposition à l'oxazépam. On observe une induction de la mobilité après une exposition à long terme pour les trois concentrations testées. La CBZ est une molécule utilisée pour traiter les troubles épileptiques et les changements d'humeur chez l'homme en limitant la dépolarisation des membranes neuronales par sa fixation sur les canaux sodium voltage-dépendant (Gierbolini *et al.* 2016). Les travaux de Ramakrishnan et DeSaer (2011) ont montré que la CBZ a la même activité antiépileptique chez la planaire (*Dugesia tigrina*) exposée à la nicotine (induisant une activité épileptique de la planaire) que chez les vertébrés. Cependant, l'impact de la CBZ sur le déplacement de la planaire n'avait jamais été caractérisé. On s'appuiera donc sur des études menées chez les vertébrés. Les travaux de Nassef *et al.* (2010 a,b) ont montré une inhibition de la mobilité des larves de poissons médaka (*O. latipes*) exposées 9 jours à 6,15 mg/L de CBZ et des larves de poisson médaka exposées in-ovo à 12 ng de CBZ pendant le développement, donc un effet inverse à celui observé dans notre étude. Il est connu que les molécules médicamenteuses telles que la CBZ montrent souvent un effet biphasique en fonction de la concentration utilisée pour l'exposition. De ce fait, les résultats que nous obtenons pourraient être dus à un effet biphasique par rapport aux travaux de Nassef *et al.* (2010 a, b) qui utilisent des concentrations en CBZ 200 à 2000 fois plus fortes que celles utilisées lors de notre étude. Cependant, les modes de locomotion des planaires et des vertébrés sont différents. La planaire mobilise, pour ses déplacements sur le substrat ou entre deux eaux, l'activité ciliaire des cellules présentes sur l'épiderme ventral, ainsi que ses masses musculaires. Il est donc possible que malgré un effet inhibiteur de la CBZ sur les cellules musculaires comme on

peut l'observer chez les vertébrés, un effet positif sur les cellules ciliaires puisse provoquer un effet stimulateur du déplacement observé aux trois concentrations.

iii. Cyamémazine

La CYZ impacte différemment la mobilité de *S. polychroa* en fonction de la concentration utilisée. La concentration environnementale de CYZ induit une augmentation de la mobilité de la planaire après 18 jours d'exposition, alors que les concentrations 10 et 100 µg/L inhibent le déplacement de la planaire, respectivement après 9 jours et de 3 à 12 jours d'exposition. La CYZ fait partie des molécules de la classe des phénothiazines ayant une fonction antagoniste de la Dopamine sur le système nerveux dopaminergique. Comme l'a montré l'étude d'Algéri *et al.* 1982, la Dopamine joue un rôle sur la mobilité de la planaire *Dugesia gonocephala*. En effet, une exposition des planaires à la L-dopamine ou à un agoniste (apomorphine, cocaïne, métamphétamine ...) de la L-dopamine entraîne une hyperkinésie des organismes et augmente les taux de L-dopamine (3 fois plus). A l'inverse, une exposition des planaires à un antagoniste de la L-dopamine (respérine ou halopéridol) inhibe la mobilité des planaires et diminue les taux de L-dopamine dans les organismes tel que l'a montré l'étude d'Algéri *et al.* (1983) sur *D. gonocephala*. Ces travaux montrent donc que le fonctionnement de la Dopamine et du système nerveux dopaminergique chez la planaire ressemble fortement à celui du système nerveux des vertébrés supérieurs. Au cours de notre étude, nous avons montré que la CYZ à 10 et 100 µg/L inhibe la mobilité, ainsi on pourrait supposer que la CYZ inhibe la production de Dopamine. Les résultats des travaux d'Algéri *et al.*, (1983) montrent qu'une exposition de la planaire *D. gonocephala* pendant 12 h à 8 mg/L de resperine ou 24 h à 1 mg/L d'halopéridol inhibe fortement la mobilité et diminue significativement les taux de dopamine dans les organismes. Ces résultats sont en accord avec l'observation des effets des deux plus fortes concentrations testées sur la planaire *S. polychroa* au cours de notre étude. D'autres travaux vont également dans le sens de nos résultats. L'étude de Raffa *et al.* (2001) a montré que le sulpiride, un antagoniste des récepteurs D2 de la dopamine de la famille des benzamides, inhibe le déplacement de la planaire pour une concentration allant 0,024 à 2,4 µg/L. L'étude de Chiffre *et al.* (2016) a montré que la CYZ inhibe le déplacement des larves de poissons médaka (*O. latipes*) à fortes concentrations (1220 µg/L) et augmente le déplacement des larves de poissons médaka exposées à faibles concentrations de CYZ (1,22 et 12,2 µg/L), ce qui va dans le sens de nos observations. Cette induction de l'activité observée pour les planaires exposées à 0,01 µg/L suggère une adaptation des organismes à cette concentration suffisamment faible pour permettre cette adaptation. La présence de résultats biphasiques est souvent observée suite à une exposition aux médicaments impactant plusieurs récepteurs (Irons *et al.* 2013) tels que la CYZ et ses métabolites qui possèdent de multiples activités

telles qu'anti-dopaminergique, antihistaminique ou encore anti-sérotoninergique (Hameg *et al.* 2003; Benyamina *et al.* 2008).

iv. Sertraline

Les effets de la sertraline sur la mobilité de la planaire sont variables en fonction des concentrations étudiées. En effet, on observe une induction significative de la mobilité après 15 et 18 jours d'exposition à la concentration environnementale (0,001 µg/L). La sertraline à la concentration environnementale et à 10 µg/L augmente significativement la mobilité chez la planaire au 15^e jour d'exposition. Ceci est en accord avec les résultats de Bossus *et al.* (2014). En effet, cette étude montre qu'à de faibles concentrations de sertraline (0,001 et 1 µg/L), l'activité du gammaré *Echinogammarus marinus* est stimulée après 1 h et 1 jour d'exposition. L'étude de Xie *et al.* (2015), a également montré une induction de la nage du poisson *Carassius auratus* après 7 jours d'exposition à une concentration proche de 10 µg/L (21,3 µg/L) de sertraline, pour laquelle nous avons observé une augmentation de la mobilité (Bossus *et al.* 2014; Xie *et al.* 2015). Contrairement aux deux plus faibles concentrations testées, la sertraline à 100 µg/L inhibe à court et à long terme la mobilité de la planaire *S. polychroa*. En accord avec nos résultats, les travaux de Chiffre *et al.* (2016) tout comme les travaux de Weinberger et Klapper (2014), ont montré une inhibition de la locomotion de larves de poissons médaka et du poisson *Pimephales promelas* exposés à 100 µg/L. Cependant, contrairement à notre étude, Chiffre *et al.* (2016) montrent aussi une inhibition de la mobilité des larves de poissons médaka exposées à 10 µg/L. Ainsi, ces résultats suggèrent que la sertraline à 10 µg/L induit des réponses spécifiques du taxon étudié. En effet, une même molécule peut avoir des effets différents en fonction de la concentration et une même concentration peut avoir des effets décalés dans le temps pour deux organismes différents. Probablement dû à une bioaccumulation spécifique de chaque organisme, les effets observés après une même exposition pour deux organismes différents peuvent apparaître en décalé dans le temps.

II. Les psychotropes impactent-ils la fécondité de la planaire *S. polychroa* ?

Cette deuxième partie décrit l'impact des 4 psychotropes sur la reproduction de la planaire *S. polychroa* pendant 30 jours d'exposition. Les données présentées par la suite représentent les effectifs cumulés des cocons pondus au cours des 30 jours d'exposition et ce pour chaque psychotrope. Les résultats sont comparés au nombre de cocons pondus par des planaires exposées 30 jours à de l'eau AFNOR (les témoins).

a. Étude des perturbations de la reproduction de la planaire *S. polychroa* exposée à l'oxazépam (OXZ)

La figure 65 présente l'impact de l'oxazépam sur la reproduction de la planaire. On constate que l'oxazépam à 100 µg/L inhibe significativement à court et à long terme le nombre de cocons pondus, tandis qu'une exposition aux deux plus faibles concentrations provoque une inhibition significative de la reproduction uniquement à court terme (jusqu'à 6 jours). Cependant, lorsque l'on compare les vitesses de ponte moyennes par jour entre le 15e et le 24e jour d'exposition, on observe une augmentation de la vitesse de ponte moyenne (1,8 cocons par jour) par les planaires exposées aux deux plus faibles concentrations comparée à la vitesse de ponte moyenne des témoins (0,6 cocon par jour). Ces résultats suggèrent que l'oxazépam à faible concentration (0,815 et 10 µg/L) ralentit la ponte pendant les 15 premiers jours d'exposition, mais ne semble pas perturber le nombre de cocons obtenus après 30 jours d'exposition.

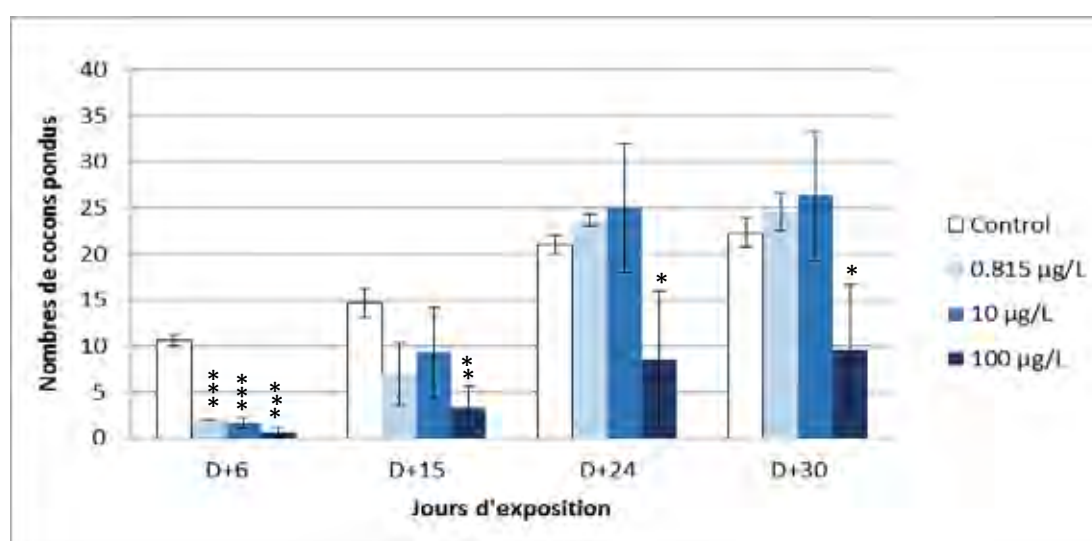


Figure 65 : Représentation graphique de l'impact de l'oxazépam sur la reproduction de la planaire *S. polychroa*. (Moyenne ± ET) (ANOVA puis test de Student, p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

b. Étude des perturbations de la reproduction de la planaire *S. polychroa* exposée à la carbamazépine (CBZ)

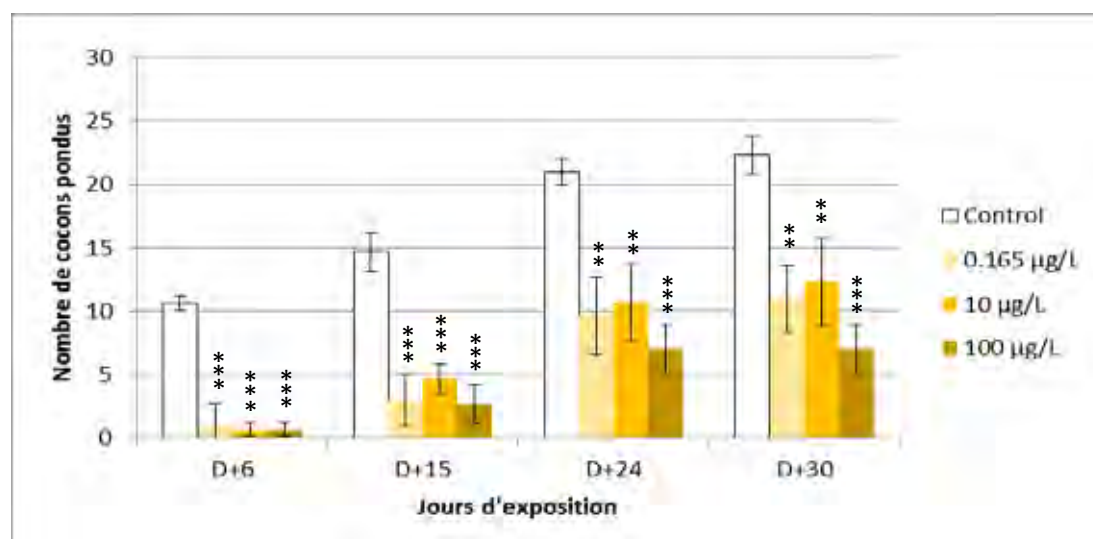


Figure 66 : Représentation graphique de l'impact de la carbamazépine sur la reproduction de la planaire *S. polychroa*. (Moyenne ± ET) (ANOVA puis test de Student, p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

Les résultats de l'impact de la carbamazépine sur la reproduction de la planaire sont représentés sur la figure 66. On observe une inhibition significative de la reproduction pour toutes les concentrations de carbamazépine testées à court et à long terme. Après 30 jours d'exposition, on constate une inhibition moyenne de 42 à 55 % de la ponte de cocons par rapport à celle des témoins. Ces résultats suggèrent que la carbamazépine impacte significativement la reproduction de la planaire *S. polychroa* en réduisant le nombre de cocons pondus.

c. Étude des perturbations de la reproduction de la planaire *S. polychroa* exposée à la cyamémazine (CYZ)

La figure 67 représente l'impact de la cyamémazine sur la reproduction de la planaire. On observe que la plus faible concentration testée (0,01 µg/L) stimule significativement à court et à long terme la ponte de cocons par la planaire *S. polychroa*. Cependant, contrairement à la plus faible concentration, une exposition de *S. polychroa* à 10 et 100 µg/L de cyamémazine inhibe significativement à court et à long terme la ponte de cocons. Ces résultats montrent que la cyamémazine a des effets inverses à faibles et à fortes concentrations sur la reproduction de la planaire.

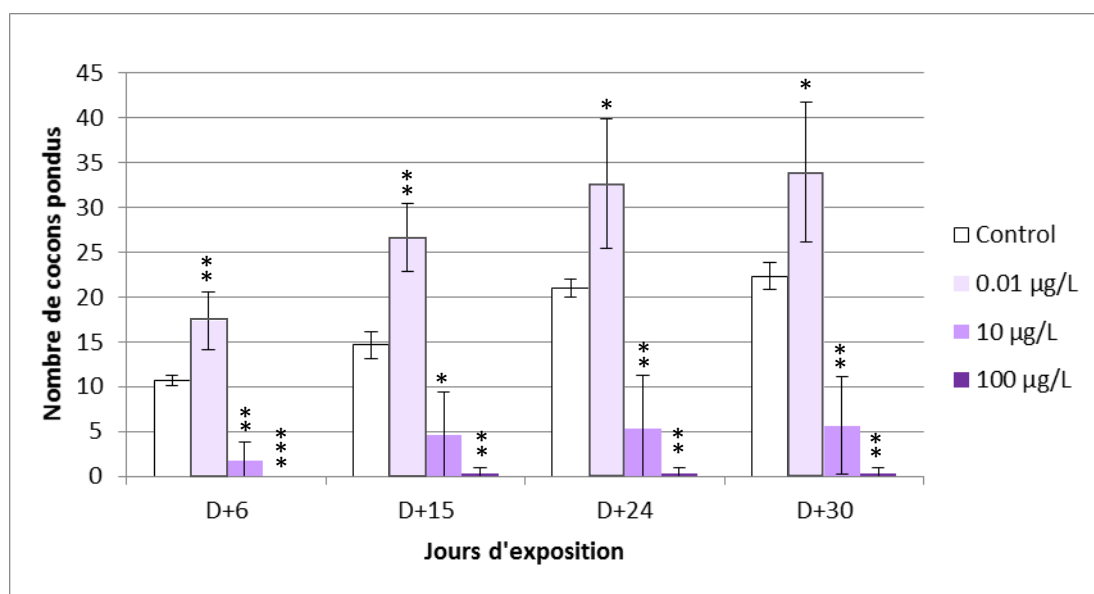


Figure 67 : Représentation graphique de l'impact de la cyamémazine sur la reproduction de la planaire *S. polychroa*. (Moyenne $\pm$ ET) (ANOVA puis test de Student, p-value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

d. Étude des perturbations de la reproduction de la planaire *S. polychroa* exposée à la sertraline (SRT)

L'impact de la sertraline sur la reproduction de la planaire est représenté par la figure 68. On observe que l'exposition à long terme (plus de 24 jours) à la plus faible concentration de sertraline testée stimule significativement la reproduction de la planaire, notamment en augmentant d'environ

28% le nombre de cocons pondus. L'exposition de *S. polychroa* à 100 µg/L de sertraline inhibe significativement le nombre de cocons pondus durant les 30 jours d'exposition, tandis que l'exposition à 10 µg/L n'entraîne pas d'effet significatif sur la reproduction.

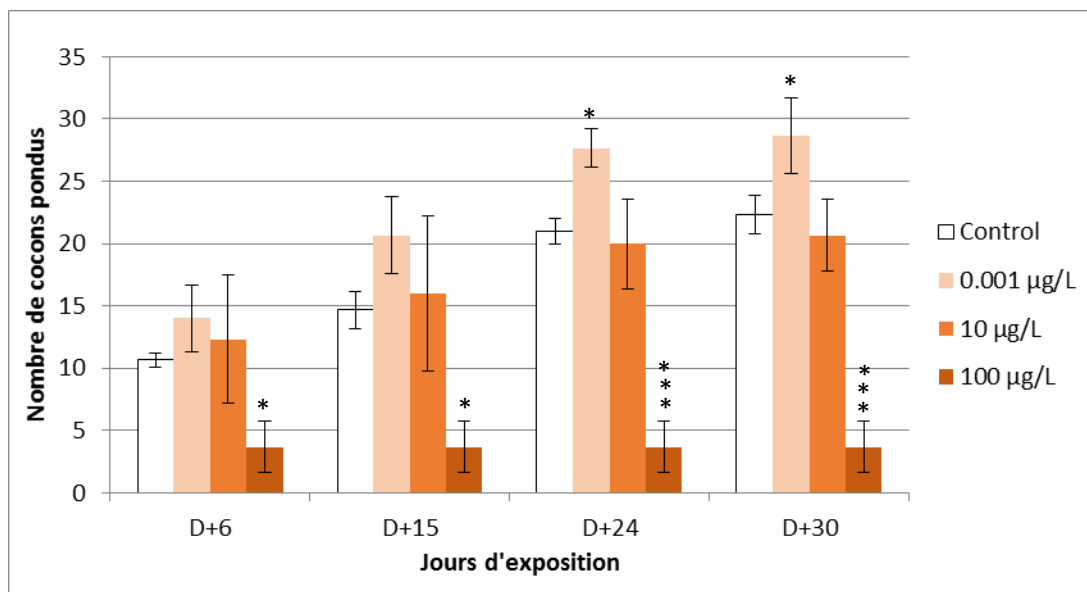


Figure 68 : Représentation graphique de l'impact de la sertraline sur la reproduction de la planaire *S. polychroa*. (Moyenne $\pm$ ET) (ANOVA puis test de Student, p -value : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05 ; • < 0.1)

e. Bilan et discussion des perturbations de la fécondité de la planaire par une exposition aux psychotropes

A ce jour, quelques études ont évalué la perturbation de la reproduction par les psychotropes chez les invertébrés aquatiques (Nentwig 2007; Minguez *et al.* 2014; Heye *et al.* 2016), c'est pourquoi nous avons étudié l'impact de 4 psychotropes sur la reproduction de la planaire *S. polychroa*. Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Bilan des perturbations de la reproduction de la planaire par les psychotropes			
	Conc. environnementale	10 µg/L	100 µg/L
Oxazépam	↘ à court terme	↘ à court terme	↘
Carbamazépine	↘	↘	↘
Cyamémazine	↗	↘	↘
Sertraline	↗ à long terme	—	↘

La plus forte concentration testée pour chaque psychotrope inhibe significativement la reproduction à court et à long terme. La concentration intermédiaire (10 µg/L) de psychotropes a un effet majoritairement inhibiteur de la reproduction chez la planaire. A la concentration

environnementale, les psychotropes peuvent être groupés en deux catégories, les psychotropes inhibiteurs de la reproduction avec l'oxazépam et la carbamazépine, et les psychotropes inducteurs avec la cyamémazine et la sertraline.

i. Oxazépam

Les effets de l'OXZ sur la reproduction de la planaire sont très dépendants des concentrations testées. Les deux plus faibles concentrations ont un effet inhibiteur de la reproduction à court terme seulement (à 6 jours), puis le taux de ponte (cocons/jours) dans ces deux conditions augmente jusqu'à dépasser celui des témoins. Cependant, ce retard de ponte n'a pas d'effet sur le nombre total de cocons pondus et suggère une acclimatation des planaires à ces concentrations d'OXZ. Comme nous l'avons montré sur la planaire *S. polychroa*, Lorenzi *et al.* (2016) ont montré une inhibition du nombre d'œufs pondus par jour par le poisson *Pimephales promelas* exposé 21 jours à 1 et 10 µg/L de diazépam, une molécule de la même famille que l'OXZ. Une étude de la perturbation du développement des follicules chez la souris exposée de 5 à 15 mg/L de diazépam a montré que ce médicament augmente le nombre de follicules aberrants et diminue fortement leur croissance (Van Wemmel *et al.* 2005). Ces effets observés chez la souris pourraient être transposables à la plus forte concentration en OXZ testée sur la planaire. Une exposition des planaires à l'OXZ est donc susceptible d'inhiber leur reproduction et ainsi diminuer la fitness des populations.

ii. Carbamazépine

Les trois concentrations de CBZ testées inhibent significativement la reproduction de la planaire *S. polychroa*. Comme l'a montré notre étude, Lamichhane *et al.* (2013) ont montré une inhibition du nombre de pontes de *C. dubia* exposées à environ 200 µg/L de CBZ. Les travaux d'Heye *et al.* (2016) ont quant à eux montré une inhibition du nombre de pontes par femelle de *Chironomus riparius* exposée à 0,68, 1,7, 3,7 et 9,9 mg de CBZ par kg. Seule l'étude de Rivetti *et al.* (2016) a montré une augmentation du nombre de juvéniles de *D. magna* exposés à 1 et 10 µg/L de CBZ. En accord avec les travaux de Heye *et al.* (2016) et de Lamichhane *et al.* (2013), l'étude de Galus *et al.* (2014) sur vertébrés (le poisson-zèbre), a montré qu'une exposition de 6 semaines à 10 µg/L de CBZ inhibe significativement la fécondité. Nos résultats, en accord avec ces trois études suggèrent qu'une exposition à court et à long terme des planaires à la CBZ dans l'environnement pourrait fortement diminuer les populations de *S. polychroa* et donc perturber les écosystèmes aquatiques. Chez l'Homme, il a été montré qu'un traitement à la CBZ pouvait impacter les taux d'hormones sexuelles circulant, pouvant modifier le cycle reproducteur de l'Homme (Isojärvi *et al.* 1988). Ainsi, l'inhibition de la reproduction observée après une exposition à la CBZ pourrait être en partie due à une perturbation d'hormones homologues chez la planaire.

iii. Cyamémazine

Les résultats de notre étude montrent que la CYZ à la concentration environnementale provoque une augmentation de la ponte de cocons à court ou à long terme par la planaire *S. polychroa*. Les deux plus fortes concentrations de CYZ inhibent à court et à long terme la fécondité de la planaire. Aucune étude de l'impact des phénothiazines sur la reproduction des vertébrés ou des invertébrés n'est disponible dans la littérature, ce qui limite ainsi la discussion sur les effets observés dans notre étude. Notre étude montre que la CYZ à faible concentration pourrait stimuler la ponte chez la planaire. Cependant, les cocons pondus sont-ils autant fertiles que ceux des témoins ? Pour les plus fortes concentrations en CYZ, les impacts possibles sur la fitness des populations sont les mêmes que ceux que l'on peut supposer pour l'oxazépam et la carbamazépine. A faible concentration, la CYZ augmente le déplacement de la planaire, favorisant la rencontre entre les deux partenaires, afin de réaliser la reproduction sexuée qui pourrait ainsi expliquer l'augmentation de la reproduction. Cette molécule, consommée uniquement en Europe, est donc susceptible de fortement impacter les populations de planaires européennes.

iv. Sertraline

Les effets de la sertraline sur la reproduction de la planaire *S. polychroa* sont dépendants de la concentration étudiée. La concentration environnementale induit la ponte à long terme, alors que la plus forte concentration de SRT testée inhibe à court et à long terme la ponte de la planaire. Les études disponibles dans la littérature montrent des effets majoritairement inhibiteurs de la SRT et plus généralement des ISRS (dont fait partie la SRT) tels que la venlafaxine ou encore la fluoxétine sur la reproduction de *D. magna* (génération F1), *C. dubia*, sur *P. promelas* ou encore sur *Potamopyrgus antipodarum* à des concentrations variant entre 50 et 400 µg/L (Nentwig 2007; Lamichhane *et al.* 2013; Lamichhane *et al.* 2014; Weinberger and Klaper 2014). Cependant, les travaux de Minguez *et al.* (2014) ont aussi montré une induction de la reproduction de la génération F0 de *D. magna* par des solutions de 100 et 30 µg/L de SRT, mais aucune étude n'a montré d'effet dose dépendant. L'induction de la reproduction après une exposition de la planaire à faible concentration de SRT pourrait être due, comme pour la CYZ, à l'augmentation de la mobilité observée précédemment, augmentant le taux de rencontres des deux partenaires, essentielles à la reproduction sexuée de la planaire. Les effets inhibiteurs de la sertraline à forte concentration observés sur de multiples modèles biologiques peuvent être étendus, grâce à notre étude, à la planaire. La présence de cette molécule dans les eaux de surfaces est donc susceptible d'augmenter les effectifs des populations de planaires et donc l'écosystème en déséquilibrant le réseau trophique. Cependant, la sertraline n'est jamais présente seule dans l'environnement aquatique, d'autres molécules sont susceptibles d'avoir des effets potentialisateurs ou inhibiteurs des effets de la sertraline.

v. Bilan

A la concentration 100 µg/L, on constate donc une inhibition de la reproduction pour tous les médicaments. La planaire étant hermaphrodite, il serait intéressant de caractériser l'état sexué mâle, femelle ou asexué des planaires avant et après exposition à cette concentration pour chaque psychotrope afin d'observer un impact potentiel de ces molécules sur les tissus reproducteurs de ces organismes.

III. L'exposition de la planaire *S. polychroa* aux psychotropes impacte-t-elle la fertilité des cocons pondus ?

La fertilité des cocons de planaires définie par Weinzierl *et al.*, (1999) comme la sortie d'au moins un juvénile du cocon, a été déterminée à partir de cocons exposés aux psychotropes en comptant le nombre de cocons éclos au cours des 30 jours d'exposition et en dénombrant après éclosion le nombre de planaires juvéniles par cocon.

La figure 69 représente le taux d'éclosion (Figure 69 A) et le nombre de juvéniles par cocons (Figure 69 B) pondus par les planaires ayant été exposées à chaque psychotrope. On constate qu'aucun des psychotropes étudiés n'a d'effet sur la fertilité des cocons. Le taux moyen d'éclosion des cocons est d'environ 80% avec en moyenne 2 à 4 juvéniles par cocon. Ces résultats suggèrent que les psychotropes altèrent la reproduction des planaires (II.), mais n'influencent pas le taux d'éclosion des cocons, ni le nombre de juvéniles donc le nombre de zygotes internalisés par cocon. A notre connaissance, peu d'études ont caractérisé l'impact de molécules médicamenteuses sur la fécondité des planaires et sur la fertilité des cocons pondus. L'étude de Lamichhane *et al.* (2014) a montré une diminution du nombre de juvéniles par femelle de *C. dubia* exposées à 53,4 µg/L de diazépam (molécule de la famille des benzodiazépines). Cependant, les cocons pondus par les planaires *S. polychroa* sont pourvus d'une membrane très résistante et imperméable au passage de molécules susceptibles de perturber le développement des organismes (données non montrées). Les résultats de notre étude semblent donc indiquer que les psychotropes testés n'altèrent pas le nombre de juvéniles présents par cocon. Néanmoins, le rapport nombre de juvéniles/nombre d'individus est fortement perturbé puisque le nombre de cocons pondus est impacté suite à l'exposition aux médicaments (II.). L'étude de Weinzierl *et al.* (1999) a caractérisé la différence entre la fécondité et la fertilité de cocons issus d'une reproduction parthénogénétique et d'une reproduction sexuée de la planaire *S. polychroa*. Les résultats de cette étude ont mis en avant une production de cocons plus forte de 42 % par une reproduction parthénogénétique que par une reproduction sexuée. Cependant, la fertilité (nombre de cocons ayant éclos) des cocons pondus par la reproduction sexuée est plus forte (93%) que lors d'une reproduction parthénogénétique (73%), mais le nombre moyen de juvéniles par cocons est le même pour les deux modes de reproduction.

Au cours de notre étude, nous n'avons pas constaté de variation du nombre de juvéniles par cocon. Ainsi, l'influence du mode de reproduction sur les résultats obtenus peut être exclue. Les psychotropes n'affectent donc pas la fertilité des planaires. Il serait cependant intéressant d'étudier le comportement dont le déplacement et leur capacité à se reproduire au cours d'études transgénérationnelles.

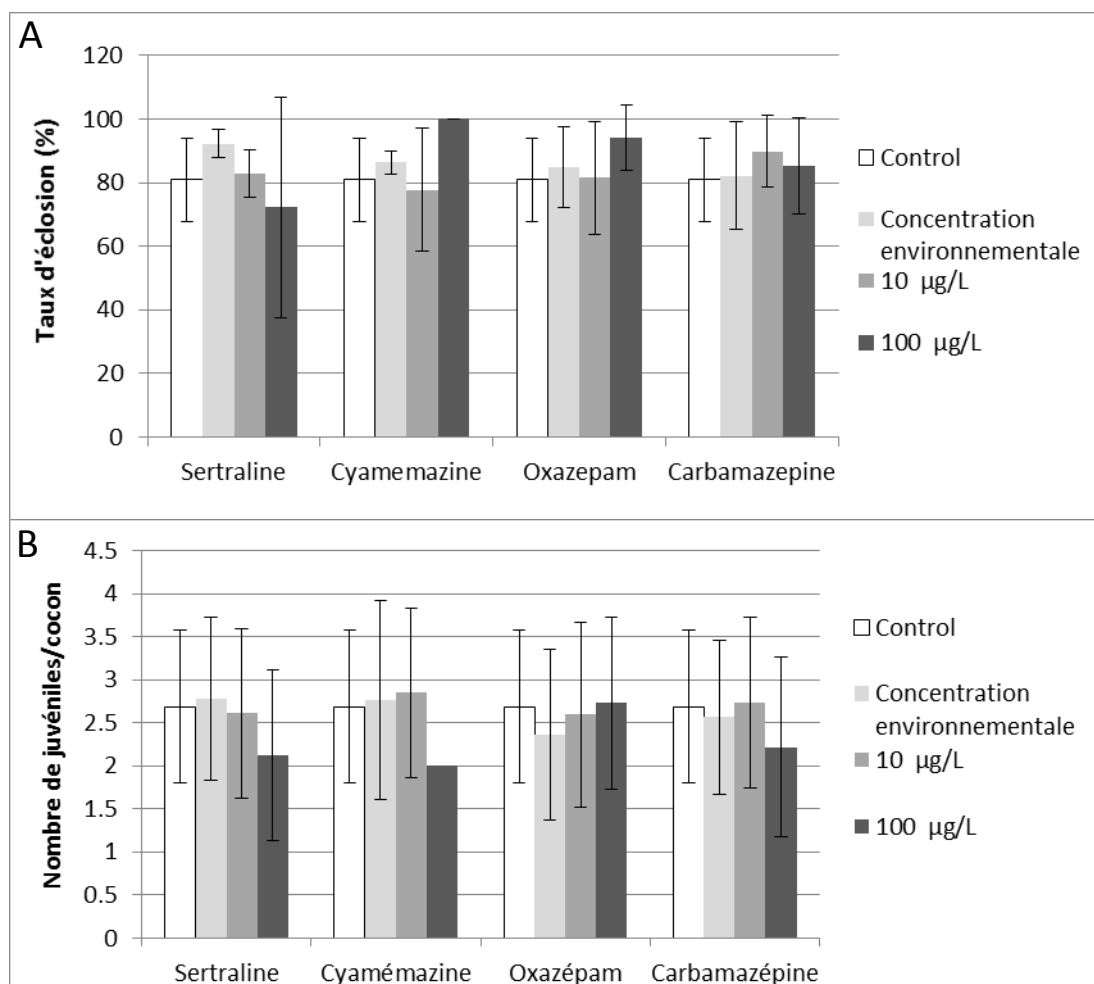


Figure 69 : Représentation graphique de la fertilité (A) et de la fécondité (B) des cocons pondus par des planaires exposées à chaque psychotrope.

IV. La régénération des planaires est-elle perturbée par une exposition aux psychotropes pendant la régénération ?

a. Étude des perturbations de la régénération de la planaire au cours d'une exposition aux psychotropes et après 21 jours d'exposition

De manière à pouvoir étudier l'impact des psychotropes sur la régénération de la partie céphalique de *S. polychroa*, nous avons défini 5 stades clés présentés sur la figure 70. La coupure a été réalisée au-dessous des auricules, au niveau des flèches blanches. Le stade 0 correspond à l'état de la planaire tout juste amputée. Le stade 1 survient un jour après l'amputation et correspond à la

présence d'une cicatrice préparant le début de la régénération. Le stade 2 correspond à la formation d'un blastème de néoblastes à l'extrémité de la coupure et survient 2 jours après l'amputation. Le stade 3 correspond à la régénération d'une tête non pigmentée avec présence d'ocelles. Ce stade apparaît 3 à 5 jours après l'amputation. Le stade 4 est le stade final où la tête est entièrement régénérée et pigmentée. Ce dernier stade apparaît environ 11 jours après amputation.

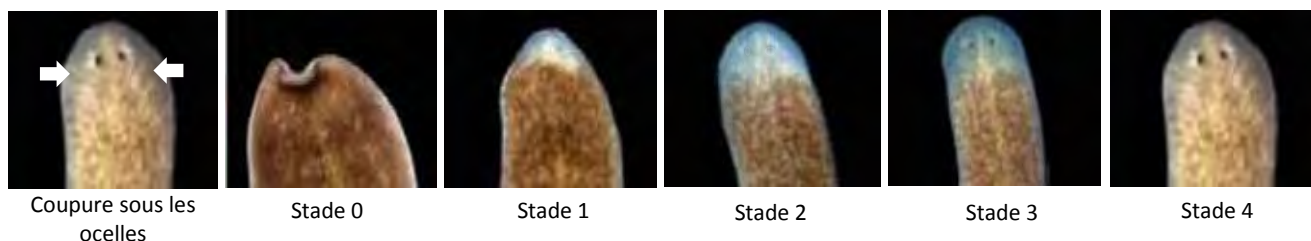


Figure 70 : Illustration des 5 stades de régénération de la partie céphalique. ⇨ Site de coupure de la partie céphalique ; Stade 0 : quelques minutes après coupure ; Stade 1 : Cicatrice 1 jour après amputation ; Stade 2 : Blastème blanc 2 jours après amputation ; Stade 3 : Apparition des ocelles 3 à 5 jours après amputation ; Stade 4 : Tête entièrement pigmentée 11 jours après amputation.

L'étude de la régénération de la planaire a été réalisée selon deux méthodes d'exposition. Nous avons évalué la toxicité des psychotropes premièrement par une exposition aiguë pendant laquelle les planaires ont été amputées puis exposées au cours de la régénération (Figure 71 A). Deuxièmement, la toxicité des psychotropes a été évaluée par une exposition chronique des planaires pendant 21 jours avant l'amputation et le suivi de la régénération de la partie céphalique sans exposition (Figure 71 B).

La régénération de la partie céphalique en présence de psychotropes ou après 21 jours d'exposition n'est pas significativement différente de la régénération des témoins exposés à de l'eau AFNOR. On constate cependant une plus forte mortalité lors du test de toxicité aiguë que lors du test de toxicité chronique. La régénération de la planaire est un processus très étudié (Rink 2013; Hagstrom *et al.* 2016; Deochand *et al.* 2016; Gehrke and Srivastava 2016; Roberts-Galbraith *et al.* 2016), mais pour autant, à notre connaissance aucune étude portant sur la perturbation de la régénération par les molécules médicamenteuses n'est disponible. Les résultats de notre étude suggèrent que la présence ou l'absence de molécules médicamenteuses ne perturbent pas la régénération *S. polychroa*. La régénération de la planaire étant une forme de défense envers une attaque de prédateur, mais aussi un mode de reproduction, il semblerait que les médicaments testés en conditions de laboratoire n'altèrent pas ce mécanisme de défense et de reproduction chez la planaire *S. polychroa*.

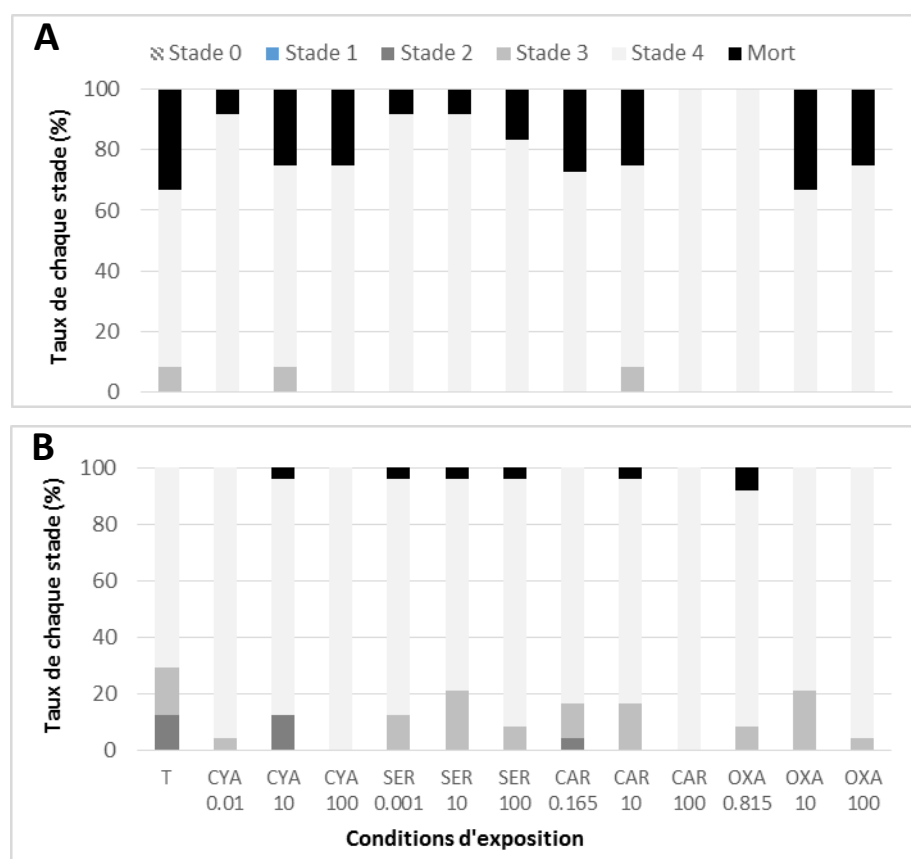


Figure 71 : Régénération de la partie céphalique de la planaire en présence de psychotropes. A : Toxicité aiguë (régénération pendant l'exposition), B : Toxicité chronique (régénération après 21 jours d'exposition).

V. Les psychotropes impactent-ils les fonctions digestives de la planaire *S. polychroa* ?

Au cours de l'étude de la reproduction des planaires en présence de psychotropes, nous avons observé que certains pools de planaires ne se nourrissaient plus au cours de l'exposition, notamment les planaires exposées à 10 et 100 $\mu\text{g/L}$ de cyamémazine. Le régime alimentaire de la planaire étant essentiellement carné, nous avons émis l'hypothèse que les médicaments modulent l'activité de la trypsine chez la planaire, catalysant l'hydrolyse des liaisons peptidiques nécessaire à la digestion des protéines.

Le dosage de l'activité de la trypsine chez les planaires exposées 30 jours à chaque médicament révèle une inhibition de cette activité suite à une exposition aux trois concentrations de carbamazépine (0,165, 10 et 100 $\mu\text{g/L}$) ainsi qu'à une solution d'oxazépam à 10 $\mu\text{g/L}$. On observe par ailleurs une induction significative de l'activité de la trypsine par une solution de cyamémazine à 10 et 100 $\mu\text{g/L}$. A notre connaissance, il n'existe pas d'étude dans la littérature ayant mesuré l'impact des médicaments sur l'activité trypsique d'un organisme aquatique. Comme elle a été décrite chez les crustacés, l'activité de la trypsine a deux rôles fondamentaux, premièrement de digérer les

protéines provenant de l'alimentation et deuxièmement d'activer les précurseurs des autres enzymes digestives (Stroud *et al.* 1977; Huber and Bode 1978). Comme on l'a dit précédemment, les planaires exposées à 10 et 100 $\mu\text{g/L}$ de cyaméazine ne s'alimentaient plus au cours de l'exposition. Comme l'a montré l'étude de Newmark et Alvaradro, (2002), l'animal privé de nourriture est capable de réduire sa taille afin de limiter ses dépenses énergétique. Ce phénomène est réalisé par protéolyse, nécessitant des enzymes protéolytiques telles que la Trypsine et la Chymotrypsine pour la dégradation des tissus. On peut donc supposer que l'augmentation de l'activité trypsique soit en lien avec l'augmentation de la demande énergétique pour cette protéolyse chez les planaires qui ne s'alimentent plus. Une modification de l'activité trypsique chez la planaire pourrait donc directement impacter les réserves énergétiques nécessaires à la prise alimentaire, mais aussi à la reproduction comme observé Chapitre 4, II, c. Cependant, les effets observés sont-ils la cause d'une augmentation de l'activité protéique intervenant sur un plan post-traductionnel, ou bien la cause d'une régulation transcriptionnelle ?

On constate aussi une inhibition de l'activité trypsique pour les planaires exposées à la CBZ et à 10 $\mu\text{g/L}$ d'OXZ. Nous n'avons pas observé de diminution de la prise alimentaire des planaires exposées à l'OXZ et à la CBZ, ce qui suggère que cet effet inhibiteur impacte d'autres voies que celle de l'alimentation.



Figure 72 : Représentation graphique de l'activité de la trypsine chez *S. polychroa* après 30 jours d'exposition à chaque médicament (ANOVA et test de LDuncan avec un IC de 95%)

VI. Les psychotropes ont-ils un impact sur le transcriptome de *S. polychroa* ?

L'étude de la réponse du transcriptome de *S. polychroa* exposée à chaque médicament a été réalisée par une étude de l'expression en RT-qPCR d'un pool de 87 gènes ciblés à partir de leurs fonctions (reproduction, mobilité, digestion, système excréteur et système nerveux), afin de lier les

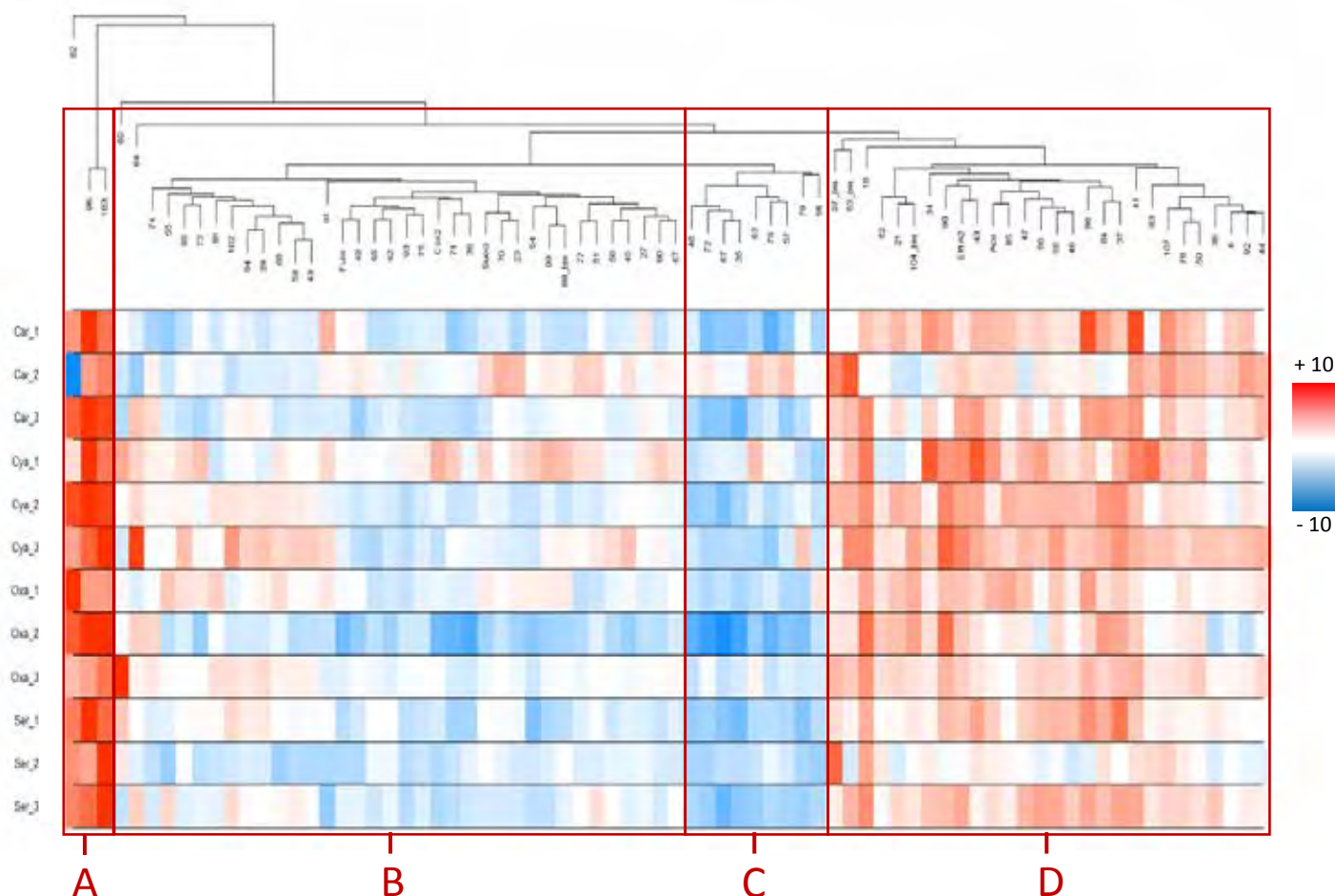


Figure 73 : Dendrogramme du profil d'expression des 87 gènes (représentés par le heatmap) en fonction des conditions d'exposition. Car_1 : carbamazépine à 0,815 µg/L ; Car_2 : carbamazépine à 10 µg/L ; Car_3 : carbamazépine à 100 µg/L ; Cya_1 : cyamémazine à 0,001 µg/L ; Cya_2 : cyamémazine à 10 µg/L ; Cya_3 : cyamémazine à 100 µg/L ; Oxa_1 : oxazépam à 0,815 µg/L ; Oxa_2 : oxazépam à 10 µg/L ; Oxa_3 : oxazépam à 100 µg/L ; Ser_1 : sertraline à 0,01 µg/L et Ser_2 : sertraline à 10 µg/L ; Ser_3 : sertraline à 100 µg/L.

La figure 73 représente le classement de chaque gène en fonction de son profil d'expression mesuré dans chaque condition d'exposition. Ainsi, les couleurs du heatmap varient du rouge au bleu représentant respectivement une surexpression et une inhibition. Quatre clusters de gènes apparaissent sur le dendrogramme dont les clusters A et D composés majoritairement de gènes surexprimés pour toutes les conditions testées. Le cluster C regroupe les gènes principalement inhibés dans toutes les conditions et le groupe B regroupe les gènes dont le profil d'expression varie en fonction des conditions testées.

a. Les impacts de l'oxazépam évalués sur 87 gènes par RT-qPCR

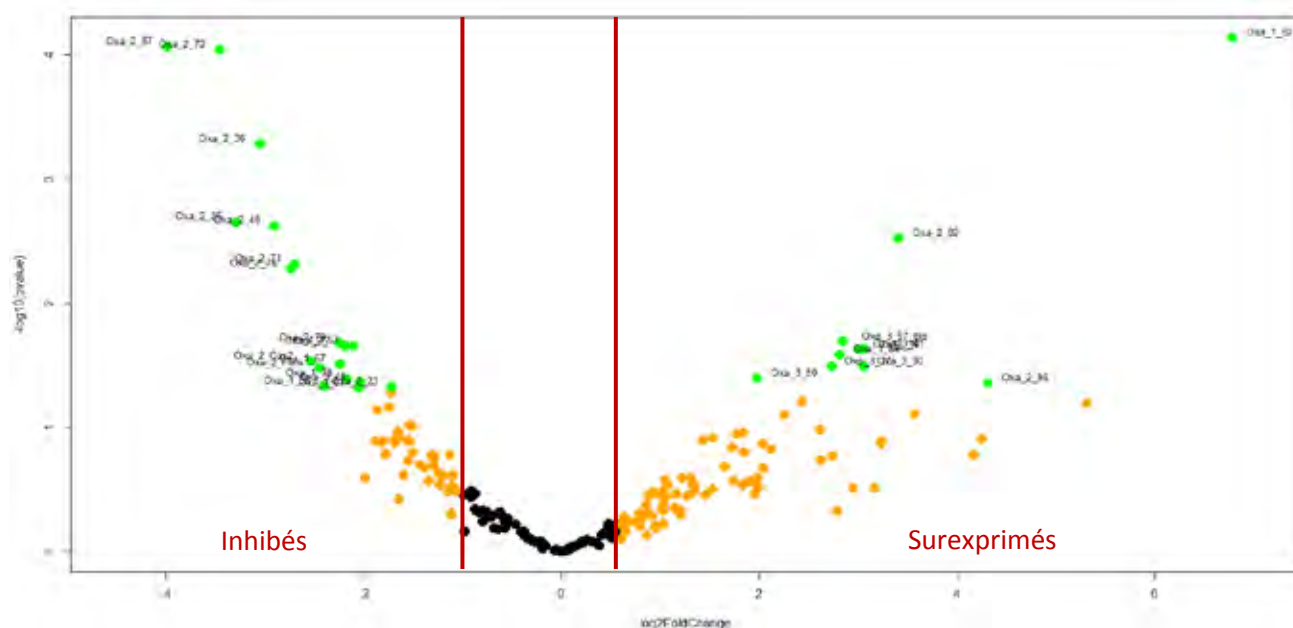


Figure 74 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à l'oxazépam. Oxa1_gène : oxazépam à 0,815 µg/L ; Oxa2_gène : oxazépam à 10 µg/L ; Oxa3_gène : oxazépam à 100 µg/L ; $\log_2(\text{FoldChange})$: Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$; $-\log_{10}(\text{pvalue})$: - log de base 10 de la pvalue obtenue lors du calcul des ratios d'expressions.

Les profils d'expression des 87 gènes chez la planaire exposée à l'OXZ sont représentés par la figure 74. On constate que l'OXZ a un effet majoritairement inhibiteur. On compte 4 gènes inhibés et 2 gènes surexprimés à la plus faible concentration testée. Pour la concentration intermédiaire, 12 gènes sont significativement inhibés et 3 gènes sont surexprimés, tandis que pour la plus forte concentration d'OXZ testée, 7 gènes sont significativement surexprimés et 2 sont inhibés.

Tableau 21 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à l'oxazépam

N° gène	N° accession	Fonction	Log ₂ (Fold Change)		
			Oxa_0,815	Oxa_10	Oxa_100
23	GBZN01010415.1	Carbonyle réductase [NADPH] 1		-1,72	
35	GBZN01008993.1	Cytochrome P450 3A29	-2,40	-3,29	
36	GBZN01001491.1	Myosine 2		-3,06	
37	GBZN01008248.1	Titine			2,73
41	GBZN01011862.1	Calponine			3,06
46	GBZN01014431.1	Récepteur à la Ryanodie (RyR)		-2,90	-2,04
50	GBZN01006623.1	Dynéine axonémale			1,98
57	GBZN01000192.1	Dynactine	-2,24	-2,11	
60	GBZN01009097.1	Cavéoline (CAV)			8,05
71	GBZN01008802.1	Murine-γ-box protéine (Msy4)		-2,69	
72	GBZN01012671.1	Pk-α	-2,19	-3,46	
76	GBZN01002831.1	Plastine		-2,74	
79	GBZN01007694.1	Tektine-3	-2,18	-2,25	
82	GBZN01000803.1	Vitellogénine	6,78	3,41	
85	GBZN01003456.1	Cytochrome P450 3A5	2,81		
87	GBZN01008988.1	Glutathion-S-transférase		-3,99	-2,05
90	GBZN01013546.1	POU class 3		3,01	3,05

Tableau 21 : suite					
96	GBZN01002787.1	Homéobox Six 1/2		4,32	5,06
97	GBZN01004159.1	Anhydrase Carbonique			2,84
Fum	GBZN01013562.1	Fumarase		-2,45	
Cox	GBZN01003284.1	Cytochrome oxydase C (sous unité IV)		-2,54	

Le tableau 21 rassemble l'ensemble des gènes significativement impactés par l'OXZ. Les trois principales fonctions impactées sont le déplacement avec 7 gènes (codant la Myosine 2, la Titine, la Calponine, le récepteur à la Ryanodine 2, la Dynéine axonemale, la Dynactine et la Cavéoline), la reproduction avec 5 gènes (codant la Murine- γ -box protéine, la Pk- α , la Plastine, la Tkn-3 et la Vitellogénine) et la détoxification avec 3 gènes (codant le Cytochrome P450 3A5, le Cytochrome P450 3A29 et la Glutathion-S-transférase) dont le profil d'expression est modifié.

Après une annotation des séquences par le logiciel KOBAS 2.0, nous avons représenté l'ensemble des processus biologiques modulés par l'oxazépam sur la figure 75 à l'aide du logiciel REVIGO.

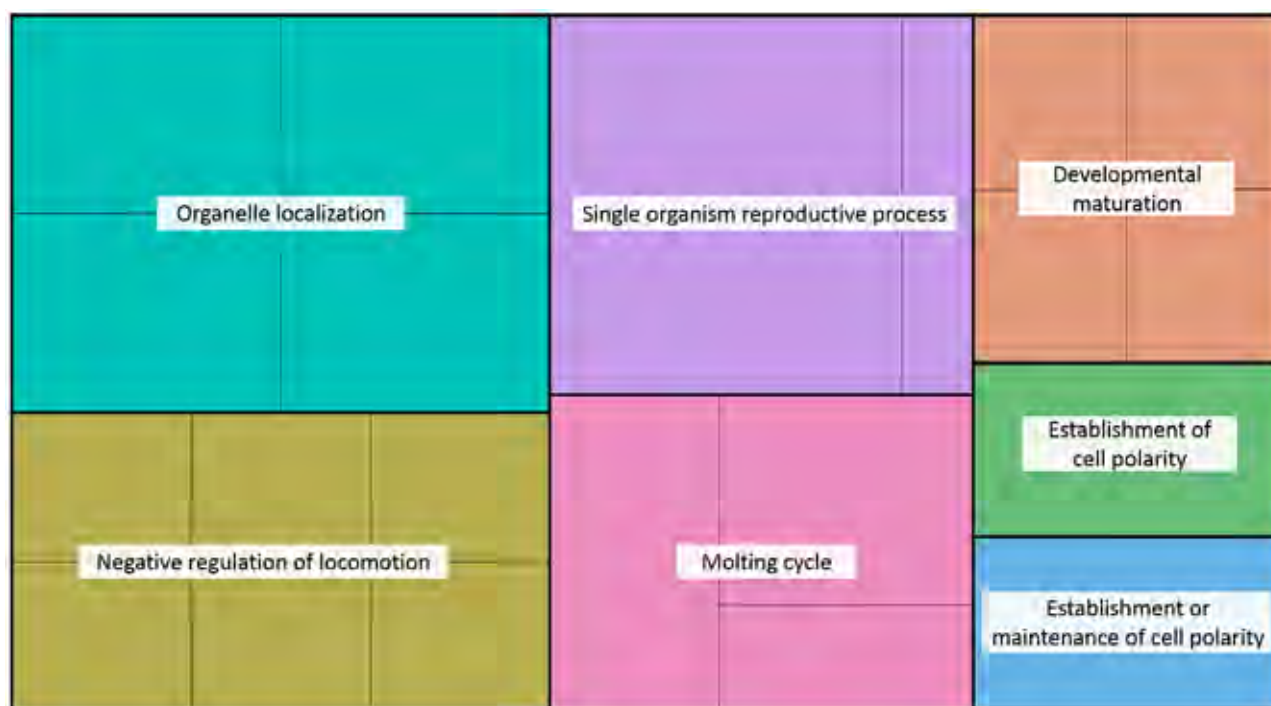


Figure 75 : Représentation graphique des GOterm des gènes impactés par l'oxazépam selon le logiciel REVIGO. La taille de chaque cellule est proportionnelle au nombre de gènes annotés avec le GOterm correspondant.

La classification des GOterm selon REVIGO permet de constater que les principales fonctions biologiques impactées par l'oxazépam sont le déplacement des organites cellulaires, la régulation de la mobilité, le processus reproducteur, le développement et la polarité cellulaire.

b. Les impacts de la carbamazépine évalués sur 87 gènes par RT-qPCR

La figure 76 représente la répartition des 87 gènes dans chacune des trois conditions d'exposition à la CBZ (0,165, 10 et 100 µg/L) en fonction de leur ratio d'expression et de la significativité.

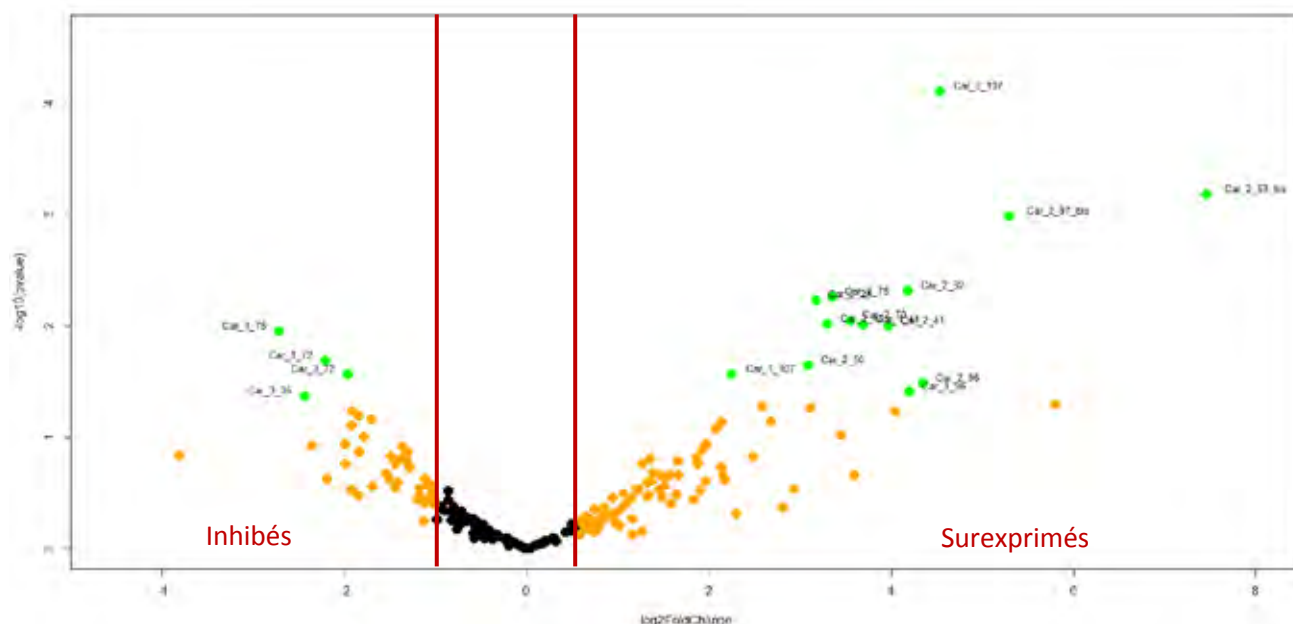


Figure 76 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la carbamazépine. Car1_gène : carbamazépine à 0,165 µg/L ; Car2_gène : carbamazépine à 10 µg/L ; Car3_gène : carbamazépine à 100 µg/L ; $\log_2(\text{FoldChange})$: Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$; $-\log_{10}(\text{pvalue})$: - log de base 10 de la pvalue obtenue lors du calcul des ratios d'expressions.

Les patterns d'expression des 87 gènes chez la planaire exposée à la CBZ sont représentés par la figure 76. Cette figure montre clairement un effet majoritairement inducteur de la CBZ sur l'expression des 87 gènes. On compte 2 gènes inhibés et 3 gènes surexprimés par la plus faible concentration testée. Pour la concentration intermédiaire, 11 gènes sont significativement surexprimés et 1 gène est inhibé. Pour la plus forte concentration de CBZ testée, seuls 2 gènes sont inhibés.

Tableau 22 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la carbamazépine					
N° gène	N° accession	Fonction	Log ₂ (Fold Change)		
			Car_0,165	Car_10	Car_100
23	GBZN01010415.1	Carbonyle réductase [NADPH] 1		3,16	
35	GBZN01008993.1	Cytochrome P450 3A29			-2,44
41	GBZN01011862.1	Calponine	3,69	3,96	
44	GBZN01002917.1	Dystrophine		3,30	
50	GBZN01006623.1	Dynéine Axonemale		3,08	
53	GBZN01012029.1	Osm 5 (assemblage des cils)		7,46	
70	GBZN01004689.1	Granuline (Grn)		3,55	
72	GBZN01012671.1	Pk-α	-2,21		-1,97
76	GBZN01002831.1	Plastine	-2,72		
78	GBZN01002284.1	Tektine-2		3,35	
82	GBZN01000803.1	Vitellogénine		-9,40	
92	GBZN01009041.1	Rootlétine		4,18	

Tableau 22 : suite

96	GBZN01002787.1	Homéobox Six 1/2	4,20	4,35	
97	GBZN01004159.1	Anhydrase carbonique		5,28	
107	GBZN01013867.1	Otoferline	2,25	4,53	

Les gènes significativement inhibés par la carbamazépine sont listés dans le tableau 22. Les trois fonctions biologiques majoritairement impactées par la carbamazépine sont le déplacement avec 5 gènes (codant la Calponine, la Dystrophine, la Dynéine Axonemale, la Rootlétine et la protéine Osm-5), la reproduction avec 5 gènes (codant la Granuline, la Pk- α , la Plastine, la Tkn-2 et la Vitellogénine) et la détoxification des organismes avec 1 gène codant le CYP3A29.

Après une annotation des séquences par le logiciel KOBAS 2.0, nous avons représenté l'ensemble des processus biologiques modulés par la carbamazépine sur la figure 77 à l'aide du logiciel REVIGO.

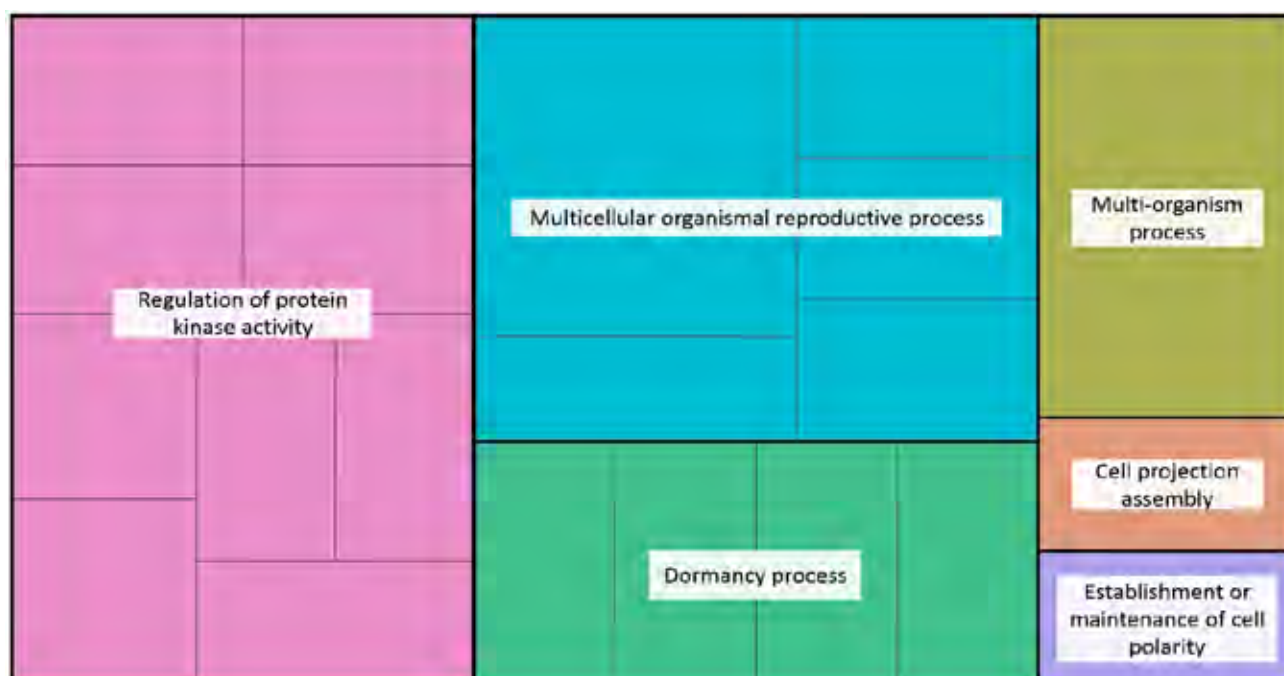


Figure 77 : Représentation graphique des GOterm des gènes impactés par la carbamazépine selon le logiciel REVIGO. La taille de chaque cellule est proportionnelle au nombre de gènes annotés avec le GOterm correspondant.

La classification des GOterm des gènes impactés par la carbamazépine selon REVIGO permet de prédire les principales fonctions biologiques impactées. On retrouve donc principalement la régulation des protéines kinases, le processus reproducteur et la différenciation et la polarité cellulaire.

c. Les impacts de la cyamémazine évalués sur 87 gènes par RT-qPCR

La figure 78 représente la répartition des 87 gènes dans chacune des trois conditions d'expositions à la CYZ (0,01, 10 et 100 $\mu\text{g/L}$) en fonction de leur ratio d'expression et de la significativité.

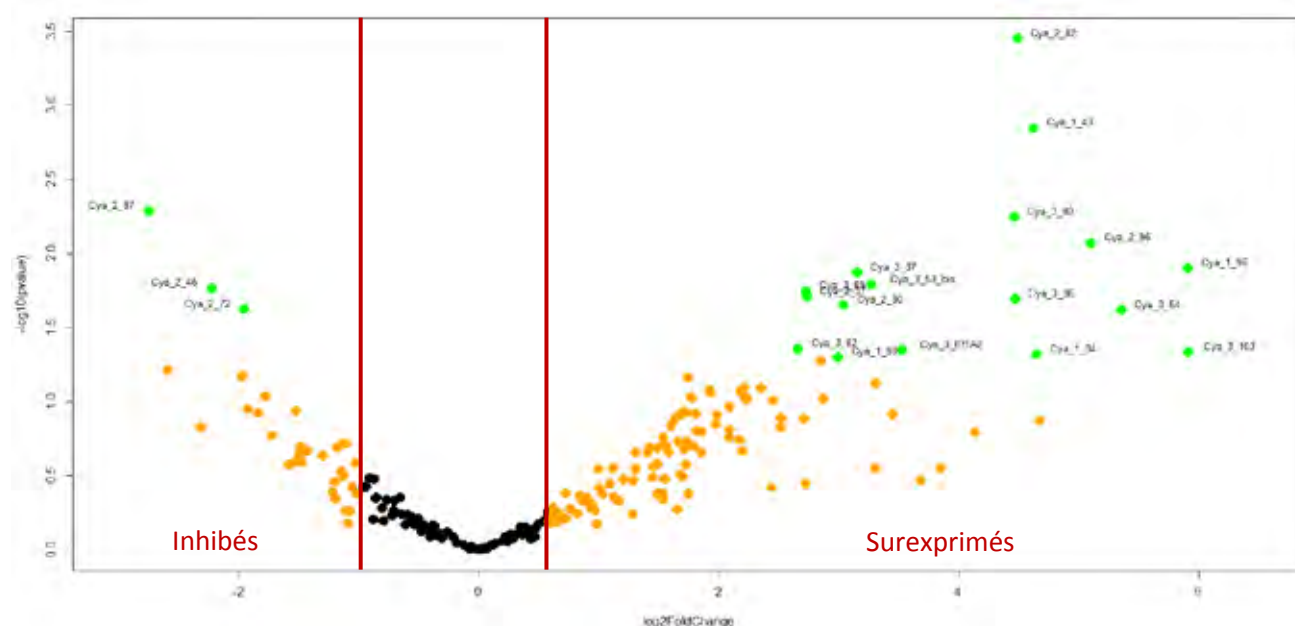


Figure 78 : Représentation graphique de type volcanoplot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la cyamémazine. Cya1_gène : cyamémazine à 0,01 µg/L ; Cya2_gène : cyamémazine à 10 µg/L ; Cya3_gène : cyamémazine à 100 µg/L ; $\log_2(\text{FoldChange})$: Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$; $-\log_{10}(\text{pvalue})$: $-\log$ de base 10 de la pvalue obtenue lors du calcul des ratios d'expressions.

La figure 78 représente les profils d'expression des 87 gènes significativement différentiellement exprimés lorsque la planaire *S. polychroa* est exposée à la CYZ. Grâce à cette représentation, on constate clairement que la CYZ a un effet majoritairement inducteur sur les 87 gènes. La plus faible concentration de CYZ testée a un effet uniquement inducteur comme pour la plus forte concentration testée avec respectivement 4 gènes et 8 gènes dont l'expression est induite par la CYZ. En revanche, que la concentration intermédiaire de CYZ a un effet inhibiteur sur l'expression de 3 gènes et un effet inducteur sur les 4 autres.

Tableau 23 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la cyamémazine

N° gène	N° accession	Fonction	Log ₂ (Fold Change)		
			Cya_0,01	Cya_10	Cya_100
34	GBZN01015075.1	Fibrillin-1-like	4,65		
37	GBZN01008248.1	Titine		2,74	3,15
43	GBZN01012149.1	Ankyrine	4,62		
46	GBZN01014431.1	Récepteur à la Ryanodine (RyR)		-2,23	
53	GBZN01012029.1	Osm 5 (assemblage des cils)			3,27
64	GBZN01002858.1	Trypsine			5,36
69	GBZN01005800.1	Préséniline			2,73
72	GBZN01012671.1	Pk-α		-1,95	
82	GBZN01000803.1	Vitellogénine		4,49	2,66
87	GBZN01008988.1	Glutathion-S-transférase		-2,75	
90	GBZN01013546.1	POU class 3	2,99	3,04	4,46
96	GBZN01002787.1	Homéobox Six 1/2	5,91	5,10	4,47
103	GBZN01001217.1	SCN4A (Canal Na ⁺)			5,91

Les patterns d'expression de chaque gène significativement impacté par une exposition de la planaire à la CYZ sont listés dans le tableau 23. Comme on a pu le constater pour les 2 médicaments précédents, les 3 principales fonctions biologiques impactées par la CYZ sont le déplacement, la reproduction et les processus de détoxification. La première fonction impactée par la CYZ est le déplacement qui est caractérisé par 5 gènes (codant la Fibrillin-1, la Titine, l'Ankyrine, le récepteur à la Ryanodine et la protéine Osm-5). La deuxième fonction impactée est la reproduction avec 3 gènes (codant la Préséniline, la protéine Pk- α et la Vitellogénine) et la dernière fonction est le système nerveux avec 4 gènes (codant une Ankyrine, le facteur de transcription POU de classe 3, la protéine Homéobox Six ½ et le canal Na⁺ (SCN4A)).

Après une annotation des séquences par le logiciel KOBAS 2.0, nous avons représenté l'ensemble des processus biologiques modulés par la cyamémazine sur la figure 79 à l'aide du logiciel REVIGO.

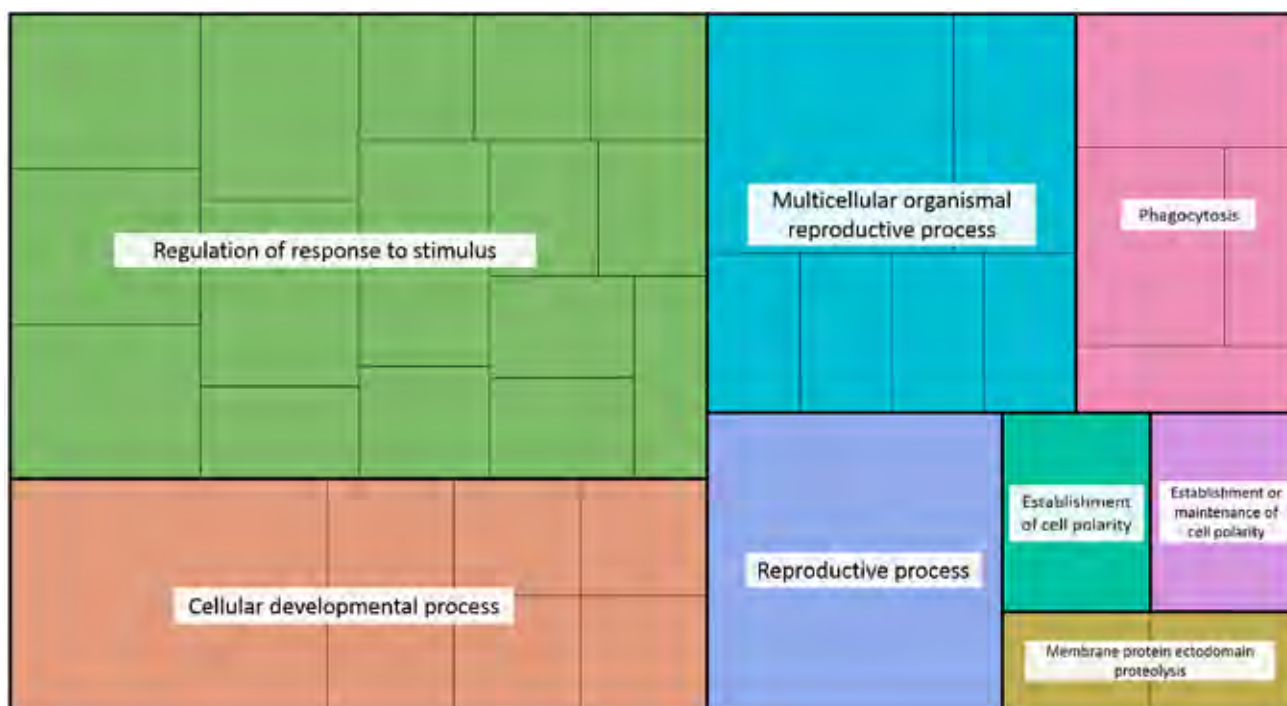


Figure 79 : Représentation graphique des GOterm des gènes impactés par la cyamémazine selon le logiciel REVIGO. La taille de chaque cellule est proportionnelle au nombre de gènes annotés avec le GOterm correspondant.

La classification des GOterm des gènes impactés par la cyamémazine selon REVIGO permet de prédire les principales fonctions biologiques impactées. On retrouve principalement la régulation en réponse à un stimulus, le développement cellulaire, la régulation des processus cellulaires, le processus reproducteur, la polarité cellulaire, la phagocytose et la protéolyse membranaire.

d. Les impacts de la sertraline évalués sur 87 gènes par RT-qPCR

La figure 80 représente la répartition des 87 gènes dans chacune des trois conditions d'expositions à la SRT (0,001, 10 et 100 µg/L) en fonction de leur ratio d'expression et de la significativité.

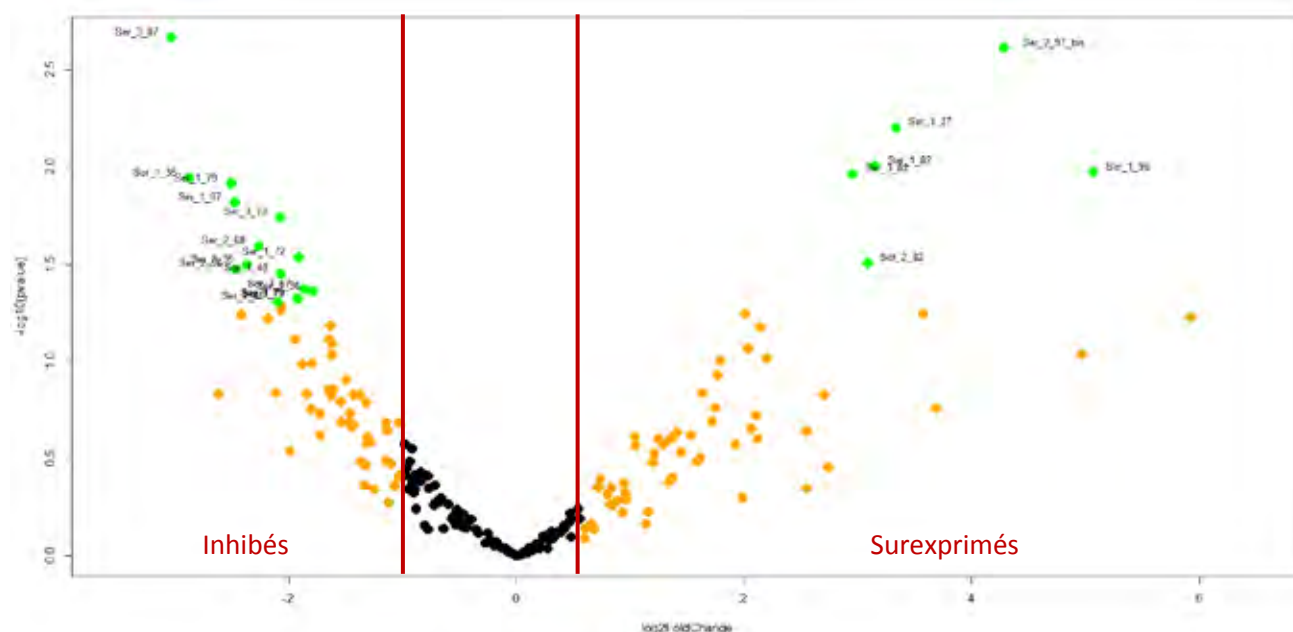


Figure 80 : Représentation graphique de type volcano plot du ratio d'expression de chaque gène pour les deux conditions d'expositions à la sertraline. Ser1_gène : sertraline à 0,001 µg/L ; Ser2_gène : sertraline à 10 µg/L ; Ser3_gène : sertraline à 100 µg/L ; $\log_2(\text{FoldChange})$: Log de base 2 du ratio d'expression obtenu par la méthode du $\Delta\Delta\text{CT}$; $-\log_{10}(\text{pvalue})$: $-\log$ de base 10 de la pvalue obtenue lors du calcul des ratios d'expressions.

Les profils d'expression des 87 gènes sont représentés sur la figure . On peut observer que l'expression des gènes est majoritairement inhibée par la SRT. On compte 7 gènes inhibés et seulement 3 gènes surexprimés par la plus faible concentration de SRT testée. Pour la concentration intermédiaire, 3 gènes sont inhibés et 2 sont surexprimés, tandis que pour la plus forte concentration de SRT testée, 5 gènes sont inhibés et seul 1 est surexprimé.

Tableau 24 : Fonctions des gènes impactés dans chaque condition d'exposition à la sertraline					
N° gène	N° accession	Fonction	Log ₂ (Fold Change)		
			Ser_0,001	Ser_10	Ser_100
35	GBZN01008993.1	Cytochrome P450 3A29	-2,87		-2,37
36	GBZN01001491.1	Myosine 2	-1,79		
37	GBZN01008248.1	Titine	3,33		
46	GBZN01014431.1	Récepteur à la Ryanodine (RyR)	-2,07	-2,10	
56	GBZN01003569.1	Cathepsine		-2,47	
57	GBZN01000192.1	Dynactine			-1,87
68	GBZN01013235.1	Notch		-2,26	
71	GBZN01008802.1	Murine-γ-box protéine (Msy4)	-1,92		
72	GBZN01012671.1	Pk-α	-1,91		-2,07
79	GBZN01007694.1	Tektine-3	-2,51		-1,93

Tableau 24 : suite

82	GBZN01000803.1	Vitellogénine	3,15	3,08	2,95
87	GBZN01008988.1	Glutathion-S-transférase	-2,47		-3,03
96	GBZN01002787.1	Homéobox Six 1/2	5,06		
97	GBZN01004159.1	Anhydrase carbonique		4,28	

Le tableau 24 ci-dessus regroupe l'ensemble des gènes significativement impactés par chacune des conditions d'exposition à la SRT testée. Comme pour les trois autres médicaments, les trois fonctions biologiques principalement impactées sont le déplacement, la reproduction et le système de détoxification de la planaire. L'impact sur le déplacement est caractérisé par 4 gènes (codant la Myosine 2, la Titine, le récepteur à la Ryanodine 2 et la Dynactine). L'impact sur les fonctions reproductrices est caractérisé par 5 gènes (codant la protéine Notch, Msy4, la protéine Pk- α , la Tektine-3 et la Vitellogénine). Enfin, l'impact de la SRT sur la détoxification est représenté par 2 gènes (codant le Cytochrome P450 3A29 et la Glutathion-S-transférase).

Après une annotation des séquences par le logiciel KOBAS 2.0, nous avons représenté l'ensemble des processus biologiques modulés par la sertraline sur la figure 81 à l'aide du logiciel REVIGO.

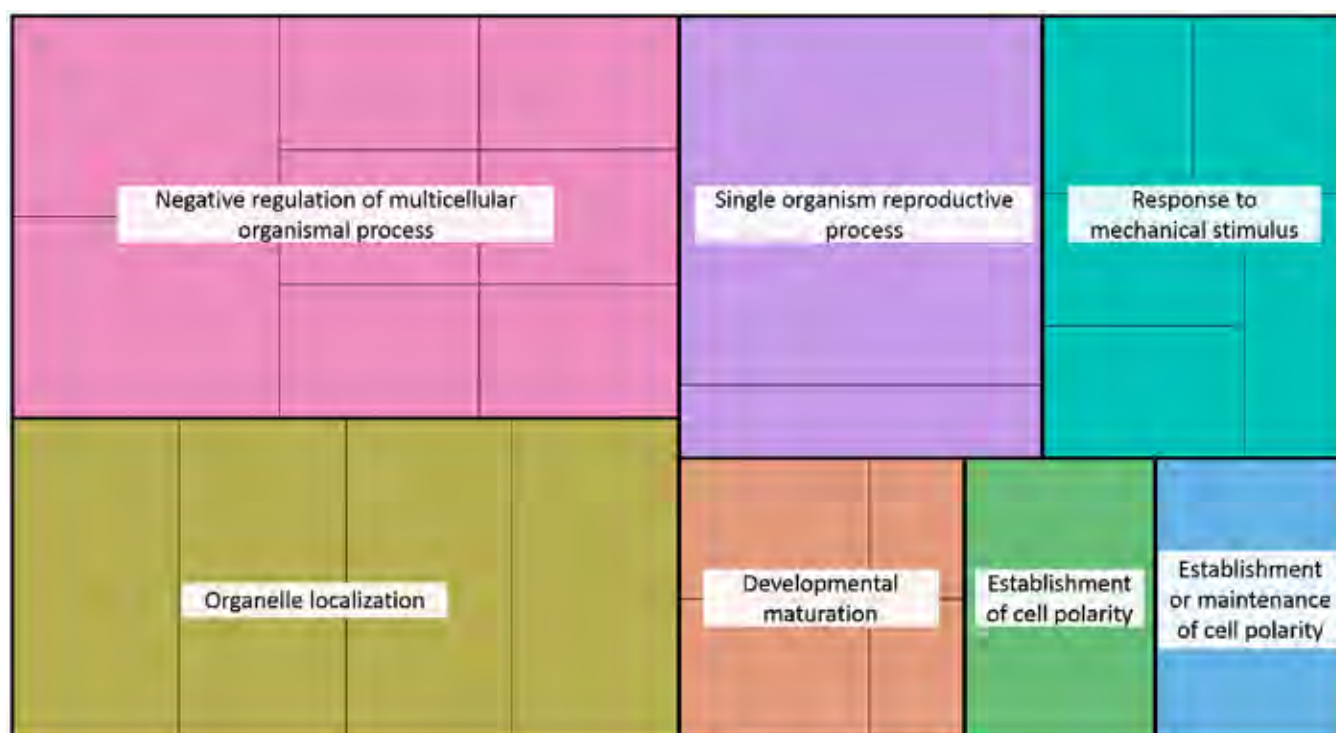


Figure 81 : Représentation graphique des GOterm des gènes impactés par la sertraline selon le logiciel REVIGO. La taille de chaque cellule est proportionnelle au nombre de gènes annotés avec le GOterm correspondant.

La classification des GOterm des gènes impactés par la sertraline selon REVIGO permet de prédire les principales fonctions biologiques impactées. On retrouve principalement le déplacement

des organites cellulaires, le processus reproducteur, la différenciation et la polarité cellulaire, la régulation des processus cellulaires et la réponse à un stimulus mécanique.

e. Bilan et discussion des perturbations transcriptomiques de la planaire exposée aux psychotropes

Les psychotropes sont des molécules qui agissent chez l'homme sur des récepteurs spécifiques afin de moduler la conduction nerveuse d'un neurone. D'après les analyses des expérimentations menées sur le déplacement, la reproduction et la digestion nous avons fait l'hypothèse que les 4 psychotropes étudiés modulent l'expression de gènes impliqués dans le déplacement, la digestion, le système nerveux, la détoxification et la reproduction de *S. polychroa* afin de lier les résultats de l'étude moléculaire aux 3 effets macroscopiques observés.

Les résultats de l'étude par qPCR des effets de l'OXZ chez la planaire montrent que la concentration intermédiaire (10 µg/L) est celle qui module le plus de gènes, 15 gènes parmi les 87 étudiés, contre 9 pour la plus forte concentration (100 µg/L) et 6 pour la concentration environnementale (0,815 µg/L). Les effets de la CBZ sur les 87 gènes sélectionnés chez la planaire révèlent que parmi les trois conditions étudiées, c'est la concentration intermédiaire (10 µg/L) qui module le plus de gènes, 12 parmi les 87 étudiés, contre 2 pour la plus forte concentration (100 µg/L) et 5 pour la concentration environnementale (0,165 µg/L). Pour la CYZ, une exposition à la plus forte concentration (100 µg/L) module l'expression de 8 gènes contre 7 avec la concentration intermédiaire et 4 avec la plus faible. L'étude par qPCR des effets de la SRT sur les gènes sélectionnés de la planaire révèle que la concentration environnementale (0,001 µg/L) module l'expression de 10 gènes parmi les 87 étudiés, contre 5 pour la concentration intermédiaire (10 µg/L) et 6 pour la plus forte concentration (100 µg/L). En termes de fonction, les psychotropes modulent l'expression de 13 gènes sur 27 testés impliqués dans le déplacement, soit près de 50 % des gènes testés. Pour les gènes impliqués dans la reproduction, 10 sont impactés sur 17 testés. Pour l'étude des fonctions digestives, 5 gènes sont impactés sur 9 étudiés. L'étude du système de détoxification a permis de montrer que seuls 4 gènes sont impactés par les psychotropes sur les 20 étudiés et enfin, l'expression de 5 gènes impliqués dans la mise en place et le fonctionnement du système nerveux, sur 7 étudiés est modulée par les psychotropes.

i. Mobilité de la planaire

Comme on a pu le discuter précédemment (partie I.e.) la planaire peut se déplacer *via* l'action de cils vibratiles présents majoritairement sur la face ventrale, ou par reptation sur le substrat *via* des contractions musculaires successives. Le tableau 25 synthétise des effets transcriptomiques lorsqu'il y a un effet macroscopique (à 18 jours) des psychotropes sur le déplacement de la planaire.

Tableau 25 : Synthèse des effets des psychotropes sur le déplacement de la planaire *S. polychroa*

Effet	Médicaments /Conc.	Effet transcriptomique inducteur (↗)	Effet transcriptomique inhibiteur (↘)
Induction (↗) de la mobilité	Env. : OXZ, CBZ, CYZ, SRT	Calponine, Ankyrine, Fibrilline-1, Titine	Dynactine, Réc. Ryanodine, Myosine
	10 µg/L : OXZ		Myosine, Dynactine, Réc. Ryanodine
	100 µg/L : OXZ, CBZ	Titine, Dynéine, Calponine, Cavéoline	Réc. Ryanodine
Inhibition (↘) de la mobilité	Env. : Pas d'effet		
	10 µg/L : Pas d'effet		
	100 µg/L : SRT		Dynactine

OXZ : Oxazépam, CBZ : Carbamazépine, CYZ : Cyamémazine, SRT : Sertraline, Réc. : Récepteur, Conc. : Concentration, Env : Environnementale

La principale fonction impactée par les psychotropes est le déplacement avec 9 gènes surexprimés et 4 inhibés. Les 9 gènes surexprimés codent une Titine, une Calponine, la Dystrophine, la Fibrilline-1, l'Ankyrine, la Cavéoline, la Dynéine axonémale, la protéine Osm-5 et la Rootlétine, alors que les 4 gènes inhibés codent une Myosine, un récepteur à la Ryanodine (RyR), la Cathepsine et une Dynactine.

- Mobilité ciliaire

Parmi les gènes impliqués dans la mobilité de la planaire, certains sont impliqués dans la structure et l'assemblage des cils vibratiles. Parmi ceux-là, on trouve les gènes codant la Dynéine axonémale (surexprimé par l'OXZ et la CBZ), la protéine Osm-5 (surexprimé par la CBZ et la CYZ) et la Rootlétine (surexprimé par la CBZ). En effet, la Dynéine axonémale est un composant essentiel des cils vibratiles (King 2016) (Figure 82).

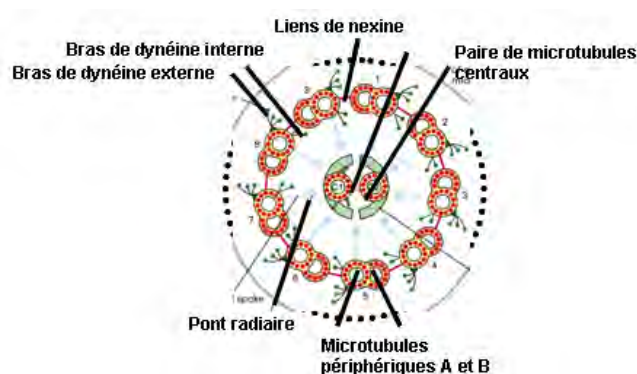


Figure 82 : Structure d'un axonème

Le mouvement de ces cils est obtenu par l'hydrolyse d'ATP qui va déplacer les têtes de Dynéine sur les microtubules et permettre une courbure du cil. La réaction est courte, puis le cil revient à son état initial. Ce sont ces cycles de courbure et relâchement rapides et successifs réalisés grâce à un complexe protéique comprenant la Dynéine qui vont permettre de créer un courant sous

la planaire et donc provoquer son déplacement (Rompolas *et al.* 2013; King and Patel-King 2016; King 2016). La protéine Osm-5 tout comme la Rootlétine ont été décrites comme intervenant dans la ciliogenèse et dans le transport intraflagellaire chez *C. elegans* (Perkins *et al.* 1986; Vowels and Thomas 1992; Haycraft *et al.* 2001; Ou *et al.* 2007; Chen *et al.* 2015). Au cours de notre étude, nous avons observé que les 4 psychotropes à la concentration environnementale ont un effet majoritairement inducteur de la mobilité de la planaire après 18 jours d'exposition. L'augmentation de la mobilité suppose une augmentation de l'activité ciliaire mobilisant de nombreuses protéines dont la Dynéine, la Rootlétine ou encore la protéine Osm-5 pour lesquelles on observe une surexpression des gènes. De ce fait, les résultats transcriptomiques corroborent les observations macroscopiques.

Parmi les gènes impactés par les psychotropes et impliqués dans la mobilité ciliaire, on trouve aussi deux gènes codant pour les Tektines 2 et 3. Ces gènes ont été décrits par l'étude de Chong *et al.* (2011) comme des protéines intervenant dans la synthèse des flagelles des spermatozoïdes chez la planaire *S. mediterranea*. Bien que l'on ne puisse pas exclure un rôle possible de ces protéines dans la mobilité de la planaire, nous discuterons essentiellement des effets que la modulation de ces gènes pourrait avoir sur la reproduction de la planaire.

- Mobilité par contraction musculaire

Le déplacement de la planaire mobilise aussi la contraction musculaire, notamment lors de la reptation sur le substrat. Pour cela, les cellules musculaires mobilisent de nombreuses protéines pour assurer la contraction. Parmi les gènes impactés par les psychotropes et impliqués dans la mobilité de la planaire, certains sont spécifiques de la contraction musculaire ou de son contrôle. On trouve donc les gènes codant la Titine (surexprimé par l'OXZ, la CYZ et la SRT), la Calponine (surexprimé par l'OXZ et la CBZ), la Cavéoline (surexprimé par l'OXZ), la Dystrophine (surexprimé par la CBZ), la Fibrilline-1 (surexprimé par la CYZ), l'Ankyrine (surexprimé par la CYZ), le récepteur à la Ryanodine (inhibé par l'OXZ, la CYZ, et la SRT), la Dynactine (inhibé par l'OXZ), la Myosine (inhibé par l'OXZ et la SRT) et la Cathepsine (inhibé par la SRT).

Les protéines de structure du sarcomère et des cellules musculaires :

Parmi les gènes impliqués dans l'activité musculaire, on trouve ceux codant la Titine et la Myosine, toutes deux impliquées dans la structure du sarcomère (Figure 83), mais aussi la Fibrilline-1, la Dystrophine et l'Ankyrine.

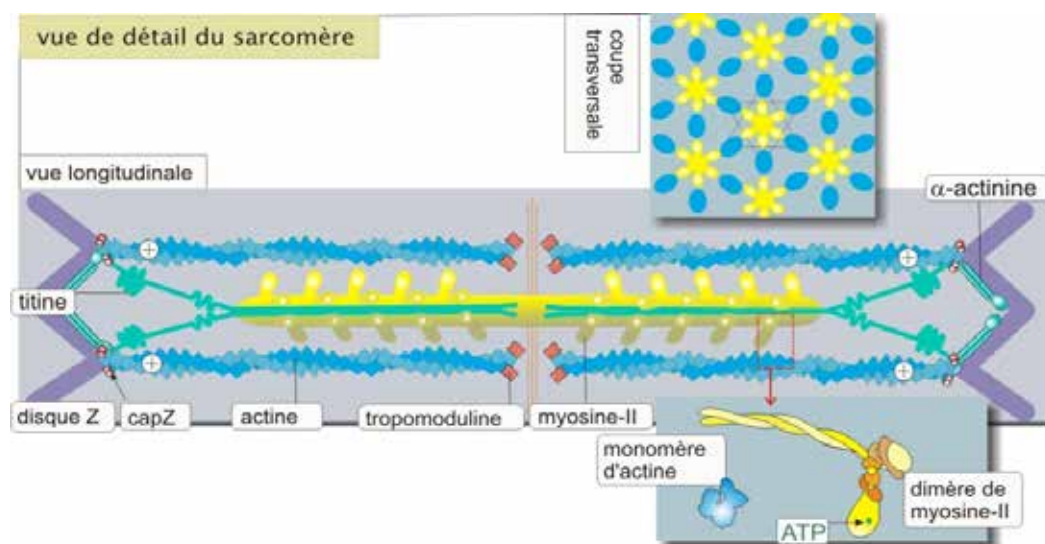


Figure 83 : Schéma du détail d'un sarcomère

Le Titine, comme nous avons pu le voir précédemment, est une protéine intervenant dans la structure et le maintien du sarcomère (Figure 83). Cette protéine lie le filament de Myosine sur le disque Z (ou strie Z). La surexpression du gène codant la Titine a été observée par Wagner *et al.*, (2017) chez des larves de poissons *O. latipes* exposées au fipronil (un insecticide de la famille des phénylpyrazoles pouvant impacter la conduction nerveuse GABAergique chez les invertébrés (Zhao *et al.* 2004)). La surexpression de la Titine ainsi que celle de deux autres gènes (*telethonine* et *myozenin-2*) impliqués dans le développement musculaire a été reliée à une anomalie de la région caudale entraînant une inhibition de la nage des poissons (Wagner *et al.* 2017). Dans notre étude, aucune déformation des planaires n'a pu être observée. On peut penser que la surexpression de la Titine pourrait être due à une augmentation de l'activité des cellules musculaires et non pas à une anomalie de développement du tissu musculaire, ce qui pourrait expliquer l'effet inducteur observé. De plus, on observe l'effet des psychotropes sur un invertébré aquatique possédant deux types de mobilité, contrairement aux poissons (vertébrés) qui utilisent uniquement la contraction musculaire pour se déplacer. La CYZ à la plus faible concentration induit aussi l'expression du gène codant la Fibrilline-1, une protéine retrouvée principalement dans les muscles comme composant de la matrice extracellulaire autour des cellules musculaires chez l'Homme (Figure 84), la souris, mais aussi chez les mollusques *Lottia gigantea* et l'annélide *Capitella teleta* (Sakai *et al.* 1986; Zhang *et al.* 1995; Corson *et al.* 2004; Piha-Gossack *et al.* 2012).

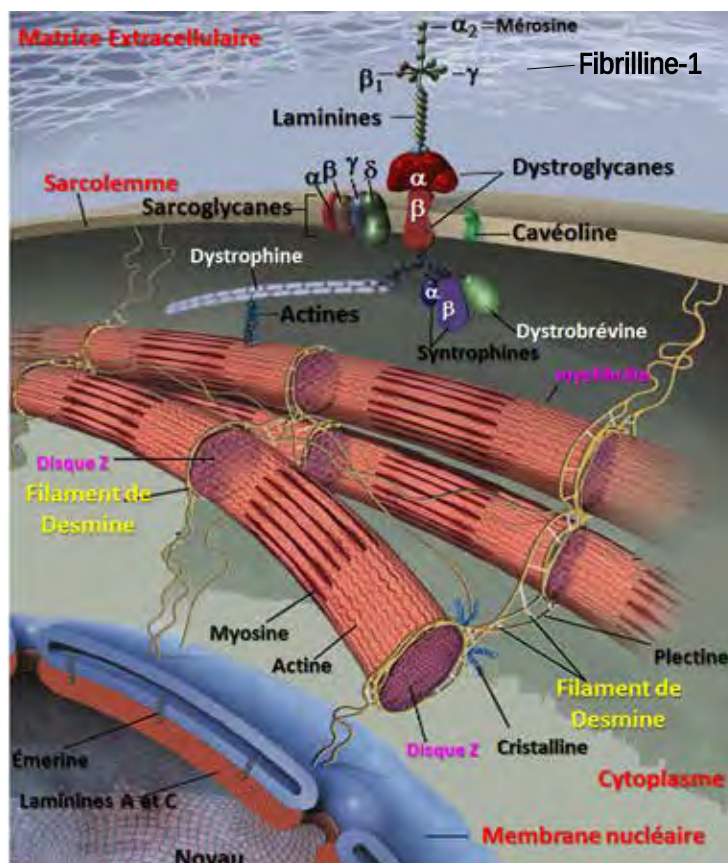


Figure 84 : Schéma détaillé de l'organisation d'une cellule musculaire

La mutation du gène codant la Fibrilline-1 chez l'homme conduit à l'apparition du Syndrome de Marfan consistant à des anomalies musculo-squelettiques, épidermiques, pulmonaires ou encore cardiaques (Judge and Dietz 2005; Ramirez *et al.* 2008) dont l'origine est une désorganisation des fibres de collagène et d'élastine, ou encore de la myopathie de Duchêne dont l'origine est une mutation du gène codant la Dystrophine. A la concentration environnementale, la CYZ induit aussi l'expression du gène codant une Ankyrine, une protéine impliquée majoritairement dans la structure du cytosquelette des cellules musculaires (Desmond *et al.* 2015; Toral-Ojeda *et al.* 2016), mais aussi dans l'adhésion de la MEC aux cellules musculaires et dans l'élongation des axones et la stabilité des synapses des jonctions neuromusculaires (Koch *et al.* 2008; Mazock *et al.* 2010). Ainsi, la surexpression des gènes codant l'Ankyrine et la Fibrilline-1 pourrait augmenter l'adhésion des cellules musculaires et donc participer à l'augmentation de l'activité musculaire de la planaire que nous avons observée à la suite d'une exposition à la concentration environnementale de CYZ. Le gène codant la Dystrophine est surexprimé par la CBZ. Cette protéine assure la stabilité membranaire des cellules musculaires en liant le cytosquelette d'Actine à un complexe protéique lié à la Laminine de la MEC (Figure 84) (Liem 2016). Aucune augmentation significative de la mobilité de la planaire n'est observée après un contact de 18 jours avec la CBZ à 10 µg/L (concentration à laquelle la Dystrophine est surexprimée). En revanche, un effet de cette condition est observé après 15 jours de traitement. L'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion des cellules musculaires à la MEC pourrait donc être un événement transcriptomique responsable de l'induction

de la mobilité. La Myosine quant à elle, est inhibée par l'OXZ et la SRT. Cette protéine est une unité du sarcomère, essentielle à la contraction musculaire, puisque ce sont les têtes de Myosine qui vont progresser par hydrolyse de l'ATP sur le filament d'Actine (Figure 84). Bien que nous observons une augmentation de l'activité de la planaire aux concentrations pour lesquelles le gène de la Myosine est inhibé, cet effet pourrait être le résultat de l'activation du gène codant la Calponine. En effet, l'étude d'Hossain *et al.*, (2016) a montré que la Calponine est un inhibiteur endogène du gène de la myosine chez la souris (Hossain *et al.* 2016). De ce fait, une surexpression de la Calponine comme observée dans notre étude pour l'oxazépam à 10 µg/L pourrait expliquer l'inhibition du gène de la Myosine.

La contraction musculaire et sa régulation :

La Calponine est surexprimée par l'OXZ et la CBZ. Cette protéine n'est pas essentielle à la contraction musculaire, mais joue un rôle dans la régulation et l'activation de la contraction musculaire comme cela a été décrit par la revue de Liu et Jin (2016) chez la souris. La Cavéoline, surexprimée par l'OXZ, est une protéine membranaire (Figure 84), elle est aussi impliquée dans la régulation de la contraction musculaire. La surexpression de ces gènes pourrait donc expliquer en partie l'augmentation de la mobilité des planaires exposées à l'OXZ et à la CBZ. D'autres part, on observe une inhibition de deux gènes codant d'autres régulateurs de la contraction musculaire, le récepteur à la Ryanodine qui est un récepteur impliqué dans la contraction musculaire, et la Dynactine, une protéine qui, couplée avec la Dynéine, intervient dans le transport de différents organites cellulaires comme les mitochondries, mais qui participe aussi à de nombreux processus cellulaires comme la division cellulaire. L'inhibition de la Dynactine pourrait avoir des effets sur le transport des mitochondries au sein des cellules musculaires et donc inhiber la contraction musculaire et le déplacement de la planaire. Bien que nous observons un effet inhibiteur sur la mobilité et sur l'expression de la Dynactine de la SRT à 100 µg/L, l'inhibition de l'expression de ce gène par l'OXZ à 10 et 100 µg/L n'est pas corrélable à un effet inhibiteur sur la mobilité. La Dynactine n'étant pas limitée au seul tissu musculaire, une hypothèse pourrait être que cette inhibition pourrait avoir lieu dans d'autres types cellulaires non impliqués dans la contraction. Le récepteur à la Ryanodine (RyR) est impliqué dans la sortie des ions calcium du réticulum sarcoplasmique (RS) des cellules musculaires dont la sortie est essentielle à l'activation de la contraction musculaire (Witherspoon and Meilleur 2016). Bien que l'inhibition de ce gène par l'OXZ à 10 et à 100 µg/L soit susceptible de provoquer une baisse de l'efficacité de la contraction musculaire et donc d'altérer le déplacement, nous n'observons pas d'inhibition de la mobilité de la planaire dans ces conditions. Ces résultats suggèrent soit qu'une autre protéine compense le rôle de ce récepteur, soit que l'activité ciliaire est suffisante pour compenser les effets de l'OXZ sur la contraction musculaire.

ii. Reproduction de la planaire

La deuxième fonction la plus impactée par les psychotropes est la reproduction avec 6 gènes inhibés codant les protéines Murine-γ-box protéine (Msy4) (OXZ et SRT), Pkα (OXZ, CBZ, CYZ et SRT), Plastine (OXZ et CBZ), Tektine-3 (OXZ), Vitéllogénine (Vtg) (CBZ) et Notch (SRT) et 4 gènes surexprimés codant la Vitéllogénine (OXZ, CYZ et SRT), la Tektine-2 (CBZ), la Granuline (CBZ) et la Présséniline (CYZ). Afin de faciliter la compréhension de la discussion, le tableau 26 fait une synthèse des effets transcriptomiques lorsqu'il y a un effet macroscopique (à 30 jours) des psychotropes sur la reproduction de la planaire.

Tableau 26 : Synthèse des effets des psychotropes sur la reproduction de la planaire <i>S. polychroa</i>			
Effet	Médicaments /Conc.	Effet transcriptomique inducteur (↗)	Effet transcriptomique inhibiteur (↘)
Induction (↗) de la fécondité	<u>Env.</u> : CYZ, SRT	Vitéllogénine	Msy4, Pkα, Tektine-3
	<u>10 µg/L</u> : Pas d'effet		
	<u>100 µg/L</u> : Pas d'effet		
Inhibition (↘) de la fécondité	<u>Env.</u> : CBZ		Pkα, Plastine, Tektine-3
	<u>10 µg/L</u> : CBZ, CYZ	Vitéllogénine, Tektine-2, Granuline	Vitéllogénine
	<u>100 µg/L</u> : OXZ, CBZ, CYZ, SRT	Présséniline, Vitéllogénine	Pkα, Tektine-3

OXZ : Oxazépam, CBZ : Carbamazépine, CYZ : Cyamémazine, SRT : Sertraline, Réc. : Récepteur, Conc. : Concentration, Env : Environnementale

- Gamétogenèse mâle

Parmi les 6 gènes inhibés, on trouve *msy4* qui est exprimé majoritairement dans les cellules germinales mâles des planaires *Dugesia etrusca* (Salveti *et al.* 2002) et *S. mediterranea* (Chong *et al.* 2011; Wang *et al.* 2014) ou encore de souris (Giorgini *et al.* 2002). Wang *et al.* (2010) ont montré que cette protéine intervient dans la différenciation des spermatides de planaires. Le gène *pka* codant la Pk-α est lui aussi inhibé chez les planaires exposées à tous les psychotropes. Comme l'a montré l'étude d'hybridation *in situ* en fluorescence de Chong *et al.* (2011), ce gène est majoritairement transcrit dans les spermatides. Les deux autres gènes inhibés sont *plastin* et *tektin 3* (Chong *et al.* 2011). Le gène *plastin* est transcrit à tous les stades de différenciation, du stade spermatogonie au stade spermatide de la planaire *S. mediterranea* et n'est pas exprimé au stade spermatozoïdes (Chong *et al.* 2011). Le gène *tektin-3* code pour une protéine de la famille des Tektines. Les protéines de cette famille sont très conservées et sont des composants majeurs des cils et des flagelles, nécessaire à la différenciation finale en spermatozoïdes (Amos 2008). Ainsi, les gènes *msy4*, *pka*, *plastin*, et *tektin-3*, impliqués à tous les stades de la gamétogenèse mâle sont inhibés. Cette inhibition est donc susceptible d'impacter la spermatogenèse. Le gène *plastine* est inhibé à la suite d'une exposition des planaires à une concentration environnementale de CBZ, où l'on observe une

inhibition de la fécondité. De par sa fonction décrite précédemment, l'inhibition de l'expression du gène *plastine* pourrait impacter la spermatogenèse, en lien avec les résultats macroscopiques observés à cette concentration. Cependant, bien que pour chaque inhibition du gène *pka* par la CBZ (Env. et 100 µg/L) et par la SRT (100 µg/L) on observe une inhibition de la fécondité, ce n'est pas le cas pour les autres gènes (cf. tableau 26). On pourrait donc supposer que l'inhibition de ces gènes par les psychotropes contribue à l'inhibition de la fécondité des planaires.

Le dernier gène inhibé code le facteur Notch, impliqué dans de nombreux processus cellulaires (prolifération, antiapoptotique, différenciation) (Diederich *et al.* 1994; Matsuno *et al.* 1995; Weinmaster 1997; Deftos *et al.* 1998; Schweisguth 2000; Baron 2012; Gavai *et al.* 2015) ainsi que dans la régulation de la gamétogenèse, comme l'ont montré de nombreuses études chez *C. elegans* (Austin and Kimble 1987; Lambie and Kimble 1991; Fitzgerald and Greenwald 1995; Berry *et al.* 1997; Henderson *et al.* 1997), mais aussi chez l'abeille (Duncan *et al.* 2016). L'expression du gène Notch n'est inhibée que par une exposition à la SRT, alors que cette même molécule à la concentration environnementale augmente la fécondité des planaires. Comme dans notre étude, Cray *et al.*, (2014) ont démontré que le gène Notch était inhibé suite à une exposition des cultures cellulaires (MC3T3-E1) de souris au citalopram (un ISRS). En accord avec nos résultats, il a été montré chez *C. elegans* que l'inhibition de la voie Notch active la gamétogenèse (Austin and Kimble 1987; Lambie and Kimble 1991). L'inhibition de la voie Notch pourrait donc stimuler la reproduction des planaires comme nous avons pu le montrer dans notre étude pour une exposition à la concentration environnementale de SRT et de CYZ, en activant la gamétogenèse. En lien avec ces observations, la CYZ à 100 µg/L induit l'expression du gène codant la Préséniline, une protéine intervenant dans la troisième coupure de la protéine Notch, comme on a pu le voir dans le Chapitre 3. Ces résultats sont en accord avec les fonctions de la voie Notch décrites dans la littérature (Fitzgerald and Greenwald 1995; Berry *et al.* 1997; Henderson *et al.* 1997). Lorsque cette voie est surexprimée chez *C. elegans*, la gamétogenèse est inhibée par induction de la division mitotique au dépend de la différenciation des gamètes (Fitzgerald and Greenwald 1995; Berry *et al.* 1997; Henderson *et al.* 1997). De plus, l'étude de Duncan *et al.* (2016) a montré que chez l'abeille, la voie de signalisation Notch était impliquée dans l'inhibition de l'activité ovarienne chez les abeilles ouvrières. En ce sens, Huang *et al.*, (2013) ont montré que l'induction du domaine Notch intracellulaire (NICD) résultant de la coupure par la Préséniline dans les cellules germinales de testicules de souris adultes perturbe la spermatogenèse et augmente l'activité préapoptotique des spermatogonies différenciées. De part l'observation d'une induction de l'expression du gène codant la Préséniline, on peut émettre l'hypothèse que l'inhibition de la reproduction chez la planaire exposée à de fortes concentrations de CYZ résulte de la perturbation de la gamétogenèse qui diminue ainsi l'efficacité reproductrice de la planaire comme on a pu l'observer lors de l'étude macroscopique de la reproduction en présence de cette molécule.

Il serait donc intéressant de réaliser des coupes de planaires exposées à la CYZ afin d'observer l'effet de cette molécule sur la différenciation des gamètes mâles ou femelles. Comme nous avons pu le discuter dans la partie mollusque, la voie Notch est aussi impactée chez le *Radix* exposé aux psychotropes. La voie Notch pourrait donc être une cible générale des psychotropes.

Parmi les 4 gènes surexprimés, on trouve aussi la Granuline qui est une protéine impliquée selon Chong *et al.*, (2011) dans la formation du spermiducte et la Tektine 2, de la famille des Tektines dont les fonctions ont été discutées dans le premier paragraphe. Les protéines de la famille des Tektines sont très conservées et sont des composants majeurs des cils et des flagelles responsables de la mobilité de la planaire et des spermatozoïdes respectivement.

- Gamétogenèse femelle

Le dernier gène impacté et impliqué dans la reproduction est le gène codant la Vtg, surexprimé suite à l'exposition à trois molécules (OXZ, CYZ, SRT) et inhibé à la suite d'une exposition à la CBZ. Le gène de la Vtg et la protéine qu'il code sont souvent utilisés comme biomarqueur en réponse à une perturbation oestrogénique dans l'environnement (Heppell *et al.* 1995; Denslow *et al.* 1999; Hahn *et al.* 2002; Sanders *et al.* 2005). L'étude de Gronen *et al.* (1999) a montré un lien entre l'exposition à l'octylphénol (un œstrogène retrouvé dans l'environnement) et l'induction de la Vtg chez les larves mâles de poissons médaka, la présence d'ovocytes dans les testicules et l'inhibition de la spermatogenèse inhibant la reproduction. L'étude de Jasinska *et al.*, (2015) a montré une induction de la quantité de Vtg chez la moule *Pyganodon grandis* exposée dans une rivière en aval du rejet d'une station d'épuration dans lequel il a été caractérisé la présence de médicaments, de produits de soins corporels et d'œstrogènes. De nombreuses autres études ont rapporté qu'une perturbation oestrogénique entraînait une augmentation de la Vtg chez les cirripèdes (Billinghurst *et al.* 2000) et chez les Penaeoidea (Yano and Hoshino 2006; Huang *et al.* 2006). L'induction de la Vtg chez les crustacés a aussi été observée par une exposition des organismes à des molécules non connues pour leur activité oestrogénique comme les métaux lourds tels que le cuivre ou le zinc (Martín-Díaz *et al.* 2005), ou encore des insecticides comme le fipronil (Volz and Chandler 2004). En effet, l'induction de l'expression du gène codant la Vtg pourrait donc aboutir à une variation de synthèse de la Vtg qui pourrait en cas de surexpression provoquer la différenciation des tissus reproducteurs uniquement en tissus ovariens chez les planaires *S. polychroa* exposées et pourrait entraîner un déséquilibre entre le rapport mâle et femelle au niveau de la gamétogenèse et ainsi entraîner une inhibition de la reproduction. Ceci pourrait être étudié en réalisant des coupes de planaires exposées aux trois psychotropes, ou bien en réalisant des études de localisation par RNAi dans les différents tissus (ovaires ou testicules) comme l'ont fait Chong *et al.* 2011, afin d'observer une possible unisexualisation des populations de planaires.

Comme on a pu le voir au travers de nombreuses études et de nos résultats, la présence de médicaments de types psychotrope dans l'environnement est susceptible d'inhiber la reproduction de nombreux organismes aquatiques (planaire, gastéropodes, poissons, ...) et ainsi modifier les populations des espèces y étant exposées.

iii. Digestion protéique et métabolisme énergétique

Trois psychotropes impactent aussi le système digestif de la planaire. 2 gènes impliqués dans les fonctions digestives sont inhibés, la Carbonyle réductase (CBZ) et la Trypsine (CYZ) et 4 gènes sont surexprimés, la Carbonyle réductase (OXZ), la Fumarase (OXZ), Anhydrase carbonique (OXZ, CBZ, SRT) et le Cytochrome c oxydase (OXZ). Afin de faciliter la discussion des résultats, le tableau 27 rappelle les effets transcriptomiques lorsqu'il y a un effet macroscopique des 4 psychotropes en fonction de leur concentration.

Tableau 27 : Synthèse des effets des psychotropes sur la digestion de la planaire <i>S. polychroa</i>			
Effet	Médicaments /Conc.	Effet transcriptomique inducteur (↗)	Effet transcriptomique inhibiteur (↘)
Induction (↗) de la digestion	Env. : Pas d'effet		
	10 µg/L : CYZ		
	100 µg/L : CYZ	Trypsine	
Inhibition (↘) de la digestion	Env. : CBZ		
	10 µg/L : CBZ, OXZ	Carbonyle réductase, Fumarase, Cyt. c ox., Anhydrase carbonique (OXZ)	
	100 µg/L : CBZ		

OXZ : Oxazépam, CBZ : Carbamazépine, CYZ : Cyamémazine, SRT : Sertraline, Réc. : Récepteur, Conc. : Concentration, Env : Environnementale

L'exposition des planaires à la CYZ a induit la surexpression du gène codant la Trypsine. Comme nous avons pu le constater lors des dosages, l'activité Trypsique était significativement induite chez les individus exposés aux deux plus fortes concentrations de CYZ. De plus, au cours de l'étude de la mobilité des planaires, nous avons pu observer que ces planaires consommaient moins de nourriture après 10 jours d'exposition qu'à J0. Après dosage de l'activité trypsique, nous avons aussi observé une induction de celle-ci à la suite d'une exposition à 10 et 100 µg/L de CYZ. Ces résultats de qPCR confirment donc un lien avec les résultats macroscopiques observés. Depuis environ 40 ans, les mécanismes de régulation, de synthèse et d'activation des protéines enzymatiques impliquées dans la digestion sont bien connus chez l'Homme (Stroud *et al.* 1977; Huber and Bode 1978). Chez les vertébrés, la trypsine est produite par le pancréas, activée à son arrivée dans le duodénum et active à son tour d'autres protéases comme la Chymotrypsine. Comme l'a montré l'étude de Zayas *et al.*, (2010), différents tissus sont composés de cellules sécrétrices chez la planaire *S. mediterranea*. L'étude de Zheng *et al.*, (2009) a mis en avant que les entéropeptidases sont très conservées à travers le règne animal. En supposant que certaines des cellules sécrétrices

des planaires possèdent une fonction de digestion similaire à celle des entéropeptidases des cellules acineuses chez les vertébrés, on peut proposer deux hypothèses liant l'observation d'une inhibition de la prise alimentaire à l'augmentation de l'activité de la Trypsine et de l'expression de son gène par la CYZ. Premièrement, nous avons observé une inhibition de la mobilité de la planaire par la CYZ à 100 µg/L, réduisant ainsi la capacité de l'animal à rechercher sa nourriture. De ce fait, l'animal privé de nourriture est capable comme l'a montré l'étude de Newmark et Alvaradro, (2002), de réduire sa taille afin de limiter les dépenses énergétiques. Ce phénomène est réalisé par protéolyse, nécessitant des enzymes protéolytiques telles que la Trypsine et la Chymotrypsine pour la dégradation des tissus. Cette hypothèse pourrait expliquer la surexpression du gène codant la trypsine. La deuxième hypothèse serait que la CYZ induit des systèmes de régulation de la Trypsine, déclenchant ainsi la synthèse et l'excrétion de Trypsine. Comme l'a montré l'étude de Fink *et al.*, (1998) sur le rat de laboratoire, la surproduction de Cholécystokinine (CCK) inhibe la prise alimentaire en agissant comme un régulateur négatif de la faim chez le rat. La surproduction de CCK chez la planaire pourrait donc accentuer l'inhibition de la prise alimentaire comme on a pu l'observer pour une exposition à la CYZ, en inhibant la sensation de faim et en obligeant l'animal à puiser l'énergie dans la protéolyse de ses tissus. Il serait donc intéressant de suivre l'évolution de la taille des organismes exposés à la CYZ en parallèle du suivi de l'expression du gène codant la trypsine et du suivi de l'activité trypsique.

Trois autres gènes impliqués dans la digestion codant une Fumarase, une Cytochrome C oxydase et une Carbonyle réductase, sont inhibés par les psychotropes. Ces protéines étant toutes impliquées dans le catabolisme énergétique (cycle de Krebs et respiration) on peut supposer que les psychotropes pourraient impacter la production d'ATP dans les cellules de la planaire. L'expression du gène codant une Cathepsine a elle aussi été impactée par la SRT. Tout comme l'étude de Cray *et al.*, (2014), qui a observé une inhibition de la Cathepsine suite à une exposition à un autre ISRS, le citalopram. La Cathepsine de notre étude et celle des travaux de Cray *et al.*, (2014) sont toutes deux des cystéines protéases impliquées dans les processus de dégradation protéiques cellulaires. L'inhibition de cette protéine pourrait lourdement impacter les fonctions cellulaires de la planaire qui pratique l'autolyse cellulaire pour se défendre face à une attaque de prédateur, mais aussi pour se reproduire de manière asexuée, en se séparant en deux moitiés qui régénéreront la partie manquante dans les 15 jours suivants.

Le dernier gène dont l'expression est modulée par les psychotropes code l'Anhydrase carbonique et il est surexprimé à la suite d'une exposition aux psychotropes. Cette protéine est impliquée dans le transport du CO₂ dans le sang en catalysant la transformation du CO₂ en HCO³⁻ et dans l'acidification du suc gastrique du tube digestif en sécrétant des ions H⁺ dans l'estomac. Les effets des benzodiazépines sur l'activité de l'Anhydrase carbonique ont été étudiés par Sentürk *et al.* (2012). Ces travaux ont montré que le diazépam et le midazolam inhibent l'activité de l'Anhydrase

carbonique chez le lapin à 2 et 0,2 mg/kg. Bien que ces travaux soient contradictoires à nos résultats, nous avons pu voir que ce type de molécule avait souvent des effets dose sur les organismes. De plus, cette étude a mesuré l'activité et non l'expression du transcrit codant cette protéine. Ainsi, les benzodiazépines pourraient avoir un effet post-transcriptionnel sur cette protéine ce qui pourrait expliquer ces résultats. La modulation de l'expression du gène codant l'Anhydrase carbonique pourrait donc perturber l'acidification de la cavité gastrique nécessaire à la digestion chez la planaire.

iv. Détoxification

La troisième fonction biologique majoritairement impactée par une exposition de la planaire aux 4 psychotropes est la fonction de détoxification. Dans ce groupe de 3 gènes, 1 est surexprimé et 2 sont inhibés. Le gène surexprimé, code le CYP3A5 (OXZ). Les deux gènes inhibés codent la GST (Glutathion-S-Transférase) (OXZ, CYZ et SRT) et le CYP3A29 (OXZ, CBZ, SRT). Parmi les gènes impliqués dans la détoxification des organismes, on peut identifier 2 gènes impliqués dans les réactions de fonctionnalisation, souvent assimilées à la phase I de la détoxification des organismes et un gène plutôt impliqué dans la phase II de la détoxification des organismes qui code une GST. La synthèse de ces effets pour chaque concentration des 4 médicaments est représentée dans le tableau 28.

Tableau 28 : Synthèse des effets des psychotropes sur le système de détoxification de la planaire *S. polychroa*

Fonction	Conc.	Effet transcriptomique	
		Surexprimés	Inhibés
Détoxification	Env.	CYP3A5 (OXZ)	CYP3A29 (OXZ, SRT), GST (SRT)
	10 µg/L		GST (CYZ)
	100 µg/L		CYP3A29 (OXZ, CBZ, SRT), GST (SRT)

OXZ : Oxazépam, CBZ : Carbamazépine, CYZ : Cyamémazine, SRT : Sertraline, Réc. : Récepteur, Conc. : Concentration, Env. : Environnementale

- Les réactions de fonctionnalisation (Phase I)

Le cytochrome CYP3A5 est surexprimé par une exposition des planaires à l'OXZ. Cette protéine intervient dans le processus de détoxification en oxydant les xénobiotiques comme le diltriazem ou le midazolam (Gorski *et al.* 1994; Kuehl *et al.* 2001; Guengerich 2001; Yamaori *et al.* 2004; He *et al.* 2005). De plus, l'étude de Usui *et al.*, (2003) a mis en évidence une induction de l'expression des gènes codant les cytochromes CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7 suite à une exposition des cellules d'hépatome (tumeur bénigne ou maligne du foie) humain (Hep G2 cells) à différentes molécules médicamenteuses comme la carbamazépine (6 mg/L), la rifampicine (9 mg/L) et la phénytoïne (14 mg/L). Ces résultats corroborent nos observations montrant qu'une exposition des planaires à l'OXZ induit une surexpression du gène CYP3A5 et suggèrent que la planaire répond au stress chimique induit par les médicaments en activant des voies de métabolisations (Usui *et al.* 2003) et

que la métabolisation de l'OXZ passe par une activation du CYP3A5. Le CYP3A29 est inhibé suite à une exposition aux médicaments (OXZ et CBZ). Il a été décrit que le CYP3A29 chez le cochon serait une protéine responsable de la métabolisation des xénobiotiques, tout comme le fait CYP3A4 chez l'Homme (Guengerich 2001; Yao *et al.* 2011). Nos résultats montrant une inhibition de l'expression du transcrite de CYP3A29 suggèrent que l'oxydation de l'OXZ et de la CBZ ne ferait pas intervenir le CYP3A29. La deuxième hypothèse serait que l'OXZ et la CBZ inhibent directement ou indirectement l'expression du gène CYP3A29.

- Les réactions de conjugaison (Phase II)

Le gène codant la GST est inhibé par la CYZ et la SRT. La GST est une protéine catalysant le transfert du glutathion sur des molécules exogènes comme les médicaments afin de faciliter leur élimination en les rendant plus hydrophobes. Cette enzyme intervient dans la deuxième phase du processus de métabolisation des xénobiotiques (Prohaska 1980; Sheehan *et al.* 2001). Il est souvent retrouvé dans la littérature que les xénobiotiques induisent l'activité et l'expression de la GST (Mannervik *et al.* 1985; Pickett and Lu 1989). En effet, plusieurs études ont rapporté une induction de la GST par la CBZ sur *Scrobicularia plana* (Freitas *et al.* 2015), la perche-soleil *Lepomis gibbosus* (Brandão *et al.* 2013) ou encore sur la moule verte *Perna viridis* (Juhel *et al.* 2016). Peu d'études montrent, comme dans notre cas, une inhibition du gène de la GST, suite à une exposition à des xénobiotiques. Parmi celles-ci, on peut citer l'étude de Vidal-Liñán *et al.*, (2016) qui montre une inhibition de la GST dans les branchies suite à l'exposition de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) aux PCB. La famille des protéines GST est composée de plusieurs classes comme les GST Alpha, Delta, Kappa, Mu, Pi, etc. Dans notre étude, il semblerait après analyse de la séquence ciblée, que celle-ci code une Mu GST et non la Pi GST qui intervient majoritairement dans la métabolisation des xénobiotiques. En effet, lors de la recherche des séquences nucléotidiques de la GST dans le transcriptome du *Radix*, la séquence de la Mu GST était la séquence pour laquelle l'homologie avec la Pi GST de la drosophile était la plus forte. Après une analyse des domaines, une comparaison avec plusieurs autres séquences et après l'étude en RT-qPCR, il s'est avéré que cette séquence possède plus d'homologie avec une Mu GST. La Mu GST intervient quand même dans la détoxification mais il semble, d'après nos résultats, qu'elle n'intervient pas pour les médicaments utilisés ici. Or cette classe de GST est plutôt impliquée dans la régulation des voies proapoptotiques (JNK, p38) (Townsend et Tew 2003). Les modulations d'expression des gènes de détoxification chez la planaire suggèrent que ces organismes perçoivent et répondent à la présence de psychotropes dans le milieu où elles sont exposées. Chez l'Homme, la détoxification de l'OXZ, de la CYZ et de la SRT passe par une phase de conjugaison (glucuronoconjugaison pour l'OXZ et la CYZ), après une phase de métabolisation par les enzymes du cytochrome P450. Il serait donc intéressant de réaliser le suivi de l'expression des gènes codant plusieurs GST, dont la Pi GST, ainsi que le gène codant l'UDP-

glucosyltransférase chez des planaires exposées à ces médicaments. Au cours de notre étude, nous n'avons pas observé de modulation de l'expression de gènes codant les transporteurs de type ABC transporteur impliqués dans la Phase III du processus de détoxification.

v. Développement du système nerveux

Le système nerveux de la planaire est lui aussi impacté par les psychotropes. Les effets des psychotropes sont synthétisés dans le tableau 29. Cinq gènes sont surexprimés par ces 4 molécules. On trouve les gènes codant la protéine Homéobox Six (OXZ, CBZ, CYZ et SRT), la protéine POU de classe 3 (OXZ et CYZ), l'Otoferline (CBZ), l'Ankyrine (CYZ) et la protéine SCN4A (CYZ).

Tableau 29 : Synthèse des effets des psychotropes sur le système nerveux de la planaire <i>S. polychroa</i>			
Fonction	Conc.	Effet transcriptomique	
		Surexprimés	Inhibés
Système nerveux	Env.	Homéobox Six 1/2 (CBZ, CYZ, SRT), POU Classe 3 (OXZ, CYZ), Otoferline (CBZ), Ankyrine (CYZ)	
	10 µg/L	Homéobox Six 1/2 (OXZ, CBZ, CYZ), POU Classe 3 (OXZ, CYZ), Otoferline (CBZ)	
	100 µg/L	Homéobox Six 1/2 (OXZ, CYZ), POU Classe 3 (OXZ, CYZ), SCN4A (CYZ)	

OXZ : Oxazépam, CBZ : Carbamazépine, CYZ : Cyamémazine, SRT : Sertraline, Réc. : Récepteur, Conc. : Concentration, Env. : Environnementale

L'OXZ et la CYZ induisent la surexpression du gène codant la protéine POU de classe 3 et les 4 psychotropes induisent la surexpression du gène codant la protéine à Homéobox Six 1. Cette protéine a une fonction dans le développement embryonnaire et dans celui du système nerveux en interagissant avec la protéine EYA1, qui est impliquée dans la formation des yeux chez la Drosophile, mais aussi dans la mise en place du système respiratoire et rénal chez l'Homme (Ruf *et al.* 2004; Kochhar *et al.* 2008; Krug *et al.* 2011; Mosrati *et al.* 2011). Le gène codant l'Otoferline est aussi surexprimé suite à une exposition des planaires aux deux plus faibles concentrations de CBZ. Cette protéine est impliquée dans la libération d'un neurotransmetteur dans les cellules sensibles aux sons et aux vibrations et dans la mise en place de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Marty *et al.* 2013). Ainsi, la surexpression de ce gène pourrait augmenter la sensibilité de la planaire et la stabilité des membranes cellulaires telles que celles des synapses, améliorant ainsi les différentes conductions nerveuses adrénergique, sérotoninergique ou encore cholinergique. L'augmentation de la conduction nerveuse cholinergique pourrait en partie expliquer l'augmentation de la mobilité observée pour ces deux concentrations de CBZ (0,165 et 10 µg/L). Afin de tester l'impact des psychotropes sur la perception des stimuli environnementaux par la planaire, on pourrait essayer par exemple de mesurer le déplacement des planaires exposées à des psychotropes et stressées par des flashes lumineux et/ou de température. Le gène codant l'Ankyrine est surexprimé à la suite d'une

exposition à la CYZ. Comme nous l'avons vu précédemment, l'Ankyrine est impliquée dans la stabilité des jonctions neuromusculaires et donc dans la conduction nerveuse déclenchant la contraction musculaire (Koch *et al.* 2008; Mazock *et al.* 2010). Le dernier gène impacté de cette fonction biologique est le canal Na^+ que code le gène *SCN4A*. Ce gène code la protéine SCN4A qui est un canal sodium impliqué dans la genèse et la propagation du potentiel d'action dans les neurones et les muscles. La mutation de ce gène chez l'Homme entraîne une myotonie (trouble du tonus musculaire), une hypokinésie, des paralysies et pourrait augmenter le taux de crise d'épilepsie (Mankodi *et al.* 2015; Bergareche *et al.* 2015; Zaharieva *et al.* 2016). La surexpression de ce gène, essentiel au bon fonctionnement de la contraction musculaire, suite à l'exposition de la planaire à la plus forte concentration de CYZ pourrait entraîner l'augmentation de ces transporteurs dans les membranes des synapses neuromusculaires et donc perturber les constantes ioniques de part et d'autre de la membrane. Cela suggère donc une altération de la conduction nerveuse et donc une inhibition de la mobilité comme nous avons pu le constater lors d'une exposition à 100 $\mu\text{g/L}$ de CYZ. L'ensemble de ces gènes touche plusieurs niveaux du système nerveux, tels que le développement, la mise en place et le maintien des jonctions neuromusculaires ou encore la propagation de l'influx nerveux. La modulation de ces gènes par les psychotropes chez les planaires pourrait impacter les fonctions sensorielles et la mobilité de ces organismes.

vi. *Bilan*

Parmi tous ces gènes impactés, on peut conclure que les principales fonctions biologiques perturbées par ces 4 médicaments sont le déplacement, la reproduction, la détoxification et le système nerveux. De plus, il ressort de cette analyse que 6 gènes sont systématiquement modulés par au moins trois médicaments. Parmi ces six gènes, 2 font partie du système de détoxification (*CYP3A29* et *gst*), 2 interviennent dans la mobilité (*titine* et *ryr* (récepteur à la ryanodine)) et les deux derniers font parti du système reproducteur (*vtg*) et du développement du système nerveux (*homéobox six*). Tous ces gènes répondent de la même manière aux différents médicaments testés (sauf *vtg* pour la CBZ) et feraient donc de bons biomarqueurs d'exposition aux psychotropes chez les planaires.

BILAN ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de l'exposition des deux organismes aux psychotropes sont très intéressants, notamment lorsque l'on compare les deux approches utilisées. La méthode du RNASeq en différentiel utilisée sur le *R. balthica* est très utile lorsque l'on travaille sur des organismes dont aucune donnée transcriptomique n'est disponible dans la littérature. Cette méthode permet tout d'abord de séquencer et donc d'obtenir le transcriptome de l'organisme étudié. Cependant, on relève un taux d'erreur d'assemblage des séquences non négligeable (du à l'absence de génome et de transcriptome de référence) qui impacte la qualité d'assemblage des contigs et donc de l'annotation fonctionnelle. De plus, nous avons pu constater que l'analyse en différentielle n'est pas aussi précise et fiable que l'étude en RT-qPCR que nous avons réalisé. La méthode utilisée pour la planaire *S. polychroa* est bien plus intégrative, elle nous a permis d'obtenir les effets macroscopiques des médicaments sur les organismes et de les lier aux effets transcriptomiques (Figure 85).

Lorsque l'on compare les effets des 4 psychotropes sur le transcriptome des deux organismes étudiés, on constate que ces derniers ont peu d'effets en commun. Cela pourrait être dû au fait que pour le *Radix*, nous avons travaillé sur le développement embryonnaire alors que sur la planaire, nous avons travaillé sur des organismes adultes. L'unique voie impactée par les molécules étudiées (notamment la cyamémazine et la sertraline) chez les deux organismes est la voie de signalisation Notch. Ces molécules ciblent soit l'expression des gènes codant les enzymes de maturation du domaine Notch intracellulaire (NICD) (Figure 86), soit directement l'expression du gène codant Notch. Chez le *Radix*, nous observons une inhibition par les 4 psychotropes du gène codant MEGF-6 impliqué dans la formation des synapses cholinergiques. On pourrait supposer un impact potentiel des psychotropes sur la mobilité du *Radix*, comme nous l'avons observé pour la planaire. Pour le *Radix*, nous avons retrouvé peu de gènes différentiellement exprimés impliqués dans la reproduction du mollusque. Nous avons analysé l'effet sur des organismes juvéniles non sexuellement matures, à la différence de la planaire, cela n'a donc rien d'étonnant. Les bilans des résultats obtenus par les deux méthodes sont représentés sous forme de schéma par les figures 85 et 86.

Afin d'améliorer et d'élargir les résultats obtenus sur le *Radix*, il serait intéressant de mener une étude en RT-qPCR ciblant différents pools de gènes représentant des fonctions spécifiques telles que la reproduction, la détoxification ou encore la mobilité. De plus, cette étude permettrait d'évaluer la répétabilité de cette méthode et de répondre à la suggestion faite en bilan du Chapitre 4. VI. e. proposant d'utiliser les gènes *CYP3A29*, *gst*, *titine*, *ryr*, *vgt* et *six 1/2*, en tant que biomarqueurs d'exposition à des molécules psychotropes chez les invertébrés d'eau douce.

Malgré les nombreux paramètres étudiés à différents niveaux de la planaire et du mollusque, il manque toujours l'information des effets des médicaments sur la traduction des ARNm en protéines fonctionnelles. C'est pourquoi, afin de compléter les effets déjà montrés, il serait intéressant de réaliser une étude en protéogénomique comme décrit par la revue d'Armengaud *et al.* (2014) des effets des médicaments par rapport à un témoin. Cette méthode permettrait d'une part d'améliorer grandement l'annotation des séquences obtenues par RNAseq et d'autre part de corriger quelques erreurs d'assemblage et de comparer les effets transcriptomiques des médicaments aux effets protéomiques.

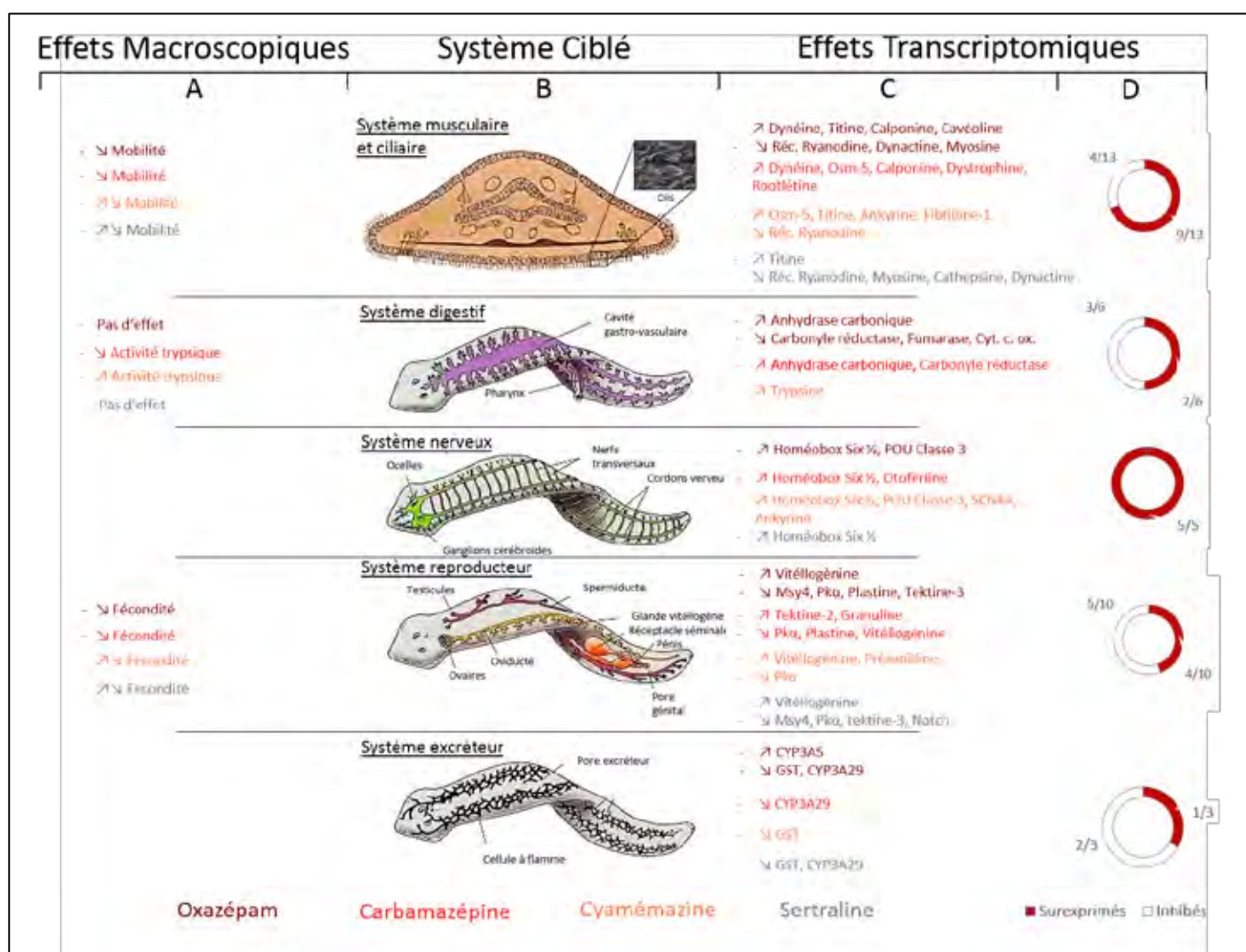


Figure 85 : Schéma bilan des effets des 4 médicaments sur la planaire *S. polychroa*. A : Résumé des effets macroscopiques observés, B : Schéma des différents systèmes ciblés chez *S. polychroa*, C : Résumé des différents gènes impactés pour chaque système et pour chaque molécule étudiée, D : Chaque graphique représente le nombre de gènes inhibés ou surexprimés par les 4 molécules pour chaque système, GST : Gluthathione-S-Transférase, Rec. Ryanodine : Récepteur à la ryanodine, Pka : Protéine kinase α .

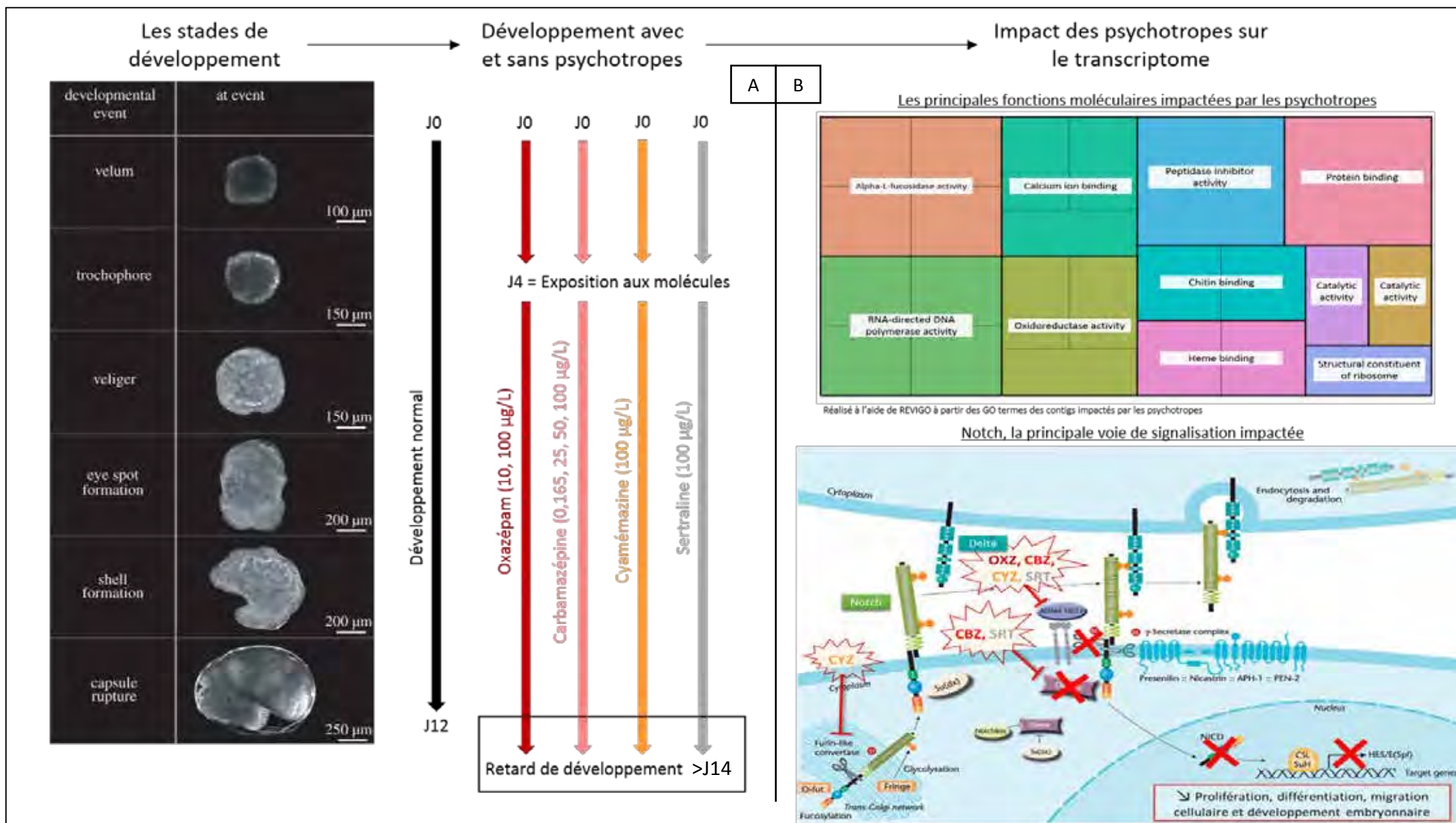


Figure 86 : Schéma bilan des effets des 4 médicaments sur le gastéropode *R. balthica*. Les effets des psychotropes sur le développement embryonnaire sont représentés dans la partie A et les effets sur le transcriptome impactant plusieurs fonctions moléculaires et principalement la voie de signalisation Notch sont représentés par la partie B. OXZ : Oxazépam, CBZ : Carbamazépine, CYZ : Cyamémazine, SRT : Sertraline, NICD : Domaine intracellulaire Notch, J : Jours.

Les résultats de notre étude ont montré que les psychotropes pouvaient perturber de nombreuses fonctions chez les mollusques et les planaires. De ce fait, il est important de maintenir et d'améliorer les méthodes d'évaluation du risque des médicaments sur l'environnement. Aujourd'hui, le calcul des PNEC utilise des valeurs de NOEC (concentration la plus forte sans effet observable) uniquement obtenues à partir de tests normalisés. Il est à mon sens nécessaire, voire impératif d'élargir le calcul des PNEC en utilisant l'ensemble des données de toxicité présentes dans la littérature, en incluant les études d'impact génomique, transcriptomique, épigénétique ou encore protéomique afin d'améliorer cette évaluation du risque. Cependant, un problème se pose, les tests écotoxicologiques pour une molécule sont souvent réalisés sur des organismes phylogénétiquement très éloignés les uns des autres. De ce fait, il est difficile d'imaginer que ces organismes répondent tous de la même façon à un contaminant donné.

Afin de répondre à ce problème et à partir des travaux de Mouthon (2001), je propose d'appliquer un facteur de correction pour le calcul des PNEC. En effet, Mouthon (2001) a débuté un classement de plusieurs taxons de mollusques en fonction de leur tolérance à une pollution biodégradable (Figure 87). Ainsi, comme l'a fait Mouthon (2001), la première étape consisterait à classer les taxons pour chaque type de pollutions telles que les pollutions aux métaux lourds et composés chlorés, aux médicaments, aux composés biodégradables et aux produits de soins corporels, à partir des références bibliographiques déjà présentes dans la littérature. Ensuite, il faudrait attribuer un facteur de correction pour chaque taxon utilisé en écotoxicologie et pour chaque catégorie de pollution. Le facteur serait donc compris entre 0 et 1 pour un taxon plutôt résistant à la catégorie de polluants étudiée et supérieur à 1 pour un taxon sensible au polluant étudié. Ainsi, lorsque ce facteur serait multiplié par la PNEC, celle-ci serait alors augmentée en cas de sensibilité des organismes étudiés aux contaminants et diminuée en cas de résistance.

	Espèces	Genres	Familles
Tolérance croissante aux pollutions biodégradables	1 Physella (Physa) actua (Draparnaud)	Physella	A
	2 Bathyomphalus contortus (L.) Valvata cristata (Müller)	Bathyomphalus	
	3 Radix (Lymnaea) peregra (Müller) Radix (Lymnaea) auricularia (L.) Ancylus fluviatilis (Müller) + Pisidium casertanum (Poli)	Radix Ancylus	Valvatidae
	4 Stagnicola (Lymnaea) 'palustris' (Müller) Hippeutis complanata (L.)	Valvata Stagnicola Hippeutis	
	5 Gyraulus albus (Müller) Potamopyrgus antipodarum (Smith) + Pisidium personatum Malm	Gyraulus Potamopyrgus	Lymnaeidae Physidae
	6 Galba (Lymnaea) truncatula (Müller) Armiger crista (L.) Acroluxus lacustris (L.) Bithynia tentaculata (L.) Theodoxus fluviatilis (L.) + Musculium lacustre (Müller) + Pisidium subtruncatum Malm + Pisidium nitidum Jernys + Pisidium milium Held + Pisidium henslowanum (Sheppard)	Galba Armiger Acroloxus Theodoxus + Musculium + Pisidium	B Planorbidae Acroloxiidae Sphaeriidae + Neritidae Ancyridae C
	7 Valvata piscinalis (Müller) Sphaerium corneum (L.) Pisidium hibernicum Westerlund		
	8 Ferrissia wautieri (Miroti) + Viviparus viviparus (L.) + Dreissena polymorpha (Pallas)	Ferrissia Viviparus Dreissena	Viviparidae Dreissenidae +
	9 + Sphaerium solidum (Normand) + Sphaerium rivicola (Lamarck) + Pisidium moitessierianum Paladilhé + Unio pictorum (L.) + Anodonta anatina + cygnea (L.) + Potomida littoralis (Cuvier)	+ Sphaerium Bithynia + Unio + Anodonta + Potomida	Bithyniidae Unionidae +
	10 + Lymnaea stagnalis (L.) + Physa fontinalis (L.) + Planorbis carinatus (Müller) + Pisidium supinum Schmidt + Unio crassus Philipsson	Lymnaea Physa Planorbis	
	11 Anisus vortex (L.) Bithynia leachi (Sheppard) Belgrandia sp. + Pisidium amnicum (Müller) + Pisidium tenuilineatum Stelfox	Anisus Belgrandia	Hydrobiidae
	12 + Unio tumidus Philipsson + Pseudanodonta elongata Holandre	+ Pseudanodonta	
	13 Myxas glutinosa (Müller)	Myxas	

Figure 87 : Échelles de sensibilité aux pollutions des espèces, genres et familles de mollusques définies à partir de la classification ascendante hiérarchique. (Les espèces bivalves sont signalées par un +) (Mouthon 2001)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Académie Nationale de Pharmacie A (2008) Médicaments et environnement. (http://www.acadpharm.org/dos_public/1_Rapport_Med_Env_version_JMH_def_JPC.pdf)
- Afssa (2008) Hiérarchisation des résidus de médicaments d'intérêt pour l'analyse des ressources et des eaux traitées. (<https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX-Ra-MedicamentsEaux.pdf>)
- Agata K (2008) Planaria nervous system. Scholarpedia 3:5558. doi: 10.4249/scholarpedia.5558
- Ahlford K (2008) Environmental Risk Assessment of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) Fluoxetine, Citalopram, Sertraline, Paroxetine and the Benzodiazepine Oxazepam. Uppsala University, Sweden. (http://www.ibg.uu.se/digitalAssets/177/c_177014-l_3-k_ahlford-kristina-report.pdf)
- Algeri S, Carolei A, Ferretti P, *et al.* (1983) Effects of dopaminergic agents on monoamine levels and motor behaviour in planaria. *Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol* 74:27–29. doi: 10.1016/0742-8413(83)90142-1
- Almeida Â, Calisto V, Esteves VI, *et al.* (2014) Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: Effects on bivalves. *Aquat Toxicol* 156:74–87. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.08.002
- Alvarado AS (2003) The freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*: embryogenesis, stem cells and regeneration. *Curr Opin Genet Dev* 13:438–444. doi: 10.1016/S0959-437X(03)00082-0
- Amiard J-C (1994) Surveillance de la qualité des milieux aquatiques par les biomarqueurs. IREPOLIA, La Chronique, 9:2.
- Amos LA (2008) The tektin family of microtubule-stabilizing proteins. *Genome Biol* 9:229. doi: 10.1186/gb-2008-9-7-229
- Anders S, Huber W (2012) Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package. (<https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/DESeq/inst/doc/DESeq.pdf>)
- Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, *et al.* (2010) Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 29:730–741. doi: 10.1002/etc.34
- Arbus C, Benyamina A, Llorca P-M, *et al.* (2007) Characterization of human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of cyamemazine. *Eur J Pharm Sci* 32:357–366. doi: 10.1016/j.ejps.2007.09.003
- Armengaud J, Trapp J, Pible O, *et al.* (2014) Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. *J Proteomics* 105:5–18. doi: 10.1016/j.jprot.2014.01.007
- Atli G, Grosell M (2016) Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure. *Aquat Toxicol Amst Neth* 176:38–44. doi: 10.1016/j.aquatox.2016.04.007

- Attia SM (2010) Deleterious Effects of Reactive Metabolites. *Oxid Med Cell Longev* 3:238–253. doi: 10.4161/oxim.3.4.13246
- Austin J, Kimble J (1987) glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* 51:589–599.
- Bader A, De Bartolo L, Haverich A (2000) High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *J Biotechnol* 81:95–105. doi: 10.1016/S0168-1656(00)00233-9
- Baharav E, Bar M, Taler M, *et al.* (2012) Immunomodulatory Effect of Sertraline in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis. *Neuroimmunomodulation* 19:309–318. doi: 10.1159/000339109
- Bai Z, Zheng H, Lin J, *et al.* (2013) Comparative Analysis of the Transcriptome in Tissues Secreting Purple and White Nacre in the Pearl Mussel *Hyriopsis cumingii*. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0053617
- Baker DR, Kasprzyk-Hordern B (2013) Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Sci Total Environ* 454–455:442–456. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.043
- Ball IR (1974) A new genus and species of freshwater planarian from Australia (Platyhelminthes: Turbellaria). *J Zool* 174:149–158. doi: 10.1111/j.1469-7998.1974.tb03148.x
- Ball IR, Reynoldson TB, Warwick T (1969) The taxonomy, habitat and distribution of the freshwater triclad *Planaria torva* (Platyhelminthes: Turbellaria) in Britain. *J Zool* 157:99–123. doi: 10.1111/j.1469-7998.1969.tb01691.x
- Bandow C, Weltje L (2012) Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci Total Environ* 435–436:90–95. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.07.005
- Barcia R, Lopez-García JM, Ramos-Martínez JI (1997) The 28S fraction of rRNA in molluscs displays electrophoretic behaviour different from that of mammal cells. *Biochem Mol Biol Int* 42:1089–1092.
- Baron M (2012) Endocytic routes to Notch activation. *Semin Cell Dev Biol* 23:437–442. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.01.008
- Bartelt-Hunt SL, Snow DD, Damon T, *et al.* (2009) The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environ Pollut* 157:786–791. doi: 10.1016/j.envpol.2008.11.025
- Beausse J (2004) Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *TrAC Trends Anal Chem* 23:753–761. doi: 10.1016/j.trac.2004.08.005
- Beek B, Böhling S, Bruckmann U, *et al.* (2000) The Assessment of Bioaccumulation. In: Beek B (ed) *Bioaccumulation – New Aspects and Developments*. Springer Berlin Heidelberg, pp 235–276
- Bendz D, Paxéus NA, Ginn TR, Loge FJ (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J Hazard Mater* 122:195–204. doi: 10.1016/j.jhazmat.2005.03.012

- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580.
- Benyamina A, Arbus C, Nuss P, *et al.* (2008) Affinity of cyamemazine metabolites for serotonin, histamine and dopamine receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 578:142–147. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.09.025
- Bergareche A, Bednarz M, Sánchez E, *et al.* (2015) SCN4A pore mutation pathogenetically contributes to autosomal dominant essential tremor and may increase susceptibility to epilepsy. *Hum Mol Genet* 24:7111–7120. doi: 10.1093/hmg/ddv410
- Berry LW, Westlund B, Schedl T (1997) Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Dev Camb Engl* 124:925–936.
- Besco JA, Hooft van Huijsduijnen R, Frostholm A, Rotter A (2006) Intracellular substrates of brain-enriched receptor protein tyrosine phosphatase rho (RPTPrho/PTPRT). *Brain Res* 1116:50–57. doi: 10.1016/j.brainres.2006.07.122
- 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. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.012
- Besse J-P, Kausch-Barreto C, Garric J (2008) Exposure Assessment of Pharmaceuticals and Their Metabolites in the Aquatic Environment: Application to the French Situation and Preliminary Prioritization. *Hum Ecol Risk Assess Int J* 14:665–695. doi: 10.1080/10807030802235078
- Billinghurst Z, Clare AS, Matsumura K, Depledge MH (2000) Induction of cypris major protein in barnacle larvae by exposure to 4-n-nonylphenol and 17 β -oestradiol. *Aquat Toxicol* 47:203–212. doi: 10.1016/S0166-445X(99)00018-1
- Bisgrove BW, Andrews ME, Raff RA (1991) Fibropellins, products of an EGF repeat-containing gene, form a unique extracellular matrix structure that surrounds the sea urchin embryo. *Dev Biol* 146:89–99. doi: 10.1016/0012-1606(91)90449-D
- Bisson M, Rose M, Dujardin R, *et al.* (1996) Quantitative analysis of antineoplastic drug residues in emanations from incineration at 850° C. In: European Respiratory Society Annual Congress 1996.
- Bisson M, Strub MP, Ferrieres C, Gabarda-Oliva D (2007) Characterization by both analytical and genotoxicological approaches of the gas effluents and clinkers produced by a specific incinerator for infectious wastes during the incineration of cytostatic drugs. *Toxicol Lett* 172:S112–S113.
- Boddington MJ, Mettrick DF (1974) The Distribution, Abundance, Feeding Habits, and Population Biology of the Immigrant Triclad *Dugesia polychroa* (Platyhelminthes: turbellaria) in Toronto Harbour, Canada. *J Anim Ecol* 43:681–699. doi: 10.2307/3531
- Bond A, Lader M (2012) Anxiolytics and Sedatives. In: Verster JC, Brady K, Galanter M, Conrod P (eds) *Drug Abuse and Addiction in Medical Illness*. Springer New York, New York, NY, pp 231–239

- Bonnafé E, Sroda S, Budzinski H, *et al.* (2015) Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environ Sci Pollut Res* 22:11033–11046. doi: 10.1007/s11356-015-4309-x
- Bossus MC, Guler YZ, Short SJ, *et al.* (2014) Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. *Aquat Toxicol Amst Neth* 151:46–56. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.11.025
- Bouétard A, Besnard A-L, Vassaux D, *et al.* (2013) Impact of the redox-cycling herbicide diquat on transcript expression and antioxidant enzymatic activities of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat Toxicol* 126:256–265. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.11.013
- Bouétard A, Noirot C, Besnard A-L, *et al.* (2012) Pyrosequencing-based transcriptomic resources in the pond snail *Lymnaea stagnalis*, with a focus on genes involved in molecular response to diquat-induced stress. *Ecotoxicology* 21:2222–2234. doi: 10.1007/s10646-012-0977-1
- Bouissou-Schurtz C, Houeto P, Guerbet M, *et al.* (2014a) Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:296–303. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.04.006
- Bouissou-Schurtz C, Houeto P, Guerbet M, *et al.* (2014b) Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:296–303. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.04.006
- Boxall ABA, Kolpin DW, Halling-Sørensen B, Tolls J (2003) Peer Reviewed: Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks? *Environ Sci Technol* 37:286A–294A. doi: 10.1021/es032519b
- Brandão FP, Rodrigues S, Castro BB, *et al.* (2013) Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and behavioural effects. *Aquat Toxicol* 144–145:218–229. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.10.005
- Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J (2013) Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339:814–815. doi: 10.1126/science.1226850
- Byrne RA, Rundle SD, Smirthwaite JJ, Spicer JJ (2009) Embryonic rotational behaviour in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: influences of environmental oxygen and development stage. *Zoology* 112:471–477. doi: 10.1016/j.zool.2009.03.001
- Calisto V, Esteves VI (2009) Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77:1257–1274. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.021
- Campos B, Garcia-Reyero N, Rivetti C, *et al.* (2013) Identification of metabolic pathways in *Daphnia magna* explaining hormetic effects of selective serotonin reuptake inhibitors and 4-nonylphenol using transcriptomic and phenotypic responses. *Environ Sci Technol* 47:9434–9443. doi: 10.1021/es4012299
- Cardoso O (2015) Vers une meilleure compréhension des effets écotoxicologiques induits par les rejets industriels pharmaceutiques, chez les poissons sauvages chroniquement exposés. Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims

- Cardoso O, Porcher J-M, Sanchez W (2014) Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: Review of evidence and need for knowledge. *Chemosphere* 115:20–30. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.02.004
- Carlsson A, Lindqvist M (1963) Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 20:140–144.
- Carlsson C, Johansson A-K, Alvan G, *et al.* (2006) Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci Total Environ* 364:67–87. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.06.035
- Case TJ, Taper ML (1986) On the Coexistence and Coevolution of Asexual and Sexual Competitors. *Evolution* 40:366–387. doi: 10.2307/2408816
- Cebrià F (2008) Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: An immunocytochemical study. *Neurosci Res* 61:375–384. doi: 10.1016/j.neures.2008.04.005
- Chafouleas JG, Bolton WE, Means AR (1984) Potentiation of bleomycin lethality by anticalmodulin drugs: a role for calmodulin in DNA repair. *Science* 224:1346–1348.
- Chang AS, Lam DM (1998) Mechanistic analyses of ion dependences in a high-affinity human serotonin transport system in transfected murine fibroblast cells. *J Physiol* 510 (Pt 3):903–913.
- Chaplin J (1993) Heredity - Abstract of article: The local displacement of a sexually reproducing ostracod by a conspecific parthenogen. *Heredity* 71:259–268.
- Charles S, Ducrot V, Azam D, *et al.* (2016) Optimizing the design of a reproduction toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Regul Toxicol Pharmacol* 81:47–56. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.07.012
- Charron L (2014) Biomarqueurs énergétiques chez un amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*: Développement, lien avec le succès reproducteur et application in situ. Université de Reims Champagne Ardenne, Reims
- Chen H, Zha J, Liang X, *et al.* (2014) Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquat Toxicol* 155:1–8. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.06.001
- Chen M, Cooper VI, Deng J, *et al.* (2015) Occurrence of Pharmaceuticals in Calgary's Wastewater and Related Surface Water. *Water Environ Res* 87:414–424. doi: 10.2175/106143015X14212658614199
- Chen M, Ohman K, Metcalfe C, *et al.* (2006) Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada. *Water Qual Res J Can* 41:351–364.
- Cheung CCC, Lam PKS (1998) Effect of cadmium on the embryos and juveniles of a tropical freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Water Sci Technol* 38:263–270.

- Chiffre A, Clérandeau C, Dwoinikoff C, *et al.* (2016) Psychotropic drugs in mixture alter swimming behaviour of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) larvae above environmental concentrations. *Environ Sci Pollut Res* 23:4964–4977. doi: 10.1007/s11356-014-3477-4
- Chong T, Stary JM, Wang Y, Newmark PA (2011) Molecular markers to characterize the hermaphroditic reproductive system of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *BMC Dev Biol* 11:69. doi: 10.1186/1471-213X-11-69
- Cleuvers M (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett* 142:185–194.
- Coeurdassier M, De Vaufleury A, Badot P-M (2003) Bioconcentration of Cadmium and Toxic Effects on Life-History Traits of Pond Snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in Laboratory Bioassays. *Arch Environ Contam Toxicol* 45:102–109. doi: 10.1007/s00244-002-0152-4
- Coeurdassier M, de Vaufleury A, Scheifler R, *et al.* (2004) Effects of cadmium on the survival of three life-stages of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda). *Bull Environ Contam Toxicol* 72:1083–1090.
- Corson GM, Charbonneau NL, Keene DR, Sakai LY (2004) Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics* 83:461–472. doi: 10.1016/j.ygeno.2003.08.023
- Corvaisier N (2000) Les substances médicamenteuses rejetées dans les eaux usées urbaines. (<http://greeqs.free.fr/siteeqs/eau/textes/nonregl/SY-02-00A.pdf>)
- Court MH, Hao Q, Krishnaswamy S, *et al.* (2004) UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 Pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y Genotype and Gender Are Major Determinants of Oxazepam Glucuronidation by Human Liver. *J Pharmacol Exp Ther* 310:656–665. doi: 10.1124/jpet.104.067660
- Coutellec M-A, Besnard A-L, Caquet T (2013) Population genetics of *Lymnaea stagnalis* experimentally exposed to cocktails of pesticides. *Ecotoxicology* 22:879–888. doi: 10.1007/s10646-013-1082-9
- Coutellec M-A, Lagadic L (2006) Effects of Self-Fertilization, Environmental Stress and Exposure to Xenobiotics on Fitness-Related Traits of the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology* 15:199–213. doi: 10.1007/s10646-005-0049-x
- Cray JJ, Weinberg SM, Parsons TE, *et al.* (2014) Selective serotonin reuptake inhibitor exposure alters osteoblast gene expression and craniofacial development in mice. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol* 100:912–923. doi: 10.1002/bdra.23323
- Crumb W, Llorca P-M, Lancon C, *et al.* (2006) Effects of cyamemazine on hERG, INa, ICa, Ito, Isus and IK1 channel currents, and on the QTc interval in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 532:270–278. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.079
- Cruz TS, Faria PA, Santana DP, *et al.* (2010) On the mechanisms of phenothiazine-induced mitochondrial permeability transition: Thiol oxidation, strict Ca²⁺ dependence, and cyt c release. *Biochem Pharmacol* 80:1284–1295. doi: 10.1016/j.bcp.2010.06.052
- Cuellar O (1977) Animal parthenogenesis. *Science* 197:837–843. doi: 10.1126/science.887925

- Cuellar O (1994) Biogeography of parthenogenetic animals. *Séances Société Biogéographie* 70:1–13.
- Daouk S, Chevre N, Vernaz N, *et al.* (2015) Prioritization methodology for the monitoring of active pharmaceutical ingredients in hospital effluents. *J Environ Manage* 160:324–332.
- Das S, Khangarot BS (2010) Bioaccumulation and toxic effects of cadmium on feeding and growth of an Indian pond snail *Lymnaea luteola* under laboratory conditions. *J Hazard Mater* 182:763–770. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.100
- Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107:907–938.
- Davis CG (1990) The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol* 2:410–419.
- Daws LC, Montañez S, Munn JL, *et al.* (2006) Ethanol inhibits clearance of brain serotonin by a serotonin transporter-independent mechanism. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:6431–6438. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4050-05.2006
- de Faria PA, Bettanin F, Cunha RLOR, *et al.* (2015) Cytotoxicity of phenothiazine derivatives associated with mitochondrial dysfunction: A structure-activity investigation. *Toxicology* 330:44–54. doi: 10.1016/j.tox.2015.02.004
- de Jong Y, Verbeek M, Michelsen V, *et al.* (2014) Fauna Europaea – all European animal species on the web. *Biodivers Data J* 2:e4034. doi: 10.3897/BDJ.2.e4034
- de Jong-Brink M (1992) Interference of schistosome parasites with neuroendocrine mechanisms in their snail host causes physiological changes. *Adv Neuroimmunol* 2:199–233.
- Deftos ML, He Y-W, Ojala EW, Bevan MJ (1998) Correlating Notch Signaling with Thymocyte Maturation. *Immunity* 9:777–786. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80643-3
- DeLorenzo ME, Fleming J (2008) Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch Environ Contam Toxicol* 54:203–210. doi: 10.1007/s00244-007-9032-2
- Denslow ND, Chow MC, Kroll KJ, Green L (1999) Vitellogenin as a Biomarker of Exposure for Estrogen or Estrogen Mimics. *Ecotoxicology* 8:385–398. doi: 10.1023/A:1008986522208
- Deochand ME, Birkholz TR, Beane WS (2016) Temporal regulation of planarian eye regeneration. *Regen Oxf Engl* 3:209–221. doi: 10.1002/reg2.61
- Desmond PF, Muriel J, Markwardt ML, *et al.* (2015) Identification of Small Ankyrin 1 as a Novel Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase 1 (SERCA1) Regulatory Protein in Skeletal Muscle. *J Biol Chem* 290:27854–27867. doi: 10.1074/jbc.M115.676585
- Devereux TR, White CM, Sills RC, *et al.* (1994) Low frequency of H-ras mutations in hepatocellular adenomas and carcinomas and in hepatoblastomas from B6C3F1 mice exposed to oxazepam in the diet. *Carcinogenesis* 15:1083–1087.
- Diederich RJ, Matsuno K, Hing H, Artavanis-Tsakonas S (1994) Cytosolic interaction between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the Notch signaling pathway. *Dev Camb Engl* 120:473–481.

- Dreymueller D, Uhlig S, Ludwig A (2015) ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 308:L325-343. doi: 10.1152/ajplung.00294.2014
- Duncan EJ, Hyink O, Dearden PK (2016) Notch signalling mediates reproductive constraint in the adult worker honeybee. *Nat Commun*. doi: 10.1038/ncomms12427
- Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA (2005) The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 10:927–939. doi: 10.1007/s10495-005-1055-4
- Eriksson Å, Yachnin J, Lewensohn R, Nilsson A (2001) DNA-Dependent Protein Kinase Is Inhibited by Trifluoperazine. *Biochem Biophys Res Commun* 283:726–731. doi: 10.1006/bbrc.2001.4830
- Estévez-Calvar N, Canesi L, Montagna M, *et al.* (2016) Adverse effects of the SSRI antidepressant sertraline on early life stages of marine invertebrates. *Mar Environ Res*. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.05.021
- Feldmeyer B, Wheat CW, Krezdorn N, *et al.* (2011) Short read Illumina data for the de novo assembly of a non-model snail species transcriptome (*Radix balthica*, Basommatophora, Pulmonata), and a comparison of assembler performance. *BMC Genomics* 12:317. doi: 10.1186/1471-2164-12-317
- Fent K (2008) Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Organisms. In: Kümmerer K (ed) *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg, pp 175–203
- Ferrari B, Paxéus N, Lo Giudice R, *et al.* (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:359–370.
- Fink H, Rex A, Voits M, Voigt JP (1998) Major biological actions of CCK--a critical evaluation of research findings. *Exp Brain Res* 123:77–83.
- Fitzgerald K, Greenwald I (1995) Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Dev Camb Engl* 121:4275–4282.
- Flatmark (2000) Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand* 168:1–17. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00596.x
- Flyborg L, Björleinius B, Persson KM (2010) Can treated municipal wastewater be reused after ozonation and nanofiltration? Results from a pilot study of pharmaceutical removal in Henriksdal WWTP, Sweden. *Water Sci Technol* 61:1113–1120. doi: 10.2166/wst.2010.029
- Fong PP, Ford AT (2014) The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Antidepressants Aquat Environ* 151:4–13. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.12.003
- Fox KA, Lahcen RB (1974) Liver-cell adenomas and *Peliosis hepatis* in mice associated with oxazepam. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 8:481–488.
- Franck N, Thibaut F (2005) *Pharmacologie et mode d'action des neuroleptiques*. EMC - Psychiatrie 2:282–299. doi: 10.1016/j.emcps.2005.01.001

- Frank S, Schulthess T, Landwehr R, *et al.* (2002) Characterization of the Matrilin Coiled-coil Domains Reveals Seven Novel Isoforms. *J Biol Chem* 277:19071–19079. doi: 10.1074/jbc.M202146200
- Franzellitti S, Striano T, Valbonesi P, Fabbri E (2016) Insights into the regulation of the MXR response in haemocytes of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish Shellfish Immunol* 58:349–358. doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.048
- Freitas R, Almeida Â, Calisto V, *et al.* (2015) How life history influences the responses of the clam *Scrobicularia plana* to the combined impacts of carbamazepine and pH decrease. *Environ Pollut Barking Essex* 1987 202:205–214. doi: 10.1016/j.envpol.2015.03.023
- Fu L, Niu B, Zhu Z, *et al.* (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28:3150–3152. doi: 10.1093/bioinformatics/bts565
- Fuxe K, Dahlström A, Höistad M, *et al.* (2007) From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission. *Brain Res Rev* 55:17–54. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.02.009
- Gagné F, André C, Gélinas M (2010) Neurochemical effects of benzodiazepine and morphine on freshwater mussels. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 152:207–214. doi: 10.1016/j.cbpc.2010.04.007
- Galus M, Kirischian N, Higgins S, *et al.* (2013) Chronic, low concentration exposure to pharmaceuticals impacts multiple organ systems in zebrafish. *Aquat Toxicol Amst Neth* 132–133:200–211. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.12.021
- Galus M, Rangarajan S, Lai A, *et al.* (2014) Effects of chronic, parental pharmaceutical exposure on zebrafish (*Danio rerio*) offspring. *Aquat Toxicol Amst Neth* 151:124–134. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.01.016
- García-Carreño FL, Haard NF (1993) Characterization of Proteinase Classes in Langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and Crayfish (*Pacifastacus astacus*) Extracts. *J Food Biochem* 17:97–113. doi: 10.1111/j.1745-4514.1993.tb00864.x
- Gavai AV, Quesnelle C, Norris D, *et al.* (2015) Discovery of Clinical Candidate BMS-906024: A Potent Pan-Notch Inhibitor for the Treatment of Leukemia and Solid Tumors. *ACS Med Chem Lett* 6:523–527. doi: 10.1021/acsmedchemlett.5b00001
- Gehrke AR, Srivastava M (2016) Neoblasts and the evolution of whole-body regeneration. *Curr Opin Genet Dev* 40:131–137. doi: 10.1016/j.gde.2016.07.009
- Geret F (2014) Les médicaments psychotropes en milieu aquatique. Quels effets sur les écosystèmes aquatiques ? Quelles implications au niveau sociétal ? Laboratoire GEODE - UMR 5602, Université de Toulouse, Toulouse
- Gierbolini J, Giarratano M, Benbadis SR (2016) Carbamazepine-related antiepileptic drugs for the treatment of epilepsy - a comparative review. *Expert Opin Pharmacother* 17:885–888. doi: 10.1517/14656566.2016.1168399
- Giorgini F, Davies HG, Braun RE (2002) Translational repression by MSY4 inhibits spermatid differentiation in mice. *Dev Camb Engl* 129:3669–3679.

- Godovikova V, Ritchie HH (2007) Dynamic Processing of Recombinant Dentin Sialoprotein-Phosphoryn Protein. *J Biol Chem* 282:31341–31348. doi: 10.1074/jbc.M702605200
- Golovko O, Kumar V, Fedorova G, *et al.* (2014) Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 111:418–426. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.132
- Gomot A (1998) Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicol Environ Saf* 41:288–297. doi: 10.1006/eesa.1998.1711
- Gorski JC, Hall SD, Jones DR, *et al.* (1994) Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* 47:1643–1653.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, *et al.* (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29:644–652. doi: 10.1038/nbt.1883
- Grave K, Hansen MK, Kruse H, *et al.* (2008) Prescription of antimicrobial drugs in Norwegian aquaculture with an emphasis on “new” fish species. *Prev Vet Med* 83:156–169. doi: 10.1016/j.prevetmed.2007.07.002
- Gronen S, Denslow N, Manning S, *et al.* (1999) Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ Health Perspect* 107:385–390.
- Gschwentner R, Ladurner P, Nimeth K, Rieger R (2001) Stem cells in a basal bilaterian: S-phase and mitotic cells in *Convolutriloba longifissura* 401–408.
- Guengerich FP (2001) Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem Res Toxicol* 14:611–650. doi: 10.1021/tx0002583
- Gust M, Fortier M, Garric J, *et al.* (2013) Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Sci Total Environ* 445–446:210–218. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.12.057
- Gust M, Gagné F, Berlioz-Barbier A, *et al.* (2014) Caged mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) as an integrated field biomonitoring tool: Exposure assessment and reprotoxic effects of water column contamination. *Water Res* 54:222–236. doi: 10.1016/j.watres.2014.01.057
- Hagstrom D, Cochet-Escartin O, Collins E-MS (2016) Planarian brain regeneration as a model system for developmental neurotoxicology. *Regen Oxf Engl* 3:65–77. doi: 10.1002/reg2.52
- Hahn T, Schenk K, Schulz R (2002) Environmental chemicals with known endocrine potential affect yolk protein content in the aquatic insect *Chironomus riparius*. *Environ Pollut* 120:525–528. doi: 10.1016/S0269-7491(02)00189-6
- Halaris A, Plietz J (2007) Agmatine: Metabolic Pathway and Spectrum of Activity in Brain. *CNS Drugs* 21:885–900. doi: 10.2165/00023210-200721110-00002

- Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, *et al.* (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 36:357–393. doi: 10.1016/S0045-6535(97)00354-8
- Hameg A, Bayle F, Nuss P, *et al.* (2003) Affinity of cyamemazine, an anxiolytic antipsychotic drug, for human recombinant dopamine vs serotonin receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 65:435–440.
- Haracz JL (1982) The dopamine hypothesis: an overview of studies with schizophrenic patients. *Schizophr Bull* 8:438–469.
- Hart CE, Lauth MJ, Hunter CS, *et al.* (2016) Effect of 4-nonylphenol on the immune response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* following bacterial infection with *Vibrio campbellii*. *Fish Shellfish Immunol* 58:449–461. doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.054
- Haycraft CJ, Swoboda P, Taulman PD, *et al.* (2001) The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene Tg737 functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms. *Dev Camb Engl* 128:1493–1505.
- He P, Court MH, Greenblatt DJ, Von Moltke LL (2005) Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 77:373–387. doi: 10.1016/j.clpt.2004.11.112
- Heberer T (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett* 131:5–17. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00041-3
- Heberer T, Reddersen K, Mechlinski A (2002) From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res* 46:81–88.
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G (1994) Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371:513–515. doi: 10.1038/371513a0
- Heikkinen AE, Möykkynen TP, Korpi ER (2008) Long-lasting Modulation of Glutamatergic Transmission in VTA Dopamine Neurons after a Single Dose of Benzodiazepine Agonists. *Neuropsychopharmacology* 34:290–298. doi: 10.1038/npp.2008.89
- Henderson ST, Gao D, Christensen S, Kimble J (1997) Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 8:1751–1762.
- Henry TB, Kwon J-W, Armbrust KL, Black MC (2004) Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem* 23:2229–2233. doi: 10.1897/03-278
- Heppell SA, Denslow ND, Folmar LC, Sullivan CV (1995) Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspect* 103:9–15.
- Hermesen SAB, Pronk TE, van den Brandhof E-J, *et al.* (2013) Transcriptomic analysis in the developing zebrafish embryo after compound exposure: Individual gene expression and pathway regulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 272:161–171. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.037

- Heye K, Becker D, Lütke Eversloh C, *et al.* (2016) Effects of carbamazepine and two of its metabolites on the non-biting midge *Chironomus riparius* in a sediment full life cycle toxicity test. *Water Res* 98:19–27. doi: 10.1016/j.watres.2016.03.071
- Heynen M, Fick J, Jonsson M, *et al.* (2016) Effect of bioconcentration and trophic transfer on realized exposure to oxazepam in 2 predators, the dragonfly larvae (*Aeshna grandis*) and the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Environ Toxicol Chem* 35:930–937. doi: 10.1002/etc.3368
- Hirashima R, Michimae H, Takemoto H, *et al.* (2016) Induction of the UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 during the Perinatal Period Can Cause Neurodevelopmental Toxicity. *Mol Pharmacol* 90:265–274. doi: 10.1124/mol.116.104174
- Hong S, Candelone J-P, Patterson CC, Boutron CF (1996) History of ancient copper smelting pollution during Roman and Medieval times recording in Greenland ice. *Science* 272:246.
- Hossain MM, Zhao G, Woo M-S, *et al.* (2016) Deletion of Calponin 2 in Mouse Fibroblasts Increases Myosin II-Dependent Cell Traction Force. *Biochemistry (Mosc)* 55:6046–6055. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00856
- Hu T-H, Whang L-M, Liu P-WG, *et al.* (2012) Biological treatment of TMAH (tetra-methyl ammonium hydroxide) in a full-scale TFT-LCD wastewater treatment plant. *Bioresour Technol* 113:303–310. doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.070
- Huang D-J, Chen H-C, Wu J-P, Wang S-Y (2006) Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane. *Chemosphere* 64:11–16. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.12.017
- Huang R, Zheng Z, Wang Q, *et al.* (2015) Mantle Branch-Specific RNA Sequences of Moon Scallop *Amusium pleuronectes* to Identify Shell Color-Associated Genes. *PLOS ONE* 10:e0141390. doi: 10.1371/journal.pone.0141390
- Huang Z, Rivas B, AgoulNIK AI (2013) NOTCH1 gain of function in germ cells causes failure of spermatogenesis in male mice. *PloS One* 8:e71213. doi: 10.1371/journal.pone.0071213
- Huang Z-X, Chen Z-S, Ke C-H, *et al.* (2012) Pyrosequencing of *Haliothis diversicolor* Transcriptomes: Insights into Early Developmental Molluscan Gene Expression. *PLOS ONE* 7:e51279. doi: 10.1371/journal.pone.0051279
- Huber R, Bode W (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc Chem Res* 11:114–122. doi: 10.1021/ar50123a006
- Huerta B, Margiotta-Casaluci L, Rodríguez-Mozaz S, *et al.* (2016) Anti-anxiety drugs and fish behavior: Establishing the link between internal concentrations of oxazepam and behavioral effects. *Environ Toxicol Chem* n/a-n/a. doi: 10.1002/etc.3448
- Hursh DA, Andrews ME, Raff RA (1987) A sea urchin gene encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor. *Science* 237:1487–1490.
- Huschek G, Hansen PD, Maurer HH, *et al.* (2004) Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations. *Environ Toxicol* 19:226–240. doi: 10.1002/tox.20015

- Ibrulj S, Duricić E (2001) Genotoxicity of oxazepam-the micronucleus cytochalasin-B test. *Med Arh* 56:61–64.
- Idder S, Ley L, Mazellier P, Budzinski H (2013) Quantitative on-line preconcentration-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the determination of pharmaceutical compounds in water. *Anal Chim Acta* 805:107–115. doi: 10.1016/j.aca.2013.10.041
- Im Park J (2005) Pharmaceuticals in the environment and management approaches in Korea. □□□□□□□ 2005:1–155. (<http://webbook.me.go.kr/DLi-File/007/150647.pdf>)
- INERIS (2015) Etude prospective sur les polluants émergents dans l'eau : 80 000 données au service de la priorisation des substances. INERIS (<http://www.ineris.fr/centredoc/dp-etude-prospective-def-1435304262.pdf>)
- Irons TD, Kelly PE, Hunter DL, *et al.* (2013) Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 103:792–813. doi: 10.1016/j.pbb.2012.12.010
- Ishikawa H (1977) Comparative studies on the thermal stability of animal ribosomal RNA's V. *tentaculata* (phoronids, moss-animals and lamp-shells). *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 57:9–14. doi: 10.1016/0305-0491(77)90073-6
- Isojärvi JI, Pakarinen AJ, Myllylä VV (1988) Effects of carbamazepine therapy on serum sex hormone levels in male patients with epilepsy. *Epilepsia* 29:781–786.
- Jasinska EJ, Goss GG, Gillis PL, *et al.* (2015) Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Sci Total Environ* 530–531:140–153. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.080
- Johnson DJ, Sanderson H, Brain RA, *et al.* (2007) Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:128–139. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.03.016
- Joosse J (1984) Photoperiodicity, rhythmicity and endocrinology of reproduction in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Photoperiod Regul Insect Molluscan Horm* 204–20.
- Jordan A, Frank H (1999) Trifluoroacetate in the Environment. Evidence for Sources Other Than HFC/HCFCs. *Environ Sci Technol* 33:522–527. doi: 10.1021/es980674y
- Judge DP, Dietz HC (2005) Marfan's syndrome. *The Lancet* 366:1965–1976. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67789-6
- Juhel G, Bayen S, Goh C, *et al.* (2016) Use of a suite of biomarkers to assess the effects of carbamazepine, bisphenol A, atrazine, and their mixtures on green mussels, *Perna viridis*. *Environ Toxicol Chem* n/a-n/a. doi: 10.1002/etc.3556
- Jung HS, Craig R (2008) Ca²⁺ induced tropomyosin movement in scallop striated muscle thin filaments. *J Mol Biol* 383:512–519. doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.051
- Jurchenko OP, Kultas KN, Vulfius CA (1973a) Cholinesterase activity in ganglia of gastropoda, *Lymnaea stagnalis* and *Planorbis corneus* II. Histochemical investigation. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 45:61–68. doi: 10.1016/0300-9629(73)90008-X

- Jurchenko OP, Vulfius CA, Zeimal EV (1973b) Cholinesterase activity of ganglia of gastropoda, *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* I. Effect of anti- cholinesterase agents on giant neurone depolarization by acetylcholine and its analogues. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 45:45–60. doi: 10.1016/0300-9629(73)90007-8
- Kamei N, Swanson WJ, Glabe CG (2000) A rapidly diverging EGF protein regulates species-specific signal transduction in early sea urchin development. *Dev Biol* 225:267–276. doi: 10.1006/dbio.2000.9837
- Kaur S, Baynes A, Lockyer AE, *et al.* (2016) Steroid Androgen Exposure during Development Has No Effect on Reproductive Physiology of *Biomphalaria glabrata*. *PLoS One* 11:e0159852. doi: 10.1371/journal.pone.0159852
- Kenk R (1974a) Flatworms (Platyhelminthes: Tricladida). *Pollut Ecol Freshw Invertebr* CW Hart SLH Fuller Eds Acad Nueva York 67–80.
- Kenk R (1974b) Index of the genera and species of the freshwater triclads (Turbellaria) of the world. Smithsonian Institution Press
- Kim J-W, Ishibashi H, Yamauchi R, *et al.* (2009) Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *J Toxicol Sci* 34:227–232.
- Kim Y, Choi K, Jung J, *et al.* (2007) Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environ Int* 33:370–375. doi: 10.1016/j.envint.2006.11.017
- King S, Patel-King R (2016) Planaria as a Model System for the Analysis of Ciliary Assembly and Motility. In: Satir P, Christensen ST (eds) *Cilia*. Springer New York, pp 245–254
- King SM (2016) Axonemal Dynein Arms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a028100
- Kirkiacharian S (2010) Guide de chimie médicinale et médicaments: conception, structure, synthèse, pharmacochimie, mode d'action et activité des médicaments. Éd. Tec & Doc
- Knakievicz T (2014) Planarians as invertebrate bioindicators in freshwater environmental quality: the biomarkers approach. *Ecotoxicol Environ Contam* 9:1–12.
- Knakievicz T, Ferreira HB (2008) Evaluation of copper effects upon *Girardia tigrina* freshwater planarians based on a set of biomarkers. *Chemosphere* 71:419–428. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.004
- Koch I, Schwarz H, Beuchle D, *et al.* (2008) Drosophila ankyrin 2 is required for synaptic stability. *Neuron* 58:210–222. doi: 10.1016/j.neuron.2008.03.019
- Kochhar A, Orten DJ, Sorensen JL, *et al.* (2008) SIX1 mutation screening in 247 branchio-oto-renal syndrome families: a recurrent missense mutation associated with BOR. *Hum Mutat* 29:565. doi: 10.1002/humu.20714
- Kodirov SA (2011) The neuronal control of cardiac functions in Molluscs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 160:102–116. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.06.014

- Koene JM, Ter Maat A (2005) Sex role alternation in the simultaneously hermaphroditic pond snail *Lymnaea stagnalis* is determined by the availability of seminal fluid. *Anim Behav* 69:845–850.
- Kosonen J, Kronberg L (2009) The occurrence of antihistamines in sewage waters and in recipient rivers. *Environ Sci Pollut Res* 16:555–564. doi: 10.1007/s11356-009-0144-2
- Krug P, Morinière V, Marlin S, *et al.* (2011) Mutation screening of the EYA1, SIX1, and SIX5 genes in a large cohort of patients harboring branchio-oto-renal syndrome calls into question the pathogenic role of SIX5 mutations. *Hum Mutat* 32:183–190. doi: 10.1002/humu.21402
- Kruglov ND, Starobogatov YI (1983) A contribution to the morphology and taxonomy of European representatives of the subgenus *Peregriana* (*Lymnaea*, Gastropoda, Pulmonata). *Zool Zhurnal* 62:1462–1473.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, *et al.* (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 27:383–391. doi: 10.1038/86882
- Kümmerer K (2009a) Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75:417–434. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
- Kümmerer K (2009b) Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere* 75:435–441. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.006
- Ladurner P, Rieger R, Baguñà J (2000) Spatial Distribution and Differentiation Potential of Stem Cells in Hatchlings and Adults in the Marine *Platyhelminth macrostomum* sp.: A Bromodeoxyuridine Analysis. *Dev Biol* 226:231–241. doi: 10.1006/dbio.2000.9867
- Lahousse SA, Hoenerhoff M, Collins J, *et al.* (2011) Gene expression and mutation assessment provide clues of genetic and epigenetic mechanisms in liver tumors of oxazepam-exposed mice. *Vet Pathol* 48:875–884. doi: 10.1177/0300985810390019
- Lajeunesse A, Gagnon C, Sauvé 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. doi: 10.1021/ac800162q
- Lambie EJ, Kimble J (1991) Genetic control of cell interactions in nematode development. *Annu Rev Genet* 25:411–436. doi: 10.1146/annurev.ge.25.120191.002211
- Lamichhane K, Garcia SN, Huggett DB, *et al.* (2013) Chronic effects of carbamazepine on life-history strategies of *Ceriodaphnia dubia* in three successive generations. *Arch Environ Contam Toxicol* 64:427–438. doi: 10.1007/s00244-012-9845-5
- Lamichhane K, Garcia SN, Huggett DB, *et al.* (2014) Exposures to a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), sertraline hydrochloride, over multiple generations: changes in life history traits in *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicol Environ Saf* 101:124–130. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.11.026
- Larsson DGJ, de Pedro C, Paxeus N (2007) Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater* 148:751–755. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.07.008

- Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, *et al.* (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9235–9240.
- Lawton SP, Lim RM, Dukes JP, *et al.* (2015) Unravelling the riddle of Radix: DNA barcoding for species identification of freshwater snail intermediate hosts of zoonotic digeneans and estimating their inter-population evolutionary relationships. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 35:63–74. doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.021
- Lázaro EM, Harrath AH, Stocchino GA, *et al.* (2011) *Schmidtea mediterranea* phylogeography: an old species surviving on a few Mediterranean islands? *BMC Evol Biol* 11:274. doi: 10.1186/1471-2148-11-274
- Lee J-R (2015) Protein tyrosine phosphatase PTPRT as a regulator of synaptic formation and neuronal development. *BMB Rep* 48:249–255.
- Leem (2014) Bilan économique des Entreprises du Médicament. (<http://www.leem.org/bilan-economique-des-entreprises-du-medicament-edition-2014>)
- Lempiäinen H, Shore D (2009) Growth control and ribosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 21:855–863. doi: 10.1016/j.ceb.2009.09.002
- Lévêque C (1996) *Ecosystèmes aquatiques*. Hachette
- Levin JI, Nelson FC, Delos Santos E, *et al.* (2004) Benzodiazepine inhibitors of the MMPs and TACE. Part 2. *Bioorg Med Chem Lett* 14:4147–4151. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.06.031
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li M-H (2013a) Acute toxicity of industrial endocrine-disrupting chemicals, natural and synthetic sex hormones to the freshwater planarian, *Dugesia japonica*. *Toxicol Environ Chem* 95:984–991.
- Li M-H (2013b) Acute toxicity of 30 pharmaceutically active compounds to freshwater planarians, *Dugesia japonica*. *Toxicol Environ Chem* 95:1157–1170.
- Liem RKH (2016) Cytoskeletal Integrators: The Spectrin Superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a018259
- Lim SH, Lee JR (2009) The phosphorylation of PTPRT attenuated the synapse formation in the hippocampal neurons. In: *Journal of Neurochemistry*. Wiley-Blackwell Publishing, pp 38–38
- Linde A (1989) Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec* 224:154–166. doi: 10.1002/ar.1092240206
- Liu R, Jin J-P (2016) Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: Regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non-muscle cells. *Gene* 585:143–153. doi: 10.1016/j.gene.2016.02.040
- Loos R, Carvalho R, António DC, *et al.* (2013) EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res* 47:6475–6487. doi: 10.1016/j.watres.2013.08.024

- Lorenzi V, Choe R, Schlenk D (2016) Effects of environmental exposure to diazepam on the reproductive behavior of fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environ Toxicol* 31:561–568. doi: 10.1002/tox.22069
- Lynch M (1984) Destabilizing Hybridization, General-Purpose Genotypes and Geographic Parthenogenesis. *Q Rev Biol* 59:257–290.
- Mackinnon GL, Parker WA (1982) Benzodiazepine Withdrawal Syndrome: A Literature Review and Evaluation. *Am J Drug Alcohol Abuse* 9:19–33. doi: 10.3109/00952998209002608
- Mandrioli R, Mercolini L, Raggi MA (2010) Metabolism of benzodiazepine and non-benzodiazepine anxiolytic-hypnotic drugs: an analytical point of view. *Curr Drug Metab* 11:815–829.
- Maniati E, Bossard M, Cook N, *et al.* (2011) Crosstalk between the canonical NF- κ B and Notch signaling pathways inhibits Ppar γ expression and promotes pancreatic cancer progression in mice. *J Clin Invest* 121:4685–4699. doi: 10.1172/JCI45797
- Mankodi A, Grunseich C, Skov M, *et al.* (2015) Divalent cation-responsive myotonia and muscle paralysis in skeletal muscle sodium channelopathy. *Neuromuscul Disord* 25:908–912. doi: 10.1016/j.nmd.2015.08.007
- Mannerström M, Toimela T, Ylikomi T, Tähti H (2006) The combined use of human neural and liver cell lines and mouse hepatocytes improves the predictability of the neurotoxicity of selected drugs. *Toxicol Lett* 165:195–202. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.04.002
- Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, *et al.* (1985) Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:7202–7206.
- Mansour F, Al-Hindi M, Saad W, Salam D (2016) Environmental risk analysis and prioritization of pharmaceuticals in a developing world context. *Sci Total Environ* 557–558:31–43. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.023
- Mariette J, Escudié F, Allias N, *et al.* (2012) NG6: Integrated next generation sequencing storage and processing environment. *BMC Genomics* 13:462. doi: 10.1186/1471-2164-13-462
- Mariette J, Noirot C, Nabihoudine I, *et al.* (2014) RNAbrowse: RNA-Seq De Novo Assembly Results Browser. *PLoS ONE* 9:e96821. doi: 10.1371/journal.pone.0096821
- Martín-Díaz ML, Villena-Lincoln A, Bamber S, *et al.* (2005) An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere* 58:615–626. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.08.072
- Marty NJ, Holman CL, Abdullah N, Johnson CP (2013) The C2 Domains of Otoferlin, Dysferlin, and Myoferlin Alter the Packing of Lipid Bilayers. *Biochemistry (Mosc)* 52:5585–5592. doi: 10.1021/bi400432f
- Mason JM, Arndt KM (2004) Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications. *ChemBioChem* 5:170–176. doi: 10.1002/cbic.200300781
- Matamoros V, Arias C, Brix H, Bayona JM (2009) Preliminary screening of small-scale domestic wastewater treatment systems for removal of pharmaceutical and personal care products. *Water Res* 43:55–62. doi: 10.1016/j.watres.2008.10.005

- Matongo S, Birungi G, Moodley B, Ndungu P (2015) Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere* 134:133–140. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.093
- Matsuno K, Diederich RJ, Go MJ, *et al.* (1995) Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Dev Camb Engl* 121:2633–2644.
- Mazock GH, Das A, Base C, Dubreuil RR (2010) Transgene rescue identifies an essential function for *Drosophila* beta spectrin in the nervous system and a selective requirement for ankyrin-2-binding activity. *Mol Biol Cell* 21:2860–2868. doi: 10.1091/mbc.E10-03-0180
- Mazzitelli J-Y, Bonnafe E, Klopp C, *et al.* (2016) De novo transcriptome sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover genes and pathways affected by exposure to oxazepam. *Ecotoxicol Lond Engl*. doi: 10.1007/s10646-016-1748-1
- McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S, *et al.* (2011) HLA-A 3101 and Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions in Europeans. *N Engl J Med* 364:1134–1143. doi: 10.1056/NEJMoa1013297
- McKenna A, Hanna M, Banks E, *et al.* (2010) The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110
- Meltzer HY (1987) Biological Studies in Schizophrenia. *Schizophr Bull* 13:77–111.
- Meltzer HY, Stahl SM (1976) The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull* 2:19–76.
- Mendoza A, Aceña J, Pérez S, *et al.* (2015) Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. *Environ Res* 140:225–241. doi: 10.1016/j.envres.2015.04.003
- Mesquita SR, Guilhermino L, Guimarães L (2011) Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere* 85:967–976. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.067
- Metcalfe CD, Koenig BG, Bennie DT, *et al.* (2003) Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ Toxicol Chem* 22:2872–2880. doi: 10.1897/02-469
- Miège C, Choubert JM, Ribeiro L, *et al.* (2008) Removal efficiency of pharmaceuticals and personal care products with varying wastewater treatment processes and operating conditions – conception of a database and first results. *Water Sci Technol* 57:49–56. doi: 10.2166/wst.2008.823
- Minagh E (2008) Ecotoxicological investigations of pharmaceutical compounds on a battery of freshwater test species. Masters 45. (<http://arrow.dit.ie/cgi/viewcontent.cgi?article=1044&context=scienmas>)
- Minagh E, Hernan R, O'Rourke K, *et al.* (2009) Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:434–440. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.05.002

- Miner L a. H, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Sesack SR (2003) Ultrastructural localization of serotonin 2A receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex. *Neuroscience* 116:107–117.
- Miner LH, Schroeter S, Blakely RD, Sesack SR (2000) Ultrastructural localization of the serotonin transporter in superficial and deep layers of the rat prelimbic prefrontal cortex and its spatial relationship to dopamine terminals. *J Comp Neurol* 427:220–234.
- Minguez L, Farcy E, Ballandonne C, *et al.* (2014) Acute toxicity of 8 antidepressants: What are their modes of action? *Chemosphere* 108:314–319. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.057
- Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer L'épandage des boues de stations d'épuration urbaines et industrielles sur les sols agricoles. In: Stat. Dev. Durablegouv. <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/272/1122/lepandage-boues-stations-depuration-urbaines-sols.html>. Accessed 21 Sep 2016
- Möhler H (2002) Pathophysiological aspects of diversity in neuronal inhibition: a new benzodiazepine pharmacology. *Dialogues Clin Neurosci* 4:261–269.
- 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. doi: 10.1016/j.envint.2008.10.008
- Montiel A (2006) Les résidus de médicaments et le traitement des effluents d'hôpitaux. *Environ Risques Santé* 5:296–300.
- Moreno-González R, Rodríguez-Mozaz S, Huerta B, *et al.* (2016) Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? *Environ Res* 146:282–298. doi: 10.1016/j.envres.2016.01.001
- Morgan TH (1898) Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Roux's Arch Dev Biol* 7:364–397. doi: 10.1007/BF02161491
- Morlière P, Haigle J, Aissani K, *et al.* (2004) An insight into the mechanisms of the phototoxic response induced by cyamemazine in cultured fibroblasts and keratinocytes. *Photochem Photobiol* 79:163–171.
- Mosrati MA, Hammami B, Rebeh IB, *et al.* (2011) A novel dominant mutation in SIX1, affecting a highly conserved residue, result in only auditory defects in humans. *Eur J Med Genet* 54:e484-488. doi: 10.1016/j.ejmg.2011.06.001
- Mouthon J (2001) Mollusques dulcicoles et pollutions biodégradables des cours d'eau: échelle de sensibilité des espèces, genres et familles. *Ingénieries-EAT* 3–15.
- Mu X, LeBlanc GA (2002) Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity. *Gen Comp Endocrinol* 129:127–133. doi: 10.1016/S0016-6480(02)00518-X
- Murabe M, Yamauchi J, Fujiwara Y, *et al.* (2007) Estimation of the embryotoxic effect of CBZ using an ES cell differentiation system. *Biochem Biophys Res Commun* 356:739–744. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.063

- Muttray AF, Schulte PM, Baldwin SA (2008) Invertebrate p53-like mRNA isoforms are differentially expressed in mussel haemic neoplasia. *Mar Environ Res* 66:412–421. doi: 10.1016/j.marenvres.2008.06.004
- Nano GM, Binello A, Bianco MA, *et al.* (2002) In vitro tests to evaluate potential biological activity in natural substances. *Fitoterapia* 73:140–146. doi: 10.1016/S0367-326X(02)00014-X
- Nassef M, Kim SG, Seki M, *et al.* (2010a) In ovo nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 79:966–973. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.02.002
- Nassef M, Matsumoto S, Seki M, *et al.* (2010b) Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 80:1095–1100. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.073
- Nelson FC, Delos Santos E, Levin JI, *et al.* (2002) Benzodiazepine inhibitors of the MMPs and TACE. *Bioorg Med Chem Lett* 12:2867–2870.
- Nentwig G (2007) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine. *Arch Environ Contam Toxicol* 52:163–170. doi: 10.1007/s00244-005-7190-7
- Newmark PA, Sánchez Alvarado A (2002) Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat Rev Genet* 3:210–219. doi: 10.1038/nrg759
- Newmark PA, Sánchez Alvarado A (2000) Bromodeoxyuridine Specifically Labels the Regenerative Stem Cells of Planarians. *Dev Biol* 220:142–153. doi: 10.1006/dbio.2000.9645
- Nishimura K, Kitamura Y, Umesono Y, *et al.* (2008) Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience* 153:1103–1114. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.026
- Nriagu JO (1983) Occupational exposure to lead in ancient times. *Sci Total Environ* 31:105–116.
- Obach RS, Cox LM, Tremaine LM (2005) Sertraline Is Metabolized by Multiple Cytochrome P450 Enzymes, Monoamine Oxidases, and Glucuronyl Transferases in Human: An in Vitro Study. *Drug Metab Dispos* 33:262–270. doi: 10.1124/dmd.104.002428
- Ofoegbu PU, Simão FCP, Cruz A, *et al.* (2016) Toxicity of tributyltin (TBT) to the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. *Chemosphere* 148:61–67. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.131
- Oliveira M, Cardoso DN, Soares AMVM, Loureiro S (2015) Effects of short-term exposure to fluoxetine and carbamazepine to the collembolan *Folsomia candida*. *Chemosphere* 120:86–91. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.06.038
- Oropesa AL, Floro AM, Palma P (2016) Assessment of the effects of the carbamazepine on the endogenous endocrine system of *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res* 23:17311–17321. doi: 10.1007/s11356-016-6907-7
- Ou G, Koga M, Blacque OE, *et al.* (2007) Sensory Ciliogenesis in *Caenorhabditis elegans*: Assignment of IFT Components into Distinct Modules Based on Transport and Phenotypic Profiles. *Mol Biol Cell* 18:1554–1569. doi: 10.1091/mbc.E06-09-0805

- Pande GS (2010) Observations on the embryonic development of freshwater pulmonate snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck, 1822) (gastropoda: mollusca). *The Bioscan* 5:549–554.
- Pande GS, Patil MU, Sherkhane U (2010) Observations on the embryonic development of freshwater pulmonate snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck, 1822)(Gastropoda: Mollusca). *Bioscan* 5:549–554.
- Peck JR, Jonathan Y, Barreau G (1999) The maintenance of sexual reproduction in a structured population. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 266:1857–1863.
- Perkins LA, Hedgecock EM, Thomson JN, Culotti JG (1986) Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 117:456–487.
- Pertea G, Huang X, Liang F, *et al.* (2003) TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* 19:651–652. doi: 10.1093/bioinformatics/btg034
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, *et al.* (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282:1281–1284.
- Pfenninger M, Cordellier M, Streit B (2006) Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). *BMC Evol Biol* 6:100. doi: 10.1186/1471-2148-6-100
- Phillips PJ, Smith SG, Kolpin DW, *et al.* (2010) Pharmaceutical Formulation Facilities as Sources of Opioids and Other Pharmaceuticals to Wastewater Treatment Plant Effluents. *Environ Sci Technol* 44:4910–4916. doi: 10.1021/es100356f
- Pickett CB, Lu AY (1989) Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem* 58:743–764. doi: 10.1146/annurev.bi.58.070189.003523
- Piha-Gossack A, Sossin W, Reinhardt DP (2012) The Evolution of Extracellular Fibrillins and Their Functional Domains. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0033560
- Poi CD, Evariste L, Serpentine A, *et al.* (2013) Toxicity of five antidepressant drugs on embryo–larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ Sci Pollut Res* 21:13302–13314. doi: 10.1007/s11356-013-2211-y
- Polese G, Winlow W, Di Cosmo A (2014) Dose-dependent effects of the clinical anesthetic isoflurane on *Octopus vulgaris*: a contribution to cephalopod welfare. *J Aquat Anim Health* 26:285–294. doi: 10.1080/08997659.2014.945047
- Pongratz N, Storhas M, Carranza S, Michiels NK (2003) Phylogeography of competing sexual and parthenogenetic forms of a freshwater flatworm: patterns and explanations. *BMC Evol Biol* 3:23. doi: 10.1186/1471-2148-3-23
- Prohaska JR (1980) The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta* 611:87–98.
- Puder M, Barnard GF, Staniunas RJ, *et al.* (1993) Nucleotide and deduced amino acid sequence of human ribosomal protein L18. *Biochim Biophys Acta* 1216:134–136.

- Queyrel V, Catteau B, Michon-Pasturel U, *et al.* (2001) DRESS (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms) syndrome after sulfasalazine and carbamazepine: report of two cases. *Rev Médecine Interne Fondée Par Société Natl Française Médecine Interne* 22:582–586.
- Quintana JB, Weiss S, Reemtsma T (2005) Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res* 39:2654–2664. doi: 10.1016/j.watres.2005.04.068
- Raffa RB, Holland LJ, Schulinkamp RJ (2001) Quantitative assessment of dopamine D2 antagonist activity using invertebrate (*Planaria*) locomotion as a functional endpoint. *J Pharmacol Toxicol Methods* 45:223–226.
- Raffa RB, Cavallo F, Capasso A (2007) Flumazenil-sensitive dose-related physical dependence in planarians produced by two benzodiazepine and one non-benzodiazepine benzodiazepine-receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 564:88–93. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.02.006
- R L Macdonald, Olsen and RW (1994) GABAA Receptor Channels. *Annu Rev Neurosci* 17:569–602. doi: 10.1146/annurev.ne.17.030194.003033
- Ramakrishnan L, DeSaer C (2011) Carbamazepine inhibits distinct chemoconvulsant-induced seizure-like activity in *Dugesia tigrina*. *Pharmacol Biochem Behav* 99:665–670. doi: 10.1016/j.pbb.2011.06.003
- Ramirez F, Carta L, Lee-Arteaga S, *et al.* (2008) Fibrillin-Rich Microfibrils—Structural and Instructive Determinants of Mammalian Development and Physiology. *Connect Tissue Res* 49:1–6. doi: 10.1080/03008200701820708
- Reátegui-Zirena EG, Fidler BN, Salice CJ (2016) A cost or a benefit ? Counterintuitive effects of diet quality and cadmium in *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology* 25:1771–1781. doi: 10.1007/s10646-016-1720-0
- Reis DJ, Regunathan S (2000) Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* 21:187–193. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01460-7
- Remigio E (2002) Molecular phylogenetic relationships in the aquatic snail genus *Lymnaea*, the intermediate host of the causative agent of fascioliasis: insights from broader taxon sampling. *Parasitol Res* 88:687–696. doi: 10.1007/s00436-002-0658-8
- Reynoldson TB (1966) The Distribution and Abundance of Lake-Dwelling Triclad — towards a Hypothesis. In: Cragg JB (ed) *Advances in Ecological Research*. Academic Press, pp 1–71
- Rho SB, Kim B-R, Kang S (2011) A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 120:121–127. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.10.003
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet TIG* 16:276–277.
- Richards SM, Cole SE (2006) A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology* 15:647–656. doi: 10.1007/s10646-006-0102-4

- Richetto J, Labouesse MA, Poe MM, *et al.* (2015) Behavioral Effects of the Benzodiazepine-Positive Allosteric Modulator SH-053-2'-F-S-CH₃ in an Immune-Mediated Neurodevelopmental Disruption Model. *Int J Neuropsychopharmacol* 18:pyu055-pyu055. doi: 10.1093/ijnp/pyu055
- Rink JC (2013) Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev Genes Evol* 223:67–84. doi: 10.1007/s00427-012-0426-4
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, *et al.* (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43:e47–e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
- Riva F, Zuccato E, Castiglioni S (2015) Prioritization and analysis of pharmaceuticals for human use contaminating the aquatic ecosystem in Italy. *J Pharm Biomed Anal* 106:71–78.
- Rivetti C, Campos B, Barata C (2016) Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol Amst Neth* 170:289–296. doi: 10.1016/j.aquatox.2015.07.019
- Rivollet B, Serre CE (2013) Les polluants émergents.
(http://www.captiven.fr/sites/default/files/pictures/Note%20de%20veille_Nouveaux%20Polluants%20C3%A9mergents%20-%20Tech2Market_VFfinal-3IC-ok.pdf)
- Roberts-Galbraith RH, Brubacher JL, Newmark PA (2016) A functional genomics screen in planarians reveals regulators of whole-brain regeneration. *eLife*. doi: 10.7554/eLife.17002
- Rodríguez-Esteban G, González-Sastre A, Rojo-Laguna JI, *et al.* (2015) Digital gene expression approach over multiple RNA-Seq data sets to detect neoblast transcriptional changes in *Schmidtea mediterranea*. *BMC Genomics* 16:361. doi: 10.1186/s12864-015-1533-1
- Roig B (2010) Pharmaceuticals in the Environment. IWA Publishing
- Rola RC, Monteiro M da C, Reis SR da S, Sandrini JZ (2012) Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. *Mar Pollut Bull* 64:766–771. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.01.004
- Rompolas P, Mesa KR, Greco V (2013) Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate. *Nature* 502:513–518. doi: 10.1038/nature12602
- Rudnick G (2006) Serotonin transporters structure and function. *J Membr Biol* 213:101–110. doi: 10.1007/s00232-006-0878-4
- Ruf RG, Xu P-X, Silvius D, *et al.* (2004) SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8090–8095. doi: 10.1073/pnas.0308475101
- Sakai LY, Keene DR, Engvall E (1986) Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103:2499–2509. doi: 10.1083/jcb.103.6.2499
- Salveti A, Lena A, Rossi L, *et al.* (2002) Characterization of DeY1, a novel Y-box gene specifically expressed in differentiating male germ cells of planarians. *Gene Expr Patterns GEP* 2:195–200.

- Sanchez W (2007) Approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*): un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux. Phdthesis, Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS
- Sanchez W, Sremski W, Piccini B, *et al.* (2011) Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environ Int* 37:1342–1348. doi: 10.1016/j.envint.2011.06.002
- Sanders MB, Billingham Z, Depledge MH, Clare AS (2005) Larval Development and Vitellin-like Protein Expression in *Palaemon elegans* Larvae Following Xeno-oestrogen Exposure. *Integr Comp Biol* 45:51–60. doi: 10.1093/icb/45.1.51
- Santos JL, Aparicio I, Callejón M, Alonso E (2009) Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J Hazard Mater* 164:1509–1516. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.09.073
- Sarker MM, Nesa B, Jahan MS (2007) Embryonic developmental ecology of freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lymnaeidae: Gastropoda). *Pak J Biol Sci PJBS* 10:23–31.
- Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* 32:380–387. doi: 10.1016/j.it.2011.05.005
- Scheltema AH, Kerth K, Kuzirian AM (2003) Original molluscan radula: Comparisons among Aplacophora, Polyplacophora, Gastropoda, and the Cambrian fossil *Wiwaxia corrugata*. *J Morphol* 257:219–245. doi: 10.1002/jmor.10121
- Schniebs K, Glöer P, Vinarski MV, Hundsdoerfer AK (2011) Intraspecific morphological and genetic variability in *Radix balthica* (Linnaeus 1758)(Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae) with morphological comparison to other European *Radix* species. *J Conchol* 40:657.
- Schniebs K, Glöer P, Vinarski MV, Hundsdoerfer AK (2013) Intraspecific morphological and genetic variability in the European freshwater snail *Radix labiata* (Rossmaessler, 1835)(Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae).
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, *et al.* (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7:3. doi: 10.1186/1471-2199-7-3
- Schroeter S, Apparsundaram S, Wiley RG, *et al.* (2000) Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive I-norepinephrine transporter. *J Comp Neurol* 420:211–232. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(20000501)420:2<211::AID-CNE5>3.0.CO;2-3
- Schultz MM, Furlong ET (2008) Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Anal Chem* 80:1756–1762. doi: 10.1021/ac702154e
- Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M, Birney E (2012) Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics* 28:1086–1092. doi: 10.1093/bioinformatics/bts094
- Schunter C, Vollmer SV, Macpherson E, Pascual M (2014) Transcriptome analyses and differential gene expression in a non-model fish species with alternative mating tactics. *BMC Genomics* 15:167. doi: 10.1186/1471-2164-15-167

- Schürmann W, Peter R (1998) Inhibition of regeneration in the planarian *Dugesia polychroa* (Schmidt) by treatment with magnesium chloride: a morphological study of wound closure. *Hydrobiologia* 383:111–116. doi: 10.1023/A:1003475324285
- Schweisguth F (2000) Fonctions et régulation de l'activité de signalisation du récepteur Notch. *médecine/sciences* 16:186. doi: 10.4267/10608/1620
- Schweizer E, Rickels K, Case WG, Greenblatt DJ (1991) Carbamazepine treatment in patients discontinuing long-term benzodiazepine therapy. Effects on withdrawal severity and outcome. *Arch Gen Psychiatry* 48:448–452.
- Seddon MB, Kebapçı U, Van Damme D, Prie V (2013) *Radix balthica*. In: IUCN Red List Threat. Species. <http://www.iucnredlist.org/details/155647/0>. Accessed 11 Jun 2015
- Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261:717–719.
- Şentürk M, Alici HA, Beydemir Ş, Küfrevioğlu Öİ (2012) In vitro and in vivo effects of some benzodiazepine drugs on human and rabbit erythrocyte carbonic anhydrase enzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem* 27:680–684. doi: 10.3109/14756366.2011.607447
- Serrano PH (2005) Responsible use of antibiotics in aquaculture. Food & Agriculture Org.
- Shane BS, deBoer JG, Glickman BW, Cunningham ML (1999) Oxazepam is mutagenic in vivo in Big Blue transgenic mice. *Carcinogenesis* 20:1315–1321.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360:1–16.
- Shon HK, Vigneswaran S, Snyder SA (2006) Effluent Organic Matter (EfOM) in Wastewater: Constituents, Effects, and Treatment. *Crit Rev Environ Sci Technol* 36:327–374. doi: 10.1080/10643380600580011
- Silva LJG, Lino CM, Meisel LM, Pena A (2012) Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach. *Sci Total Environ* 437:185–195. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.08.021
- Snyder SA (2008) Occurrence, Treatment, and Toxicological Relevance of EDCs and Pharmaceuticals in Water. *Ozone Sci Eng* 30:65–69. doi: 10.1080/01919510701799278
- Strong MJ, Xu G, Morici L, *et al.* (2014) Microbial Contamination in Next Generation Sequencing: Implications for Sequence-Based Analysis of Clinical Samples. *PLoS Pathog.* doi: 10.1371/journal.ppat.1004437
- Stroud RM, Kossiakoff AA, Chambers JL (1977) Mechanisms of Zymogen Activation. *Annu Rev Biophys Bioeng* 6:177–193. doi: 10.1146/annurev.bb.06.060177.001141
- Styrishave B, Halling-Sørensen B, Ingerslev F (2011) Environmental risk assessment of three selective serotonin reuptake inhibitors in the aquatic environment: A case study including a cocktail scenario. *Environ Toxicol Chem* 30:254–261. doi: 10.1002/etc.372

- Subedi B, Balakrishna K, Joshua DI, Kannan K (2017) Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products including psychoactives, antihypertensives, and antibiotics in two sewage treatment plants in southern India. *Chemosphere* 167:429–437. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.026
- Subramoniam T (2000) Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 125:135–156. doi: 10.1016/S0742-8413(99)00098-5
- Sullivan KG, Levin M (2016) Neurotransmitter signaling pathways required for normal development in *Xenopus laevis* embryos: a pharmacological survey screen. *J Anat* 229:483–502. doi: 10.1111/joa.12467
- Suyemitsu T, Asami-Yoshizumi T, Noguchi S, *et al.* (1989) The exogastrula-inducing peptides in embryos of the sea urchin, *Anthocardis crassispina* isolation and determination of the primary structure. *Cell Differ Dev* 26:53–66. doi: 10.1016/0922-3371(89)90783-1
- Takeda K, Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7:1099–1111. doi: 10.1046/j.1365-2443.2002.00591.x
- Tamtam F, Mercier F, Le Bot B, *et al.* (2008) Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Sci Total Environ* 393:84–95. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.12.009
- Thacker PD (2005) Pharmaceutical data elude researchers. *Environ Sci Technol* 39:193A–194A.
- Theunissen PT, Robinson JF, Pennings JLA, *et al.* (2012) Compound-specific effects of diverse neurodevelopmental toxicants on global gene expression in the neural embryonic stem cell test (ESTn). *Toxicol Appl Pharmacol* 262:330–340. doi: 10.1016/j.taap.2012.05.011
- Tills O, Rundle SD, Spicer JI (2013) offspring similarity in the timing of developmental- Parent.
- Togola A, Budzinski H (2007) Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC–MS. *Anal Bioanal Chem* 388:627–635. doi: 10.1007/s00216-007-1251-x
- Toral-Ojeda I, Aldanondo G, Lasa-Elgarresta J, *et al.* (2016) Calpain 3 deficiency affects SERCA expression and function in the skeletal muscle. *Expert Rev Mol Med* 18:e7. doi: 10.1017/erm.2016.9
- Townsend DM, Tew KD (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22:7369–7375. doi: 10.1038/sj.onc.1206940
- Uechi T, Nakajima Y, Nakao A, *et al.* (2006) Ribosomal protein gene knockdown causes developmental defects in zebrafish. *PloS One* 1:e37. doi: 10.1371/journal.pone.0000037
- Uno J, Obara K, Suzuki H, *et al.* (2016) Inhibitory Effects of Antidepressants on Acetylcholine-Induced Contractions in Isolated Guinea Pig Urinary Bladder Smooth Muscle. *Pharmacology* 99:89–98. doi: 10.1159/000452221
- Usui T, Saitoh Y, Komada F (2003) Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs. Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor. *Biol Pharm Bull* 26:510–517.

- van den Brandhof E-J, Montforts M (2010) Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1862–1866. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.08.031
- van der Hoeven N (2004) Current issues in statistics and models for ecotoxicological risk assessment. *Acta Biotheor* 52:201–217. doi: 10.1023/B:ACBI.0000043442.05899.8c
- van Kesteren RE, Gagatsek JS, Hagendorf A, *et al.* (2008) Postsynaptic expression of an epidermal growth factor receptor regulates cholinergic synapse formation between identified molluscan neurons. *Eur J Neurosci* 27:2043–2056. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06189.x
- Van Wemmel K, Gobbers E, Eichenlaub-Ritter U, *et al.* (2005) Ovarian follicle bioassay reveals adverse effects of diazepam exposure upon follicle development and oocyte quality. *Reprod Toxicol Elmsford N* 20:183–193. doi: 10.1016/j.reprotox.2005.01.009
- Vasskog T, Anderssen T, Pedersen-Bjergaard S, *et al.* (2008) Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *J Chromatogr A* 1185:194–205. doi: 10.1016/j.chroma.2008.01.063
- Vernouillet G, Eullaffroy P, Lajeunesse A, *et al.* (2010) Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere* 80:1062–1068. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.010
- Vidal-Liñán L, Bellas J, Soriano JA, *et al.* (2016) Bioaccumulation of PCB-153 and effects on molecular biomarkers acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase in *Mytilus galloprovincialis* mussels. *Environ Pollut* 214:885–891. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.083
- Volz DC, Chandler GT (2004) An enzyme-linked immunosorbent assay for lipovitellin quantification in copepods: a screening tool for endocrine toxicity. *Environ Toxicol Chem* 23:298–305.
- Vowels JJ, Thomas JH (1992) Genetic Analysis of Chemosensory Control of Dauer Formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 130:105–123.
- Wagner SD, Kurobe T, Hammock BG, *et al.* (2017) Developmental effects of fipronil on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Chemosphere* 166:511–520. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.069
- Wahlberg C, Björleinius B, Paxéus N (2011) Fluxes of 13 selected pharmaceuticals in the water cycle of Stockholm, Sweden. *Water Sci Technol* 63:1772–1780. doi: 10.2166/wst.2011.124
- Wang X, Ying W, Dunlap KA, *et al.* (2014) Arginine Decarboxylase and Agmatinase: An Alternative Pathway for De Novo Biosynthesis of Polyamines for Development of Mammalian Conceptuses. *Biol Reprod* 90:84–84. doi: 10.1095/biolreprod.113.114637
- Wang Y, Stary JM, Wilhelm JE, Newmark PA (2010) A functional genomic screen in planarians identifies novel regulators of germ cell development. *Genes Dev* 24:2081–2092. doi: 10.1101/gad.1951010
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57–63. doi: 10.1038/nrg2484
- Wayne NL (2001) Regulation of Seasonal Reproduction in Mollusks. *J Biol Rhythms* 16:391–402. doi: 10.1177/074873001129002097

- Weinberger J, Klapar R (2014) Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquat Toxicol Amst Neth* 151:77–83. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.10.012
- Weinmaster G (1997) The Ins and Outs of Notch Signaling. *Mol Cell Neurosci* 9:91–102. doi: 10.1006/mcne.1997.0612
- Weinmaster G (1998) Notch signaling: direct or what? *Curr Opin Genet Dev* 8:436–442. doi: 10.1016/S0959-437X(98)80115-9
- Weinmaster G (2000) Notch signal transduction: a real Rip and more. *Curr Opin Genet Dev* 10:363–369. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00097-6
- Weinmaster G, Roberts V, Lemke G (1992) Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116:931–941.
- Weinzierl RP, Schmidt P, Michiels NK (1999) High Fecundity and Low Fertility in Parthenogenetic Planarians. *Invertebr Biol* 118:87–94. doi: 10.2307/3227051
- Weston NB, Neubauer SC, Velinsky DJ, Vile MA (2014) Net ecosystem carbon exchange and the greenhouse gas balance of tidal marshes along an estuarine salinity gradient. *Biogeochemistry* 120:163–189. doi: 10.1007/s10533-014-9989-7
- Whitehead DL, Sellheyer K (1982) The identification of ecdysterone (20-hydroxyecdysone) in 3 species of molluscs (Gastropoda: Pulmonata). *Experientia* 38:1249–1251.
- Winnebeck EC, Millar CD, Warman GR (2010) Why Does Insect RNA Look Degraded? *J Insect Sci* 10:1–7. doi: 10.1673/031.010.14119
- Witherspoon JW, Meilleur KG (2016) Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. *Acta Neuropathol Commun* 4:121. doi: 10.1186/s40478-016-0392-6
- Xie Z, Lu G, Li S, *et al.* (2015) Behavioral and biochemical responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to sertraline. *Chemosphere* 135:146–155. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.031
- Yamaori S, Yamazaki H, Iwano S, *et al.* (2004) CYP3A5 Contributes significantly to CYP3A-mediated drug oxidations in liver microsomes from Japanese subjects. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:120–129.
- Yang Q, Angerer LM, Angerer RC (1989) Unusual pattern of accumulation of mRNA encoding EGF-related protein in sea urchin embryos. *Science* 246:806–808. doi: 10.1126/science.2814501
- Yang RT, Lim GL, Dong Z, *et al.* (2013) The efficiency of dentin sialoprotein-phosphophoryn processing is affected by mutations both flanking and distant from the cleavage site. *J Biol Chem* 288:6024–6033. doi: 10.1074/jbc.M112.382952
- Yano I, Hoshino R (2006) Effects of 17 β -estradiol on the vitellogenin synthesis and oocyte development in the ovary of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144:18–23. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.01.026

- Yao M, Dai M, Liu Z, *et al.* (2011) Comparison of the substrate kinetics of pig CYP3A29 with pig liver microsomes and human CYP3A4. *Biosci Rep* 31:211–220. doi: 10.1042/BSR20100084
- Ye J, Fang L, Zheng H, *et al.* (2006) WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Res* 34:W293–297. doi: 10.1093/nar/gkl031
- Yeh J-H, Sun T-K, Chou C-T, *et al.* (2015) Effect of sertraline on Ca^{2+} fluxes in rabbit corneal epithelial cells. *Chin J Physiol* 58:85–94. doi: 10.4077/CJP.2015.BAC255
- Yuan S, Jiang X, Xia X, *et al.* (2013) Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* 90:2520–2525. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.089
- Zaharieva IT, Thor MG, Oates EC, *et al.* (2016) Loss-of-function mutations in SCN4A cause severe foetal hypokinesia or “classical” congenital myopathy. *Brain J Neurol* 139:674–691. doi: 10.1093/brain/awv352
- Zayas RM, Cebrià F, Guo T, *et al.* (2010) The use of lectins as markers for differentiated secretory cells in planarians. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat* 239:2888–2897. doi: 10.1002/dvdy.22427
- Zenker A, Cicero MR, Prestinaci F, *et al.* (2014) Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J Environ Manage* 133:378–387. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.12.017
- Zhang H, Hu W, Ramirez F (1995) Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 129:1165–1176. doi: 10.1083/jcb.129.4.1165
- Zhang W, Zhang M, Lin K, *et al.* (2012) Eco-toxicological effect of carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ Toxicol Pharmacol* 33:344–352. doi: 10.1016/j.etap.2011.12.024
- Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T (2004) Fipronil Is a Potent Open Channel Blocker of Glutamate-Activated Chloride Channels in Cockroach Neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 310:192–201. doi: 10.1124/jpet.104.065516
- Zheng XL, Kitamoto Y, Sadler JE (2009) Enteropeptidase, a type II transmembrane serine protease. *Front Biosci Elite Ed* 1:242–249.
- Zorita S, Mårtensson L, Mathiasson L (2009) Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci Total Environ* 407:2760–2770. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.12.030

ANNEXES

Annexe 1 :

Annexe 1 : Occurrence des médicaments dans les différents compartiments

Molécules (CAS)	Entrée de STEP (µg/L)	Sortie de STEP (µg/L)	Eau de surface (µg/L)	Références
Analgésiques				
Acide acétyl salicilique (50-78-2)	3.2 to 5.0	0.212 to 1.510	0.037 to .0340	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment; Ternes <i>et al.</i> , 1999
Codéine (76-57-3)	0.17 to 11.00	0.17 to 8.10	0.019 to 0.094	Roig et European Comission 2010 Pharmaceuticals in the environment
Diclofénac (15307-86-5)	0.251 à 28.000	0.028 à 1.844	0.007 à 1.800	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment; Roberts <i>et al.</i> , 2006; Heberer, 2002; Quintana <i>et al.</i> , 2005; Roberts et Thomas, 2005
Diméthylaminophénazone (58-15-1)	0.9600	0.0130	0.3400	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Fénoprofen (31879-05-7)	ND	0.217 to 0.938	0.0220	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Hydrocodone (125-28-1)	0.070	0.012 to 0.033	0.002 to 4.150	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Ibuprofène (15687-27-1)	0.58 à 168.00	0.012 to 1.849	0.038 à 6.400	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment ; Budzinski et Togola, 2006 ; Roberts <i>et al.</i> , 2006 ; Metcalfe <i>et al.</i> , 1999 ; Quintana <i>et al.</i> , 2005
Indométhacine (53-86-1)	0.640 à 0.950	0.012 à 0.141	0.002 à 0.22	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment

Annexe 1 : suite

Kétoprofène (22071-15-4)	0.190 à 10.800	0.002 à 0.445	0.012 à 0.144	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment ; Budzinski et Togola, 2006 ; Quintana <i>et al.</i> , 2005
Acide Méclofénamique (644-62-2)	ND	0.0840	0.1150	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Méfénamique acide (61-68-7)	0.005 à 3.200	0.007 à 2.300	0.003 à 0.242	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment ; Tauxe-Wuersch <i>et al.</i> , 2005
Naproxène (22204 -53-1)	0.190 à 611.000	0.043 à 2.616	0.018 à 4.500	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment ; Budzinski et Togola, 2006
Paracétamol (103-90-2)	0.260 à 246.000	0.041 à 5.704	0.002 à 1.388	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Phénazone (60-80-0)	0.4500	0.0880	0.035 à 2.500	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Propyphénazone (479-92-5)	0.250 à 0.850	0.450 à 0.990	0.059 à 0.880	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Antiépileptiques				
Carbamazépine (298-46-4)	0.274 à 9.420	0.119 à 2.013	0.043 à 2.500	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment ; Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014 ; Budzinski et Togola, 2006 ; Metcalfe <i>et al.</i> , 2003 ; Golovko, 2014
Phénytoïne (57-41-0)	0.4020	0.036 à 0.287	0.009 à 0.088	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Gabapentine (60142-96-3)	ND	ND	0.098	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment

Annexe 1 : suite				
Pentobarbital (76-74-4)	ND	ND	5.400	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Phenobarbital (50-06-6)	ND	ND	1.500	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Anxiolytiques				
Alprazolam (28981-97-7)	ND	ND	0.002	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Bromazépam (1812-30-2)	ND	ND	0.134	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Diazépam (439-14-5)	0.099 à 5.000	0.004 à 0.660	0.0007 à 0.034	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment ; Van Der Hoeven, 2004 ; Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014 ;
Lorazépam (846-49-1)	0.221 to 0.909	0.4310	0.015	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment ; Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014
Méprobamate (57-53-4)	1.4400	0.006 à 1.270	0.3060	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Nordazépam (1088-11-5)	ND	0.008	0.002	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment
Oxazépam (604-75-1)	0.077 à 3.893	0.094 à 7.044	0.154 à 0.814	Roig et European Comission 2010, Pharmaceuticals in the environment ; Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014 ; Golovko, 2014
Hydroxyzine (68-88-2)	0.105	0.021	0.0100	Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014 ; Kosonen et Kronberg, 2009

Annexe 1 : suite

Antidépresseurs

Sertraline (79617-96-2)	0.008 à 0.115	0.005 à 0.015	ND	Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014 ; Vasskog <i>et al.</i> , 2006 ; Lajeunesse <i>et al.</i> , 2008 ; Golovko, 2014
Venlafaxine (93413-69-5)	0.213 à 0.800	0.214 à 2.190	0.045 à 1.310	Lajeunesse <i>et al.</i> , 2008 ; Schultz and Furlong, 2008 ; Golovko, 2014
Fluoxétine (54910-89-3)	0.074	0.016 à 0.540	0.3200	Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014 ; Chen <i>et al.</i> , 2006 ; Weston <i>et al.</i> , 2001
Citalopram (59729-33-8)	0.052 à 0.488	0.057 à 10.300	0.001 à 0.011	Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014 ; Lajeunesse <i>et al.</i> , 2008 ; Schultz <i>et al.</i> , 2010 ; Styrishe <i>et al.</i> , 2011 ; Golovko, 2014

Neuroleptiques

Cyamémazine (3546-03-0)	2.9020	0.323	0.001	Projet psycheau n° EST-2010/2/050, 2014
Clozapine (5786-21-0)	8.950	14.430	78.330	Matongo <i>et al.</i> , 2015

ND : Non Disponibles

Annexe 2 :

Author's personal copy

Ecotoxicology
DOI 10.1007/s10646-016-1748-1



De novo transcriptome sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover genes and pathways affected by exposure to oxazepam

Jean-Yves Mazzitelli¹ · Elsa Bonnafé¹ · Christophe Klopp² · Frédéric Escudier² · Florence Geret¹

Accepted: 16 November 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Pharmaceuticals are increasingly found in aquatic ecosystems due to the non-efficiency of waste water treatment plants. Therefore, aquatic organisms are frequently exposed to a broad diversity of pharmaceuticals. Freshwater snail *Radix balthica* has been chosen as model to study the effects of oxazepam (psychotropic drug) on developmental stages ranging from trochophore to hatching. In order to provide a global insight of these effects, a transcriptome deep sequencing has been performed on exposed embryos. Eighteen libraries were sequenced, six libraries for three conditions: control, exposed to the lowest oxazepam concentration with a phenotypic effect (delayed hatching) (TA) and exposed to oxazepam concentration found in freshwater (TB). A total of 39,759,772 filtered raw reads were assembled into 56,435 contigs having a mean length of 1579.68 bp and mean depth of 378.96 reads. 44.91% of the contigs have at least one annotation. The differential expression analysis between the control condition and the two exposure conditions revealed 146 contigs differentially expressed of which 144 for TA and two for TB. 34.0% were annotated with biological function. There were four mainly impacted processes: two cellular signalling systems (Notch and JNK) and two biosynthesis pathways (Polyamine and

Catecholamine pathways). This work reports a large-scale analysis of differentially transcribed genes of *R. balthica* exposed to oxazepam during egg development until hatching. In addition, these results enriched the *de novo* database of potential ecotoxicological models.

Keywords Ecotoxicology · RNA sequencing · Pharmaceutical · Differential analysis · *Radix balthica*

Introduction

Aquatic organisms are frequently exposed to a great diversity of chemicals suspended in water or adsorbed onto substrates. Among these compounds, pharmaceuticals are a class of emerging environmental contaminants increasingly found in aquatic ecosystems. These pollutants are released in the environment mainly via Waste Water Treatment Plant (WWTP) effluents. Several studies have demonstrated that pharmaceuticals are not completely removed by WWTP, their elimination being dependent on the specific treatment methods used (Calisto and Esteves 2009; Yuan et al. 2013) but also on their abundance in the waste water, their pharmacokinetics, and their physical and chemical properties (Loos et al. 2013; Chen et al. 2015). Among pharmaceuticals, psychiatric drugs are the most frequently detected in aquatic environments (Fong and Ford 2014). Among the molecules, anxiolytics are a frequently prescribed class in which benzodiazepines such as oxazepam and carbamazepine are the most commonly used (Brodin et al. 2013). They are frequently detected in WWTP effluents and surface water. As an example, they have been found in 27 to 100% of French freshwaters (Ilder et al. 2013; Bouissou-Schurtz

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10646-016-1748-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jean-Yves Mazzitelli
jyves.maz@gmail.com

¹ Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives (BTSB), EA7417, Université de Toulouse, INU Champollion, Albi, France

² Unité de Mathématique et Informatique Appliquées de Toulouse, UR0875, INRA Toulouse, Castanet-Tolosan, France

Published online: 15 December 2016

Springer

et al. 2014) and their concentrations are ranged from 161 ng.L⁻¹ (Bouissou-Schurtz et al. 2014) to 816 ng.L⁻¹ (Chiffre et al. 2016). The presence of these compounds may have a short and/or long term (depending on the compounds release and persistence characteristics) impact on freshwater biodiversity (Sanchez et al. 2011).

In studies on aquatic ecosystems, molluscs, including snails, are commonly used to evaluate pollutant effects (Cheung and Lam 1998; Coeurdassier et al. 2003; Byrne et al. 2009; Das and Khangarot 2010; Coutellec et al. 2013). Our study used the pond snail *Radix balthica* (Linnaeus 1758, Basommatophora, Pulmonata), as an experimental model since it is present in many French rivers and European water bodies (Seddon et al. 2013). We studied the embryonic and larval stages because of their greater sensitivity to contaminants compared to the adult snails (Gomot 1998). Several works have documented the phenotypic impact of contaminant exposure on *Lymnaea* such as *Lymnaea stagnalis*. Some of these studies involved monitoring targeted biomarkers such as activity of the detoxification enzymes or expression of their encoding genes (e.g., cytochrome P450 (CYP450), glutathione-S-transferase (GST)) to assess the biological effects of pollutants (Bouétard et al. 2013; Gust et al. 2013; Bonnafé et al. 2015). They revealed an impact on one or more enzymes of detoxification system, while impacts on other networked functions were not demonstrated. It is also becoming necessary to use approaches which provide wider views of these effects. Interesting works have focused on genes expression of different aquatic organisms in responses to a pollutant or environmental changes (Wang et al. 2009; Bouétard et al. 2012). All these global transcriptomic works shown many impacted genes revealing potential key functions perturbations. Although very few analyses are available to establish a pattern of impacted genes or functions. The reproducibility of such studies is also challenging since the methods used for bioinformatics treatments have not been normalized and most studies apply different in-house command lines. Otherwise, the access to a reference genome of model organism defines the power and the depth of the analyses. Despite the absence of a sequenced genome that decreases depth and power of the analyses, the transcriptomic studies can yield precious information's on transcriptome sequences for further research such as targeting RT-PCR or even in cladistics. *Radix balthica* presents the advantage of spawning fertilised eggs in a gelatinous mass giving access to complete embryonic development: from the two-cell stage to the hatchling (Sarker et al. 2007; Pande 2010).

In this current work, we characterized the transcriptomic profiles of freshly hatched snails previously exposed to oxazepam solution during their embryonic development. Rather than focusing on well-studied biomarkers and

molecular pathways associated to drug responses, our aim was to identify new candidates by comparing transcriptome profiles of snails exposed to oxazepam solution at 0.815 and 10 µg.L⁻¹ to snails in a control condition. The dose of 0.815 µg.L⁻¹ represent the surface water concentration of oxazepam as previously described in the PSYCHEAU project manuscript 2014 (Unpublished data), and the higher one is the lowest concentration for which a phenotypic effect was previously observed on Japanese medaka *Oryzias latipes* larvae (Chiffre et al. 2016). The transcriptome profiles were generated by RNA-sequencing with an Illumina HiSeqTM 2000 sequencing system and were then compared to highlight the differentially expressed (DE) genes in each condition. This study gave us the global impact of oxazepam on the *R. balthica* transcriptome.

Materials and methods

Animals and oxazepam exposure experiment

The experimental *R. balthica* were obtained from the River Caussel (Albi, France, latitude: 43.931157; longitude: 2.167686) in June 2014 and acclimated for 1 week prior to collecting the egg masses. They were reared in a 40 L tank with aerated reconstituted AFNOR water (Gomot 1998) (NaHCO₃ 200 mg.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O 297 mg.L⁻¹; MgCl₂.6H₂O 167 mg.L⁻¹; anhydrous K₂SO₄ 26 mg.L⁻¹) and river freshwater (v/v) at a temperature of 20 ± 1 °C. During the acclimation period, the snails were fed with organic lettuce *ad libitum* under day/night photoperiod of 14/10 h.

The oxazepam used for the experiment was purchased from Alsachim (Strasbourg, France). A minimal concentration of ethanol (0.001%) was used to facilitate powder dissolution. One control condition with 0.001% ethanol supplemented AFNOR water and two concentrations, 10 µg.L⁻¹ (TA) and 0.815 µg.L⁻¹ (TB), the effective concentration and the environmental concentration respectively, were used for RNA extraction and sequencing. After 1 week of acclimation, egg masses laid were collected, and only the trochophore stage selected. Five egg masses were dissected to form a single egg pool. To follow embryonic development, each egg was placed into a different well of a 96 well plate. Eggs were randomly distributed into three experimental groups (control, TA and TB) with 90 individuals per group.

Sampling and total RNA extraction

Six replicates of ten neonate snails (not older than 24 h) for each condition (control, treated TA, treated TB) were used for RNA extraction and sequencing. The snails were

recovered randomly after hatching, pooled per condition and homogenized with 200 µL TRIzol[®] Reagent (Ambion[™] by Life Technologies, France).

Total RNA was extracted following the TRIzol[®] manufacturer's instructions. Total RNA was cleaned using RNeasy[™] Micro Kit (Qiagen, France) following the instructions of RNeasy Micro Handbook (12/2007, p56) with on column DNase I treatment and then stored at -80 °C. RNA purity and quantity was checked using the Nano-Drop[™] 2000 (Thermo Scientific, France) and RNA quality was determined with Agilent RNA 6000 Nano kit of Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). The automated and standardized method for RNA quality control provided by the software relies on calculation of an RNA integrity number (RIN). The RIN calculation employs numerous features, including 18S and 28S fragment regions height, area, and intercept of the baseline (Schroeder et al. 2006).

In mollusc, 28S RNA fragment is rarely observed. As documented in a range of invertebrates (Ishikawa 1977; Barcia et al. 1997; Muttray et al. 2008; Winnebeck et al. 2010), 28S absence is due to a breaking point in the rRNA structure which converts 28S into 2 fragments that are hydrogen bounded and that migrate approximately at the same size as the 18S rRNA during gel electrophoresis. Therefore we visually assessed the total RNA quality by evaluating the absence of oligonucleotides (produced by RNA degradation) and the presence of the peak corresponding to both rRNA.

Library preparation and RNA sequencing

The 18 libraries were prepared from 1.1 µg of total RNA with the TruSeq[®] Stranded mRNA LT Kit (Illumina[®]) following the manufacturer's recommendations and then checked with the High Sensitivity chip of the Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies). The libraries were then quantified in qPCR with the ABI 7900HT (Applied Biosystems). Library preparations were sequenced with TruSeq[®] PE Cluster v3 kit (Illumina[®]), TruSeq[®] SBS 200 cycle v3 kit (Illumina[®]) and TruSeq[®] Multiplex Primer kit (Illumina[®]) on HiSeq 2000 (Illumina[®]) with generation of paired-end (2 × 100pb) reads.

De novo transcriptome assembly and annotation

Per condition assemblies

First the read pairs were stored, the database quality checking and the cleaning of remaining sequencing adapters were done using trim_galore (available at http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/, version 0.4.0) (Marette et al. 2012). Then the over-represented reads were filtered out using the normalize_by_kmer_coverage.pl command lines

from the Trinity software package (Grabherr et al. 2011). The next step aimed at discarding the invalid base calls by extracting the longest sub-sequence without Ns from each read. If the length of the longest sub-sequence did not exceed half of the sequence length, the read and its mate were removed. This last step was performed using an in-house command lines.

Nine Oases assemblies using nine different k-mers (25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 65, and 69) were performed on the pre-processed input data (Schulz et al. 2012). Each assembly produces a transcripts.fa file. Each raw_transcripts.fa file is then organized into loci. Only the longest and most covered (used reads) loci are kept using the Oases-V0.2.04OutputToCsvDataBase.py command lines developed by a Brown University team. After that, all files were merged. Finally, anti-sense chimeras (accidentally produced by the assembly step) were split with a homemade script.

Because similar collections of contigs are produced by different k-mers, a cd-hit-est step was used to remove contigs based on their sequence similarities (Fu et al. 2012). Because different kmers sometimes construct different parts of the transcripts, we used TGICL to assemble contigs having significant overlaps (Perteza et al. 2003). The contigs were also filtered on a minimum length of 200 base pairs.

Input reads were then mapped back to the contigs using bwa aln (version 0.7.6) (Li and Durbin 2009). The resulting alignment files were used to correct the contig sequences from spurious insertions and deletions using an in-house command lines and to filter out those with very low coverage. The filter excludes contigs with less than two mapped reads per million.

Meta-assembly

All single condition contig fasta files were concatenated and each contig renamed by adding the condition name at the beginning of the contig name. The longest Open Reading Frame (ORF) was then searched with getorf from EMBOSS (Rice et al. 2000). Cd-hit clustering was performed on the ORFs with sequence identity equal to or greater than 90% in order to extract, from each cluster, the contig with the longest ORF or, if the ORF size was the same, the longest contig. Clustering using cd-hit-est was performed on the remaining contigs with sequence identity equal to or greater than 95%. Input reads from all conditions were then mapped to the contigs using bwa aln (Li and Durbin 2009). Contigs with very low coverage, less than 2 mapped reads per million, were filtered out.

Variant discovery

The raw reads were realigned to the final set of contigs using bwa mem (Li and Durbin 2009). The alignments were

then filtered on alignment unicity and quality using the Q30 threshold. The resulting bam files were re-aligned and recalibrated using GATK version 2.4.9 (McKenna et al. 2010). SNP and INDEL calling was performed using the Unified genotyper algorithm of GATK. SSR were searched in the contig fasta file using trf (Benson 1999).

Differential expression analysis

The differential expression detection of genes across samples was performed using the DESeq R package (1.14.0) (Anders and Huber 2012). Briefly, the analysis was performed after the estimation of effective library size, also called normalization, with “*estimateSizeFactor*” function and after variance estimation with the “*estimateDispersions*” function.

The DE contigs between control and TA, control and TB, TA and TB were identified with “*nhinomiTest*” resulting in a data frame with *p*-values that were fitted using Benjamini and Hochberg's procedure. An adjusted *p* value of 0.05 was used as the threshold to significantly select the DE contigs. Among the significantly DE contigs, we classified them according to their over (Fold Change > 1) or under-expressed (Fold Change < 1) profile.

Contig annotation and function prediction

The contigs were aligned vs. different nucleic and protein reference databases including: SwissProt, RefSeq protein, *Limnea stagnalis* contig, *Crassostrea gigas* and *Lottia gigantea* Ensembl protein, *Biomphalaria glabrata* peptides. The GO terms were retrieved using the SwissProt, RefSeq protein alignment matches. All the results were stored in an RNABrowse (Marette et al. 2014) instance.

Function prediction was determined using Interproscan which assigned Gene Ontology (GO) terms for contigs having at least one significant hit against an annotated reference from a database. For differentially expressed contigs, GO annotation was mapped into three ontologies (“Biological Process”, “Molecular Function” and “Cellular Component”) using Generic GO Term Mapper and then plotted using the WEGO (Web Gene Ontology Annotation Plot) plotting tool.

Functional annotation of DE contigs was performed using KAAS (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome (KEGG) Automatic Annotation Server) and KOBAS (KEGG Orthology Based Annotation System) 2.0 to test the statistical enrichment of DE genes in the KEGG pathway. Only pathways with a corrected *p* value < 0.05 were considered as significantly enriched. Results of annotation were then categorized using KEGG pathways, BRITE hierarchies for protein family analysis and KEGG modules.

Table 1 Results of contig cleaning

Category	
Reads before filtering	503,171,850
Deleted reads	39,759,772
Reads after filtering	463,412,078
Contigs assembly	56,435
Mean length contigs	1596.68
Mean depth contigs	378.96
Mean of percent reads mapped per library (%)	97%

Sequence accession numbers

The original sequencing reads of *R. balthica* juveniles libraries were submitted on European Nucleotide Archive (ENA) and are available under accession number PRJEB12711 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB12711>).

Results

Analysis of libraries and contig assemblies

The 18 libraries generated a total of 503,171,850 raw reads before filtering with the Illumina CASAVA 1.8 filter which deleted 39,759,772 raw reads (7.90% of the total). Then, the filtered reads were cleaned before assembling. A total of 56,435 contigs was generated (Table 1). Mean contig length and mean contig depth were calculated using all contigs from the 18 libraries. They were respectively 1579.68 bp (Fig. 1) and 378.96 reads (Table 1).

Analysis of mapping

Reads were mapped to the contig assembly to measure the “gene” expression level for each contig. For each of the eighteen libraries, an average of 97% clean reads were mapped to a contig in the assembled contig data (Fig. 2).

Annotation

The BLAST search annotated 44.91% of the 56,435 contigs (Fig. 3): 24.55% against RefSeqProt, 7.85% against the *L. stagnalis* contig database, 5.54% against the *B. glabrata* peptide database, 3.57% against the *L. gigantea* peptide database, 1.94% against the *C. gigas* peptide database and 1.46% against SwissProt.

Differential expression

The DESeq package used for the DE contigs revealed 144 DE contigs, with 59 contigs up-regulated and 85 down-

De novo transcriptome sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover...

Fig. 1 Contig distribution according to length. The contigs length was calculated using all contigs from the 18 libraries

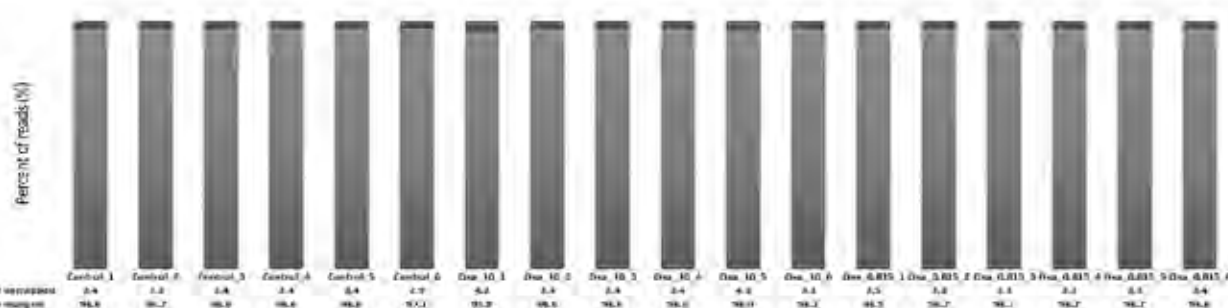
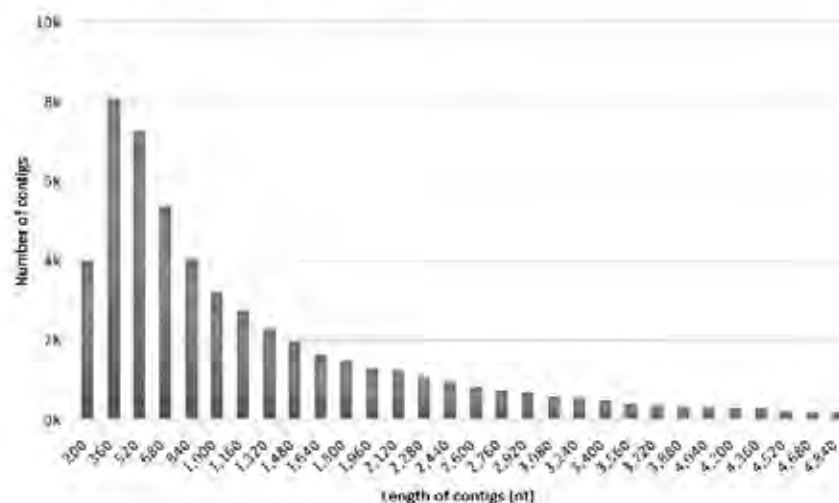


Fig. 2 Clean reads mapping to assembled contigs for each library. Control refers to control condition, Oxa_10 refers to $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ Oxazepam condition and Oxa_0.815 refers to $0.815 \mu\text{g.L}^{-1}$ oxazepam condition

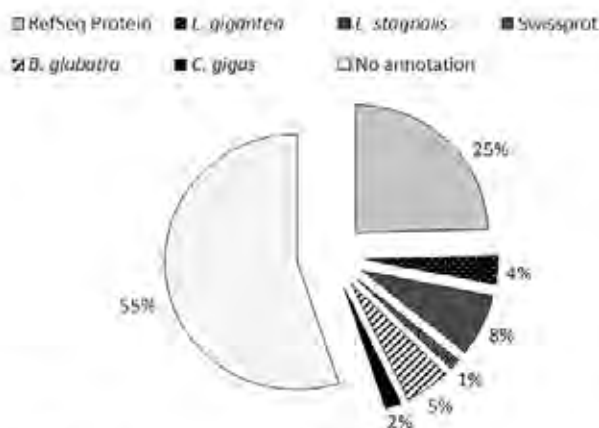


Fig. 3 Graphical representation of contig annotation

regulated for treatment A vs. control. For treatment B vs. control, only 2 contigs appeared to be up-regulated. Further analysis showed that only 34.0% of the DE contigs were annotated with a biological function (Table 2, see

supplementary Table S1 for complete data). For TA, among the most annotated under-expressed contigs, there was function prediction of More (Members of the conserved *Microchidia family*) family protein, Dentin sialophosphoprotein (DSPP), Carbonyl reductase and also proteins of ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) family, with fold change range from 0.058 to 0.328. Among the lowest ones, there was function prediction of enzymes such as Beta-galactosidase protein, Calumenin protein, Ribonuclease and L-Fucosidase proteins with fold change range from 0.728 to 0.745. For the over-expressed annotated contigs, the lowest impacted had function predictions of Ganglioside activator, Tyrosine receptor protein and Pur-mycin sensitive aminopeptidase with fold change range from 1.454 to 1.507 and the most over-expressed ones had function predictions of Hemagglutinin protein, Mitogen activated protein kinase (MAPK) and Deleted in malignant brain tumours protein with fold change range from 2.236 to 3.101. For TB, the only annotated contig was over-expressed and predicted as Otopetrin protein with fold change of 1.644.

Table 2 Fold change and putative function of the differential expressed contigs from *R. babingtoni* under oxazepam exposure

Contig name	Best hit accession	Best hit description	Fold change	BaseMean control $\pm$ SE ^a	BaseMean TA $\pm$ SE ^b
Rp1_MORC4.2.2	XP_003317669	PREDICTED: MORC family CW-type zinc finger protein 4, partial [<i>Paratrypanosoma</i>]	0.058	24 $\pm$ 5.266	9 $\pm$ 0.056
Rp1_LOC101853696	XP_005098306	PREDICTED: Dentin sialoprotein-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.077	137.166 $\pm$ 26.359	16.75 $\pm$ 6.736
Rp1_CBR1	XP_003763450	PREDICTED: Carbonyl reductase [NADPH] 1 [<i>Scoraphilus laevis</i>]	0.105	23.666 $\pm$ 4.565	3.75 $\pm$ 0.905
Rp1_LOC101849541.1.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.285	25.333 $\pm$ 3.527	7.833 $\pm$ 1.275
Rp1_LOC100535548	XP_005111242	PREDICTED: ADAM10 [<i>Aplysia californica</i>]	0.292	60.666 $\pm$ 4.772	20.333 $\pm$ 4.046
Rp1_LOC101849541.2.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.307	448.333 $\pm$ 37.911	155.333 $\pm$ 27.543
Rp1_LOC101849541.7.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.328	47.5 $\pm$ 3.413	17.666 $\pm$ 3.116
Rp1_LOC101863642.4.7	XP_005112974	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101863642 [<i>Aplysia californica</i>]	0.337	383 $\pm$ 42.401	144.5 $\pm$ 30.494
Rp1_LOC101859258.1.3	XP_005102942	PREDICTED: Protocadherin Fat 4-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.358	28.666 $\pm$ 5.308	17 $\pm$ 1.914
Rp1_LOC101848170.2.2	XP_005091177	PREDICTED: Translation factor GUF1, mitochondrial-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.403	500.833 $\pm$ 70.119	222.5 $\pm$ 29.686
Rp1_LOC102304721.1.2	XP_005916073	PREDICTED: Probable E3 ubiquitin-protein ligase DTX2-like isoform X2 [<i>Mytilus edulis</i>]	0.406	85.166 $\pm$ 8.526	38.333 $\pm$ 7.927
Rp1_contig_38610	E6ZJA8	Uncharacterized Beta-ketacyl synthase [<i>Dicentrarchus labrax</i>]	0.436	3816.333 $\pm$ 460.636	1894.5 $\pm$ 335.145
Rp1_LOC101863302	XP_005110056	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101863302 isoform X4 [<i>Aplysia californica</i>]	0.460	98.166 $\pm$ 12.365	49 $\pm$ 5.756
Rp1_LOC101857002	XP_005091492	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101857002 isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	0.551	110.166 $\pm$ 9.713	66.166 $\pm$ 4.812
Rp1_MUA3	P54576	MUA3_CAEEL Transmembrane cell adhesion receptor muu-3 OS [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	0.565	108.5 $\pm$ 12.489	66.333 $\pm$ 2.928
Rp1_LOC101861648.2.2	XP_005093946	PREDICTED: Fibrillin-1-like, partial [<i>Aplysia californica</i>]	0.609	1338.166 $\pm$ 128.803	892.833 $\pm$ 49.565
Rp1_LOC101860152.2.3	XP_005093674	PREDICTED: Cytochrome P450 3A29-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.617	174 $\pm$ 17.597	117.666 $\pm$ 9.888
Rp1_LOC101858677	XP_005089513	PREDICTED: Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein 2-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	0.642	648.166 $\pm$ 23.823	463.5 $\pm$ 50.603
Rp1_contig_411695	K1PY10	Uncharacterised Putative L-threonine 3-dehydrogenase [<i>Crassostrea gigas</i>]	0.646	974.5 $\pm$ 41.089	697.833 $\pm$ 81.021
Rp1_contig_41364	K1R2K2	Uncharacterised Peroxin [<i>Crassostrea gigas</i>]	0.647	3198.5 $\pm$ 270.65	2235.5 $\pm$ 99.937
Rp1_SNPD1	XP_006203669	PREDICTED: Sphingomyelin phosphodiesterase [<i>Vineta pectus</i>]	0.657	396.833 $\pm$ 24.529	285.5 $\pm$ 21.757
Rp1_MEGF6.8.16	Q80V70	MOUSE Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6 OS [<i>Mac musculus</i>]	0.671	2598.333 $\pm$ 118.261	1943.333 $\pm$ 191.665
Rp1_contig_33698	EKC35365	EKC35365 Description : Peroxin	0.682	21,966.166 $\pm$ 1304.926	16,588.866 $\pm$ 1534.585
Rp1_LOC101849034.2.2	XP_005091185	PREDICTED: Pericentriolar material 1 protein-like isoform X5 [<i>Aplysia californica</i>]	0.686	651.666 $\pm$ 40.431	497.166 $\pm$ 47.953

Table 2 continued

Down-regulated (Control vs. TA)					
Contig name	Best hit accession	Best hit description	Fold change	BaseMean control $\pm$ SE ^a BaseMean TA $\pm$ SE ^b	
Rp1_LOC101845316.7.8	XP_005096296	PREDICTED: Multidrug resistance-associated protein 1-like isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	0.697	725.666 $\pm$ 52.696	551.5 $\pm$ 27.176
Rp1_LOC101852369.1.2	XP_005089594	PREDICTED: Dedicator of cytokinesis protein 7-like isoform X6 [<i>Aplysia californica</i>]	0.702	686.833 $\pm$ 40.101	530.666 $\pm$ 53.328
Rp1_contig_13954	K1Q965	Uncharacterised Protein NEF1 [<i>Crossostrea gigas</i>]	0.720	1341.5 $\pm$ 108.633	1063.833 $\pm$ 87.979
Rp1_LOC101853823	XP_005110352	PREDICTED: Beta-galactosidase-1-like protein 2-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.728	733 $\pm$ 50.165	592.833 $\pm$ 63.809
Rp1_contig_36971	XP_005106678.1	PREDICTED: glutathione S-transferase 3-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.730	7938.5 $\pm$ 475.205	6421.666 $\pm$ 569.551
Rp1_LOC101862537	XP_005110307	PREDICTED: Calumenin-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	0.733	2587 $\pm$ 230.12	2079.666 $\pm$ 160.24
Rp1_contig_36978	A0A0B2V9E1	Uncharacterised Ribonuclease [<i>Taeniocara cornu</i>]	0.737	3025 $\pm$ 159.88	2462.333 $\pm$ 169.66
Rp1_contig_38047	K1QC26	Uncharacterised Plasma alpha-L-fucosidase [<i>Crossostrea gigas</i>]	0.745	4598.833 $\pm$ 256.61	3776 $\pm$ 320.939
Up-Regulated (Control vs. TA)					
Contig name	Best hit accession	Best hit description	Fold change	*BaseMean control $\pm$ SE *BaseMean TA $\pm$ SE	
Rp1_LOC101739898	XP_004933588	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101739898 [<i>Bombix mori</i>]	1.447	137 $\pm$ 6.347	218.166 $\pm$ 10.885
Rp1_LOC101859955.2.2	XP_005103957	PREDICTED: Ganglioside GM2 activator-like [<i>Aplysia californica</i>]	1.454	186 $\pm$ 9.103	297.333 $\pm$ 18.503
Rp1_contig_12968	EKC33205	Uncharacterised receptor-type tyrosine-protein phosphatase T1 [<i>Crossostrea gigas</i>]	1.459	209.166 $\pm$ 21.764	328.166 $\pm$ 11.379
Rp1_LOC101856763	XP_005088876	PREDICTED: Purvanyen-sensitive aminopeptidase-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	1.507	2183.833 $\pm$ 133.516	3615.666 $\pm$ 254.056
Rp1_contig_09129	EKC22995	EKC22995 Description : Amidase	1.545	464.666 $\pm$ 30.827	781.5 $\pm$ 32.602
Rp1_LOC101855555.1.3	XP_005096347	PREDICTED: Centrosomal protein POC5-like isoform X3 [<i>Aplysia californica</i>]	1.636	53.5 $\pm$ 5.858	96.333 $\pm$ 9.506
Rp1_LOC101860999.31.45	XP_005107325	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101860999 [<i>Aplysia californica</i>]	1.735	39.833 $\pm$ 2.971	75.833 $\pm$ 5.81
Rp1_LOC101853289.2.2	XP_005112645	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101853289 [<i>Aplysia californica</i>]	1.784	120.833 $\pm$ 8.348	234.5 $\pm$ 10.871
Rp1_contig_29006	XP_005301846	PREDICTED: Lysine-specific demethylase 6A-like isoform X8 [<i>Chrysomys pictus</i>]	1.999	41.5 $\pm$ 6.662	91.333 $\pm$ 12.139
Rp1_PFE0815w	XP_001351720	tRNA pseudouridine synthase, putative [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	2.042	131.666 $\pm$ 21.975	296 $\pm$ 26.051
Rp1_LOC101857261.15.28	XP_005103678	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101857261 isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	2.066	34.166 $\pm$ 2.638	79 $\pm$ 9.479
Rp1_contig_13618	K1QTV9	Uncharacterised Hemagglutinin/anticoagulant aggregation factor [<i>Crossostrea gigas</i>]	2.236	78.833 $\pm$ 8.182	200 $\pm$ 34.366
Rp1_LOC101732139.2.2	XP_004919413	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101732139 [<i>Xeromys (Scleromys) tropicalis</i>]	2.672	37.333 $\pm$ 9.52	107 $\pm$ 9.458

Table 2 continued

Up-Regulated (Control vs. TA)				
Contig name	Best hit accession	Best hit description	Fold change	#BaseMean control $\pm$ SE #BaseMean TA $\pm$ SE
Rp1_contig_28236	XP_002754505	PREDICTED: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1-like [Saccoglossus kowalevskii]	2.999	9.666 $\pm$ 1.308 32.333 $\pm$ 5.874
Rp1_LOC373215	XP_798111	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: Deleted in malignant brain tumors 1 protein [Strongylocentrotus purpuratus]	3.101	128.166 $\pm$ 35.765 419.166 $\pm$ 69.306
Up-Regulated (Control vs. TB)				
Contig name	Best hit accession	Best hit description	Fold change	#BaseMean control $\pm$ SE #BaseMean TB $\pm$ SE
Rp1_contig_20905	K1QXB6	Otopetrin superfamily, PREDICTED: otopetrin-2-like [Aplysia californica]	1.644	211.833 $\pm$ 20.984 385.5 $\pm$ 40.41

* BaseMean are mean of contigs counted for each 6 replicates ($\pm$ the Standard Error)

^a Control refers to control condition, TA refers to 10 μ g.L⁻¹ oxazepam exposure and TB refers to 0.815 μ g.L⁻¹ oxazepam exposure

Functional annotation analysis of DE contigs

All the available GO-terms of the 144 DE contigs of TA and the 2 DE contigs of TB were mapped and plotted into three ontologies (Fig. 4) using WEGO plot. The most enriched ontology was "molecular function" with four dominant functions, "binding", "catalytic", "hydrolase" and "ion binding".

KOBAS 2.0 software was used to identify the most significantly enriched KEGG pathway which is represented in Table 3. The 2 DE contigs of the TB are not found in any of the pathways. The 6 most enriched pathways of the DE contigs of TA were the "Notch signalling pathway" with 5 contigs assimilated to this pathway, "Chemical carcinogenesis" with 2 contigs assimilated to this pathway, "Arachidonic acid metabolism" enriched with 2 contigs, "Epithelial cell signalling in *Helicobacter pylori*" with 2 contigs assimilated for this pathway, "Extracellular matrix receptor (ECM-receptor) interaction" with 2 contigs assimilated to this pathway and "Aminobenzoate degradation" enriched with 1 contig (Table 3). The KEGG Mapper was used for BRITE hierarchy reconstruction (Fig. 5), which classifies the K numbers of each contig into three ontologies named "Metabolism", "Genetic Information Processing" and "Signalling and Cellular Processes". The most represented ontology was "Metabolism" with the Enzyme subcategory containing 15 contigs. The KEGG Mapper was also used for module reconstruction of the 144 differentially expressed contigs of the TA, the 2 DE contigs of TB haven't highlighted a module. That resulted in 6 modules representing the main principal modules affected by differentially expressed contigs. One contig (Rp1_contig_28236) encodes a predicted Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase 2 (MAP3K2 protein), potentially involved in three modules (three MAPK pathway), c-Jun N-terminal kinase also called JNK (M00688), p38 (M00689) and Extracellular signal-Regulated Kinase also called ERK (M00690). Another module was Notch signalling (M00682) with 5 contigs down-regulated (Rp1_LOC101849541.1.7, Rp1_LOC101849541.2.7, Rp1_LOC101849541.7.7, Rp1_LOC100533548 and Rp1_LOC102304721.1.2). The alignment of the three contigs encoding a predicted ADAM 17 protein (Rp1_LOC101849541.1.7, Rp1_LOC101849541.2.7, Rp1_LOC101849541.7.7) lead us to conclude to an assembling error as these contigs appeared to be parts of the same sequence encoding a predicted ADAM 17 protein. The two other contigs, Rp1_LOC100533548 and Rp1_LOC102304721.1.2, were predicted to encode ADAM 10 and Deltex protein, respectively. The last two modules impacted were Catecholamine biosynthesis (M00042) with one contig

De novo transcriptome sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover...

Fig. 4 Distribution of the over and under-expressed contigs using GO terms according to three GO top categories. C refers to control condition, TA refers to 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ oxazepam exposure

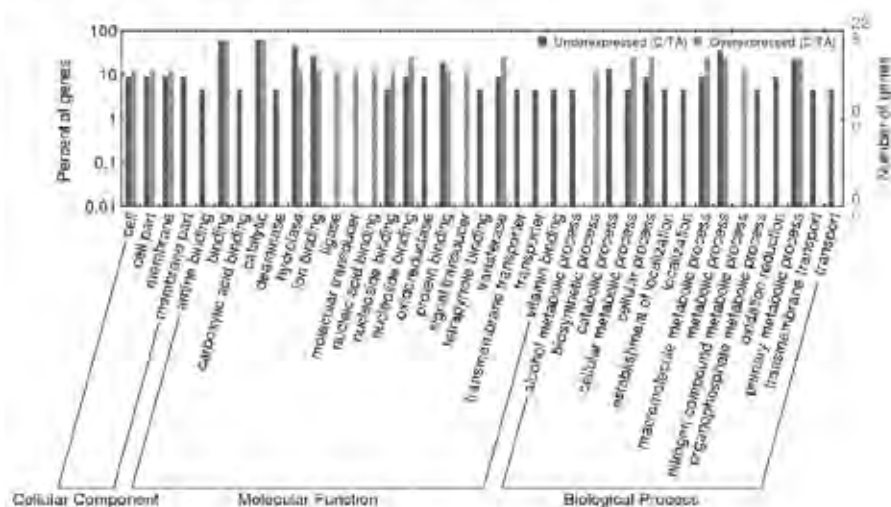
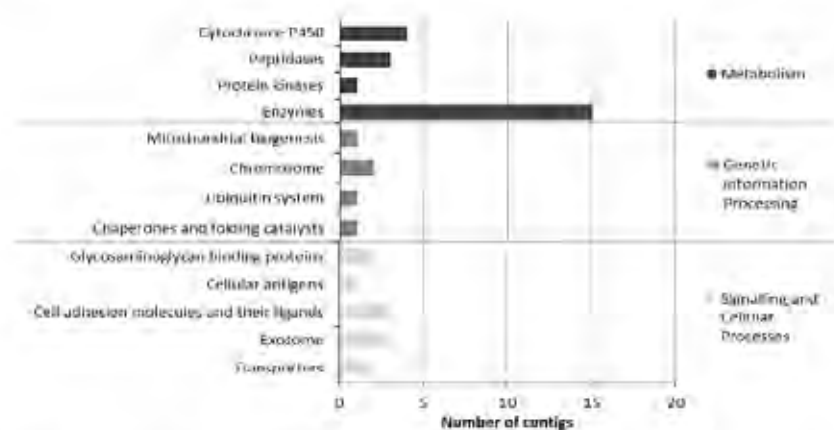


Table 3 The most enriched KEGG pathway of differentially expressed contigs (corrected p value < 0.1)

Pathway ID	Pathway	Up- and down-regulated contigs	Corrected p value
ko04330	Notch signaling pathway	5	2.774E-07
ko05204	Chemical carcinogenesis	2	3.914E-02
ko00590	Arachidonic acid metabolism	2	3.914E-02
ko05120	Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	2	5.428E-02
ko04512	ECM-receptor interaction	2	5.428E-02
ko00627	Aminobenzoate degradation	1	8.040E-02

The KEGG pathway enrichment was based on the K numbers of each differentially expressed contig under TA exposure

Fig. 5 Graphical representation of differentially expressed contigs according to the KEGG top categories. The BRITe hierarchy reconstruction was based on the K numbers of each differentially expressed contig under TA (10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ oxazepam) exposure



up-regulated (Rp1_contig_36516) encoding a predicted function of Dopamine β -hydroxylase (DBH) and Polyamine biosynthesis (M00133) with one down-regulated contig (Rp1_contig_38845) encoding a predicted Agmatinase (AGMAT) protein.

Insertion, deletion (INDEL) and single nucleotide polymorphism (SNP) detection

The detection of INDELs and SNPs performed with the GATK algorithm identified 455,826 SNPs (92.4% of

variants) and 37,517 INDELs (7.6% of variants) with 19,628 insertion (4% of variants) and 17,889 deletion (3.6% of variants).

Discussion

In this study, RNA sequencing produced 56,435 contigs with a mean length of 1579.68 bp which increases probability to find a complete Open Reading Frame (ORF) in one contig and thus facilitates prediction of functional annotation. Thus, 44.91% present an annotated ORF. A higher mean length must be problematic because of the possibility to find two or more ORFs in one contig which can disrupt DE analysis. In the present case, the mean contig length was suitable to yield an almost complete transcript.

Differential analysis

Differential expression analysis revealed 144 contigs DE for treatment A. Only 34.0% of contigs were annotated with various functions such as enzyme activity, cell surface receptors or proteins involved in cell signalling processes. The other contigs could be orphan proteins, non-coding RNA or sequences from UTR protein regions. Moreover, we can't discard the presence of partially or misassembled transcript, because of the absence of genome sequencing data and functional annotations available for non-model organisms (Schunter et al. 2014). For treatment B, only 2 contigs were DE and only one was annotated as Otopetrine. Several hypotheses can explain the lack of contigs DE under this condition. First, the few number of sequenced genomes limits the annotation power and sometimes may generates two or more partial or complete Open Reading Frame (ORF) on one contig. Schunter et al. (2014) has demonstrated that numbers of contig isoforms increase with contig length resulting in a substantially reduction of differential analysis efficiency. This point being dependant on the in-house command lines used, could also affect the annotation. This bias decreases severely the assembling and the annotation strength, particularly for the DE contigs treatment. In addition, the method used for bioinformatics treatment could be too stringent (to delete the false positive). Some genes didn't appear DE while they are not, in some case, data structures need to accommodate multiple transcripts per locus due to alternative splicing and sequences that are repeated in different genes introduce ambiguity (Grabherr et al. 2011). Another hypothesis would be that effect of low concentrations of oxazepam were difficult to detect on the transcriptome of *R. halthica*. The impact could be visible at another level of the organism such as proteome or enzyme activities level. As shown by

Chen et al. (2014), the low concentration of pharmaceuticals like carbamazepine (at 0.5 µg/L) used in this study impact catalase activity (higher activity of catalase in the digestive gland and gills of *Corbicula fluminea* exposed for 30 days to carbamazepine solution) but had no effect on genes expression of Heat shock protein (*Hsp*). These observations support the hypothesis that low concentrations of oxazepam could impact significantly another biological mechanism. These limited effects could be also due to the too long or too short exposure time tested.

After function prediction of the 144 DE contigs of treatment A made with the GO database, molecular function appears to be the most enriched ontology with "Catalytic" and "Hydrolase" function being the most represented. This observation is in line with the Brite hierarchy reconstruction of the KEGG database using K-numbers, with the "Metabolism" ontology being the most represented with "Enzyme" sub-categorie. Function prediction using the KEGG database highlighted two major impacted pathways: "Notch signalling pathway" involved in many cellular processes and "Extra Cellular Matrix receptor (ECM-receptor) interaction" involved mainly in cell-cell interactions (Table 3). KEGG Mapper prediction emphasizes the presence among the DE contigs of "Notch" module but also of the "MAPK signalling" (JNK) module and two biosynthesis pathways i.e. "Catecholamine" and "Polyamine" biosynthesis. The potential disturbance of these four predicted pathways is discussed below.

Notch signalling pathway

As reviewed by Weinmaster et al. (Weinmaster et al. 1992; Weinmaster 1997, 1998, 2000) the Notch signalling pathway is a complex cascade of events conserved in many eukaryotic cells which culminates in altered genes expression patterns. Notch signal transduction is mainly initiated by cell-cell contact and triggers a succession of reactions involving many partners such as metalloprotease enzyme (ADAM proteins family) or ubiquitin transferase enzyme (Deltex protein). Our study highlighted down-regulation of three contigs encoding two predicted ADAM proteins family (ADAM 10 and ADAM 17) and one predicted Deltex (DTX) protein. The ADAM protein family mediates the second cleavage of mature cell surface receptor required for the third cleavage of Notch that releases the Notch active cytoplasmic domain from the plasma membrane. ADAM 17 (also called TACE) is also involved in many other pathways with a critical role in the processing of multiple protein like Tumor Necrosis Factor (TNF) proteins family (Peschon et al. 1998) and interestingly it has been shown that it could be inhibited by benzodiazepine molecules in mammalian organisms like mouse (Nelson et al. 2002; Levin et al. 2004; Scheller et al. 2011; Dreytmueller et al. 2015). Our results

are in accordance with the studies of Levin et al. (2004), Nelson et al. (2002) and Scheller et al. (2011), which showed TACE inhibition by many of substituted benzodiazepine hydroxamates compounds. In our case, accepting the hypothesis that Notch signalling operate in the same way of mammalian signal transduction, the inhibition of metalloprotease enzyme could decrease the active cytoplasmic form of Notch and so decrease the transcription of Notch target genes. Notch proteins could be directly inhibited by benzodiazepine molecules. As shown by Gavai et al. (2015), the benzodiazepine compound like 2-oxo-1,4-benzodiazepin-3-yl-succinamides inhibits *in vitro* the γ -secretase mediated signalling of Notch receptors. The role of Deltex protein is not clear in the Notch pathway but recent studies suggest that Deltex protein interacts with other proteins in the cytoplasm and in the nucleus to activate or inhibit the transcription of target genes (Diederich et al. 1994; Matsuno et al. 1995; Weinmaster 1997; Baron 2012). Deltex encoding gene is also a target of Notch signalling (Destos et al. 1998). The down-regulation of the *deltex* gene in our study could be the result of Notch inhibition *via* the down-regulation of the ADAM genes. The scenario where Notch, ADAM 10, ADAM 17 would be inhibited could potentially have an impact on many mechanisms, such as neurogenesis, myogenesis, but also cellular specification, differentiation, proliferation and survival. One or more of these mechanisms occurring during embryogenesis could be impacted by oxazepam exposure and more broadly by benzodiazepines. This disturbance could have a strong teratogenic impact on our model and thus on the fitness of organisms exposed in the environment.

Mitogen-activated protein kinases

The second module which appeared to be impacted was the mitogen-activated protein kinases (MAPK). Three MAP kinase cascades have been characterised: ERK, JNK and p38. Our study highlighted the over-expression of one contig encoding predicted MAP3K2 serine/threonine protein kinase mainly involved in the MAP-JNK signalling pathway. As reviewed by Takeda and Ichijo (2002), the JNK signalling pathway consists of three classes of serine/threonine kinases, MAPK, MAPK Kinase (MAPKK or MEK) and MAPKK kinase (MAPKKK). MAP3K2 is the first serine/threonine kinase phosphorylated in the JNK pathway. It is known that the JNK pathway is mainly activated in response to environmental stress such as UV, heat shock or osmotic shock and also by proinflammatory cytokines and interleukin-1 (Tumor Necrosis Factor and ILK-1) (Takeda and Ichijo 2002). Interestingly, it has been shown that Notch and Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathways can inhibit the MAP-JNK pathway *via* the

Growth arrest and DNA-damage-inducible (Gadd45) protein (Elsharkawy et al. 2005; Maniati et al. 2011). This observation supports the impact on Notch signalling pathway suggested by our results. Only one contig over-expressed represented the MAPK module predicted *via* KEGG module reconstruct. The other partners of MAP3K2 may be over-expressed but undetected as differentially expressed because of the stringent bioinformatics methods used for differential expression analysis.

Catecholamine biosynthesis pathway

CAs are a class of neurotransmitters mainly represented by dopamine (DA) and its metabolic products, noradrenaline (NA) and adrenaline (A). These three CAs are synthesized from the amino-acid L-tyrosine using four principal enzymes. Our study showed one over-expressed contig encoding a predicted Dopamine- β -hydroxylase (DBH) protein involved in DA hydroxylation which produces NA (Flatmark 2000). As shown by Richetto et al. (2015) on the mouse model organism, the positive allosteric modulation of the GABA receptor α -5 subunit may be particularly useful in mitigating pathological overactivity of the dopaminergic system. In our study, we used oxazepam, an agonist of the GABA receptor. The over-expression of DBH suggests possible over-production of dopamine neurotransmitter which could also affect the noradrenaline and adrenaline synthesis pathways. This suggestion is in accordance with results published by Heikkinen et al. (2008). They have shown a modulation of the glutamatergic transmission mediated by benzodiazepines which activates the ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons and increases the amount of dopamine released in the nucleus accumbens (associated to pleasure, incentive salience, etc.), increasing the benzodiazepines impacts. Even if only one contig appeared DE in this module, it is interesting to consider these results because this neurotransmitter is involved in many physiological processes, such as cell-cell nervous conduction, but also in movement, feeding and behaviour, very important physiological processes for population fitness.

Polyamine biosynthesis pathway

The conventional polyamine biosynthesis pathway from arginine to polyamine is mediated by Arginase and Ornithine decarboxylase (ODC1) proteins. Some studies showed an alternative to this conventional pathway using Arginine decarboxylase (ADC) and Agmatinase (AGMAT) (Halaris and Plietz 2007; Wang et al. 2014). Our study highlighted the inhibition of one contig encoding predicted AGMAT protein involved in another polyamine pathway from arginine to putrescine *via* ADC and AGMAT protein (Halaris

and Plietz 2007; Wang et al. 2014). It seems that these two pathways have a complementary role. This suggests a possible decrease in the amount of polyamines such as putrescine, spermine and spermidine which could lead to disturbance of DNA and protein synthesis regulation, the scavengers of reactive oxygen species, cell proliferation and the differentiation of tissues. The inhibition of AGMAT would also trigger an increase of Agmatine protein (precursor of putrescine) amount and thus disturb many cellular processes which involve Agmatine such as voltage gated Ca^{2+} channels and consequently nervous conduction of adrenergic, serotonergic or also cholinergic neurones (Reis and Regunathan 2000). Agmatine can also modulates the release of glutamate and noradrenaline (Halaris and Plietz 2007). Thereby, the modulation of agmatine production could directly impact glutamatergic and noradrenergic nervous conduction. Although this is based on a single contig in the module, it is consistent with our results suggesting that benzodiazepine could disrupt the noradrenaline and dopamine nervous conduction.

Conclusion

This study revealed a strong impact on the *R. balthica* transcriptome after exposure to $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ oxazepam. Interestingly, at environmental concentration, no detectable effects were observed on *Radix* embryo transcriptome. These disturbances on the expression patterns of *R. balthica* may impact on important functions related to the homeostasis of development in this freshwater snail. Moreover, this study allowed enrichment of non-model organism transcript database used in ecotoxicological approaches.

Acknowledgements The authors thank Olivier Bouchez and all GePlaGe operators, INRA of Castanet-Tolosan for the perfect processing of our unusual samples. Funding for this work was provided to J-YM by a grant from the Region Midi-Pyrénées, Toulouse (France) for 70% and from Jean-François Champollion University Institute, Albi (France) for 30%. We thank also Jean-Michel MALGOUYRES operator for his help in organism collection and in maintain rearing of *R. balthica*.

Authors' contributions The project was conceived and planned by FG, EB and J-YM. J-YM exposed, grinded and extracted the RNA. CK and FF performed the bioinformatics analysis and J-YM performed the differential analysis and the annotation of differential expressed contigs. J-YM wrote the manuscript and FG and EB proofread it.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institution at which the study was conducted and was in compliance with current French laws.

References

- Anders S, Huber W (2012) Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package. Heidelberg, Germany: European Molecular Biology Laboratory (EMBL)
- Barcia R, Lopez-García JM, Ramos-Martínez JJ (1997) The 28S fraction of rRNA in molluscs displays electrophoretic behaviour different from that of mammal cells. *Biochem Mol Biol Int* 42:1089–1092
- Baron M (2012) Endocytic routes to Notch activation. *Semin Cell Dev Biol* 23:437–442. doi:10.1016/j.semedb.2012.01.008
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580
- Boumafé E, Sroda S, Budzinski H et al. (2015) Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environ Sci Pollut Res* 22:11033–11046. doi:10.1007/s11356-015-4309-x
- Bouéard A, Besnard A-L, Vassaux D et al. (2013) Impact of the redox-cycling herbicide diquat on transcript expression and antioxidant enzymatic activities of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat Toxicol* 126:256–265. doi:10.1016/j.aquatox.2012.11.013
- Bouéard A, Noiro C, Besnard A-L et al. (2012) Pyrosequencing-based transcriptomic resources in the pond snail *Lymnaea stagnalis*, with a focus on genes involved in molecular response to diquat-induced stress. *Ecotoxicology* 21:2222–2234. doi:10.1007/s10646-012-0977-1
- Bouissou-Schurtz C, Houeto P, Guerbet M et al. (2014) Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:296–303. doi:10.1016/j.yrtph.2014.04.006
- Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J (2013) Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 339:814–815. doi:10.1126/science.1226850
- Byrne RA, Rundle SD, Smirnova JJ, Spicer JJ (2009) Embryonic rotational behaviour in the pond snail *Lymnaea stagnalis*: influences of environmental oxygen and development stage. *Zoology* 112:471–477. doi:10.1016/j.zool.2009.03.001
- Calisto V, Esteves VI (2009) Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77:1257–1274. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.021
- Chen H, Zhu J, Liang X et al. (2014) Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquat Toxicol* 155:1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2014.06.001
- Chen M, Cooper VI, Deng J et al. (2015) Occurrence of pharmaceuticals in Calgary's wastewater and related surface water. *Water Environ Res* 87:414–424. doi:10.2175/106143015X14212658614199
- Cheung CCC, Lam PKS (1998) Effect of cadmium on the embryos and juveniles of a tropical freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Water Sci Technol* 38:263–270
- Chiffre A, Clérandeau C, Dwoinikoff C, et al. (2016) Psychotropic drugs in mixture alter swimming behaviour of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) larvae above environmental concentrations. *Environ Sci Pollut Res* 23(6):4964–4977. doi:10.1007/s11356-014-3477-4
- Coeurdassier M, De Vaulleury A, Bador P-M (2003) Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory

- bioassays. Arch Environ Contam Toxicol 45:102–109. doi:10.1007/s00244-002-0152-4
- Coutellec M-A, Besnard A-L, Caquet T (2013) Population genetics of *Lymnaea stagnalis* experimentally exposed to cocktails of pesticides. Ecotoxicology 22:879–888. doi:10.1007/s10646-013-1082-9
- Das S, Khangarot BS (2010) Bioaccumulation and toxic effects of cadmium on feeding and growth of an Indian pond snail *Lymnaea luteola* L. under laboratory conditions. J Hazard Mater 182:763–770. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.06.100
- Deftos ML, He Y-W, Ojala EW, Bevan MJ (1998) Correlating notch signaling with thymocyte maturation. Immunity 9:777–786
- Diederich RJ, Matsuno K, Hing H, Artavanis-Tsakonas S (1994) Cytosolic interaction between dextex and Notch ankyrin repeats implicates dextex in the Notch signaling pathway. Dev Camb Engl 120:473–481
- Dreytmueller D, Uhlig S, Ludwig A (2015) ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 308:L325–343. doi:10.1152/ajplung.00294.2014
- Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA (2005) The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. Apoptosis 10:927–939. doi:10.1007/s10495-005-1055-4
- Flatmark (2000) Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. Acta Physiol Scand 168:1–17. doi:10.1046/j.1365-201x.2000.00596.x
- Fong PP, Ford AT (2014) The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. Aquat Environ 151:4–13. doi:10.1016/j.aquat.2013.12.003
- Fu L, Niu B, Zhu Z et al. (2012) CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics 28:3150–3152. doi:10.1093/bioinformatics/bts365
- Gavai AV, Quesnelle C, Norris D et al. (2015) Discovery of clinical candidate BMS-906024: a potent pan-notch inhibitor for the treatment of leukemia and solid tumors. ACS Med Chem Lett 6:523–527. doi:10.1021/acsmedchemlett.5b00001
- Gomot A (1998) Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. Ecotoxicol Environ Saf 41:288–297. doi:10.1006/eesa.1998.1711
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat Biotechnol 29:644–652. doi:10.1038/nbt.1883
- Gust M, Fortier M, Garric J et al. (2013) Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Sci Total Environ 445–446:210–218. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.057
- Halaris A, Plietz J (2007) Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. CNS Drugs 21:885–900. doi:10.2165/00023210-200721110-00002
- Heikkinen AE, Möykkynen TP, Korpi ER (2008) Long-lasting modulation of glutamatergic transmission in VTA dopamine neurons after a single dose of benzodiazepine agonists. Neuropsychopharmacology 34:290–298. doi:10.1038/npp.2008.89
- Idder S, Ley L, Mazellier P, Budzinski H (2013) Quantitative on-line preconcentration-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the determination of pharmaceutical compounds in water. Anal Chim Acta 805:107–115. doi:10.1016/j.aca.2013.10.041
- Ishikawa H (1977) Comparative studies on the thermal stability of animal ribosomal RNA's V. *Tentaculata* (phoronids, moss-animals and lamp-shells). Comp Biochem Phys B 57:9–14. doi:10.1016/0305-0491(77)90073-6
- Levin JI, Nelson FC, Delos Santos E et al. (2004) Benzodiazepine inhibitors of the MMPs and TACE. Part 2. Bioorg Med Chem Lett 14:4147–4151. doi:10.1016/j.bmcl.2004.06.031
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 25:1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
- Loos R, Carvalho R, António DC et al. (2013) EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. Water Res 47:6475–6487. doi:10.1016/j.watres.2013.08.024
- Maniati E, Bossard M, Cook N et al. (2011) Crosstalk between the canonical NF- κ B and Notch signaling pathways inhibits Ppar γ expression and promotes pancreatic cancer progression in mice. J Clin Invest 121:4685–4699. doi:10.1172/JCI45797
- Mariette J, Escudé F, Alias N et al. (2012) NG6: Integrated next generation sequencing storage and processing environment. BMC Genomics 13:462. doi:10.1186/1471-2164-13-462
- Mariette J, Noirot C, Nabihoudine I et al. (2014) RNAbrowser: RNA-seq de novo assembly results browser. PLoS One 9:e96821. doi:10.1371/journal.pone.0096821
- Matsuno K, Diederich RJ, Go MJ et al. (1995) Dextex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. Dev Camb Engl 121:2633–2644
- McKenna A, Hanna M, Banks E et al. (2010) The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res 20:1297–1303. doi:10.1101/gr.107524.110
- Muttray AF, Schulte PM, Baldwin SA (2008) Invertebrate p53-like mRNA isoforms are differentially expressed in mussel haemic neoplasia. Mar Environ Res 66:412–421. doi:10.1016/j.marenvres.2008.06.004
- Nelson FC, Delos Santos E, Levin JI et al. (2002) Benzodiazepine inhibitors of the MMPs and TACE. Bioorg Med Chem Lett 12:2867–2870
- Pande GS (2010) Observations on the embryonic development of freshwater pulmonate snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck, 1822) (gastropoda: mollusca). The Bioscan 5:549–554
- Pertea G, Huang X, Liang F et al. (2003) TIGR gene indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. Bioinformatics 19:651–652. doi:10.1093/bioinformatics/btg034
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P et al. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. Science 282:1281–1284
- Reis DJ, Regunathan S (2000) Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? Trends Pharmacol Sci 21:187–193. doi:10.1016/S0165-6147(00)01460-7
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOS: the European molecular biology open software suite. Trends Genet TIG 16:276–277
- Richetto J, Labouesse MA, Poc MM et al. (2015) Behavioral effects of the benzodiazepine-positive allosteric modulator SH-053-2F-5-CH3 in an Immune-mediated neurodevelopmental disruption model. Int J Neuropsychopharmacol 18:pyu055–pyu055. doi:10.1093/ijnp/pyu055
- Sanchez W, Sremski W, Piccini B et al. (2011) Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. Environ Int 37:1342–1348. doi:10.1016/j.envint.2011.06.002
- Sarker MM, Nesa B, Jahan MS (2007) Embryonic developmental ecology of freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lymnaeidae: Gastropoda). Pak J Biol Sci PJSB 10:23–31
- Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. Trends Immunol 32:380–387. doi:10.1016/j.it.2011.05.005
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S et al. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol 7:3. doi:10.1186/1471-2199-7-3

- Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M, Birney E (2012) Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics* 28:1086–1092. doi:10.1093/bioinformatics/bts094
- Schunter C, Vollmer SV, Macpherson E, Pascual M (2014) Transcriptome analyses and differential gene expression in a non-model fish species with alternative mating tactics. *BMC Genomics* 15:167. doi:10.1186/1471-2164-15-167
- Seddon MB, Kebapci U, Van Damme D, Prie V (2013) *Radix balthica*. In: IUCN red list threat. Species. <http://www.iucnredlist.org/details/155647/0>. Accessed 11 Jun 2015
- Takeda K, Ichijo H (2002) Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system. *Genes Cells* 7:1099–1111. doi:10.1046/j.1365-2443.2002.00591.x
- Wang X, Ying W, Dunlap KA et al. (2014) Arginine decarboxylase and agmatinase: an alternative pathway for de novo biosynthesis of polyamines for development of mammalian conceptuses. *Biol Reprod* 90:84–84. doi:10.1095/biolreprod.113.114637
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57–63. doi:10.1038/nrg2484
- Weinmaster G (1997) The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* 9:91–102. doi:10.1006/mcne.1997.0612
- Weinmaster G (1998) Notch signaling: direct or what?. *Curr Opin Genet Dev* 8:436–442. doi:10.1016/S0959-437X(98)80115-9
- Weinmaster G (2000) Notch signal transduction: a real Rip and more. *Curr Opin Genet Dev* 10:363–369. doi:10.1016/S0959-437X(00)00097-6
- Weinmaster G, Roberts V, Lemke G (1992) Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116:931–941
- Winnebeck EC, Millar CD, Warman GR (2010) Why does insect RNA look degraded?. *J Insect Sci* 10:1–7. doi:10.1673/031.010.14119
- Yuan S, Jiang X, Xia X et al. (2013) Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* 90:2520–2525. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.10.089

Annexe 3 :

Annexe 3 : Tableau des séquences nucléotidiques des amorces utilisées en RT-qPCR chez le Radix et la planaire			
Amorces planaires			
Déplacement (Planaire)			
Nom du gène	N° d'accession	N° primer	Séquence
Myosine 2	GBZN01001491.1	Pla_F36	GGTTGGATCGTCATCGTCTT
		Pla_R36	ATGCCACCGCATATTTTCTC
Titine	GBZN01008248.1	Pla_F37	TGATCAGTCGGTGTGCAAAT
		Pla_R37	TAAAAATAGCCCCGTTGTGC
Dynein	GBZN01002589.1	Pla_F38	CGGAAGTCAAGGCTGCTATC
		Pla_R38	CATCAGGCCTGGATTGTTTT
L-plastin	GBZN01010833.1	Pla_F39	CAATCCATTGGCAAGTCAGA
		Pla_R39	GCGTAAACGTTTGCTCCAAT
Myosine 11	GBZN01009783.1	Pla_F40	TGCTCAGAAAGTCGCACATC
		Pla_R40	CCAGCCATCGAAACATTCTT
Calponine	GBZN01011862.1	Pla_F41	TCCAACCGGGAATCATTAAAG
		Pla_R41	TGTTTCGACCAAGTGCAAAAA
Ankyrin	GBZN01012149.1	Pla_F43	AATGATGCCAATGTTGACCA
		Pla_R43	CACAGCAAGATTTCCCCATT
Dystrophin :	GBZN01002917.1	Pla_F44	GCAAAGATTCCCCGAATACA
		Pla_R44	CGTGCCCATATCGTCTTTTT
RyR1:	GBZN01007355.1	Pla_F45	GTGGCAGGGGTGTTGTAAT
		Pla_R45	CCAAATCGAGAACCGAACAT
RyR2:	GBZN01014431.1	Pla_F46	TGGATGCTGATGGTAATGGA
		Pla_R46	TTTCCCGAGATTCGTCATA
Cholinergic receptor	GBZN01009501.1	Pla_F47	CCCGGGAATGTTTAAGTCAA
		Pla_R47	CTTTCTGCATTGCCTTTTCC
Rp1_ACES.1.2	GBZN01005269.1	Pla_F27	TGACCATTTTGCTCGCATTCC
		Pla_R27	CTGGCAGCCGGATTCAATTT
Rp1_contig_20905	GBZN01004070.1	Pla_F18	TCCTCGAAGCTCAATTGCTGT
		Pla_R18	AAAAACGCTGGCAATCGCTG
Rp1_LOC101861648.2.2	GBZN01015075.1	Pla_F34	CCCCAACGCAATTTGCAAGA
		Pla_R34	TAACCGGGTTTGACAGACA
Daf19	GBZN01009308.1	Pla_F48	GTGTCAGTGGGGTCGGTAGT
		Pla_R48	CGAGGTAATTGCTGTGCTGA
Che3	GBZN01002720.1	Pla_F49	ATCTGGAAACGAAACGGTTG
		Pla_R49	CGAGCTTCGTGTTCTCTTCC
Dynéine axonémale	GBZN01006623.1	Pla_F50	CGAGTCATCTGTGGCATTG
		Pla_R50	TCAACTTGTCGACGTTGAGC
osm6	GBZN01005374.1	Pla_F51	TGAGCTCAAATGCTGTTTGC
		Pla_R51	GGGTTTCAAATTGCGGAGTA
Che13	GBZN01001570.1	Pla_F52	CGTCCTCATTTGACAGGTT
		Pla_R52	TTAGCCCGTTGATTGATTCC
Osm5	GBZN01012029.1	Pla_F53	CGAGAAAACAGTGCCAAACA
		Pla_R53	ATGTTTCGTCCTCGAATTGC

FoxP2	GBZN01001521.1	Pla_F54	ATTACCGCCAGTTTCCTGTG
TAU	GBZN01001514.1	Pla_R54	TGTCTGATGGCATTITTTCCA
Cathepsine L	GBZN01003569.1	Pla_F55	TCCTTGGTCAACACTCGTCA
Dynactine	GBZN01000192.1	Pla_R55	TGCCTGAGCTTTTCTGTTGA
Saxo2	GBZN01013636.1	Pla_F56	TCATGGCGTCTTAGCAGTTG
Dynein (beta chain)	GBZN01002720.1	Pla_R56	GGTGACTGCCATTCAAAGGT
Cavéoline	GBZN01009097.1	Pla_F57	AACGGTATTTGCCACTTTGC
		Pla_R57	TCCCACAACCTGGACAATCA
		Pla_F58	CATGCATTCAGATGCTCCAT
		Pla_R58	CAGCCTTCCTCCTTCTTTT
		Pla_F59	ATCTGGAACGAAACGGTTG
		Pla_R59	CGAGCTTCGTGTTCTCTTCC
		Pla_F60	TCCTCACGCTCTCAATTCCT
		Pla_R60	ACAAAGTCCCATGCAAATCC
Digestion (Planaire)			
Nom du gène	N° d'accession	N° primer	Séquence
Gammaglutamyltranspeptidase	GBZN01000984.1	Pla_F61	GGATGGAGATGCGGTTTCTA
		Pla_R61	TGGTCTTTGATGCGGTACAA
Alanine glyoxylate amino transferase	GBZN01006012.1	Pla_F62	TGACAATTTTTGGGGCTTTC
		Pla_R62	AACAGCACAAAGCGAGAGGAT
Trypsine2	GBZN01013147.1	Pla_F63	AAACCAAGCGGAATTCAAAA
		Pla_R63	TTCATGGGGCTCAAAACAAT
Trypsine	GBZN01002858.1	Pla_F64	TTTCTGCAGTTCAGCGTGAC
		Pla_R64	TGGTTGCAGTGATTGCTAGG
Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase	GBZN01011072.1	Pla_F21	CGAAATCTCGGTCGATCGGA
		Pla_R21	CGGTGGGAGTCAACAACAGA
Alpha-L-fucosidase	GBZN01013010.1	Pla_F14	GCCAATTGCAATGCAGTTCG
		Pla_R14	GTTCACCTCCCTGCCAGTACC
Carbonyl reductase [NADPH] 1	GBZN01010415.1	Pla_F23	GTGTCCAGTATGTTGAGCCAGA
		Pla_R23	GCTTGTTTTGGCCAGCCTTT
Beta-galactosidase-1-like protein 2	GBZN01002446.1	Pla_F6	CGGTGGTCTTCTAGTTGGC
		Pla_R6	GGCTGTTCCCAAAGTCCCA
Amylase / glucosidase	GBZN01005699.1	Pla_F65	GCCGACGGGTTCTCTATAAT
		Pla_R65	CAGTTTCTCCGCTTTTCAGG
Reproduction (Planaire)			
Nom du gène	N° d'accession	N° primer	Séquence
Delta	GBZN01002169.1	Pla_F66	CGTTTGCCAGTTTCTTCACA
		Pla_R66	ACCGTTGAAGCAAGGATTTG
Furine	GBZN01013041.1	Pla_F67	CTCGTTGTGCTGGAGAAGTG
		Pla_R67	CAGGTCCCCAACTACCAGAA
Notch	GBZN01013235.1	Pla_F68	GAGTGGATATGGTGGCTCGT
		Pla_R68	GTATTGCAGGAATGGGGAAA
grn	GBZN01004689.1	Pla_F70	TCGAACGAAGTGCAAAGAGA
		Pla_R70	TACTGGCCATTCCATTGGTT

msy4	GBZN01008802.1	Pla_F71	TCCTCGAAAATCCGTTGAAG
		Pla_R71	CAACTCCACGTCCCATACCT
pka	GBZN01012671.1	Pla_F72	AGAGCAGCGACAATCCAAAC
		Pla_R72	TGCGTCAGCGATATTCATTC
tsp_1	GBZN01001493.1	Pla_F73	CAATGCTGTGGAGTCAATGG
		Pla_R73	AAGTAGCGCCACTCCAGCTA
thmg_1	GBZN01002043.1	Pla_F74	GTGGAAGGAAATGTCGCCTA
		Pla_R74	AAAATGCTGTCCATGCACCT
pde	GBZN01006787.1	Pla_F75	CTCCTTCGTCAGACCTCCAG
		Pla_R75	GCCGGTTGGTAAAGTTGAGA
plastin	GBZN01002831.1	Pla_F76	CGAGTGTTTATTGAGCCAGA
		Pla_R76	ACTCCCATCGAATTCATCCA
tkn-1	GBZN01008862.1	Pla_F77	CCGACGAAGAATTAGCGAAG
		Pla_R77	ACATTCGGTCGTCCTTTACG
tkn-2	GBZN01002284.1	Pla_F78	GCGAATGGTTTTCTGATGCT
		Pla_R78	TTCCCTCCATCGTCGAATAA
tkn-3	GBZN01007694.1	Pla_F79	AAATGGGCTGAAGTCAATGC
		Pla_R79	TGCAAACGAGTTTGAGCAAC
pp2	GBZN01014302.1	Pla_F80	CAATCGATCCCCTCAGTGAT
		Pla_R80	TACTGGCTGGTGGAAAGTGTG
tplh	GBZN01010670.1	Pla_F81	ACATGGGGTCCGATACAAAG
		Pla_R81	TCAATCTTGGTGGCAATTCA
Vitellogenin	GBZN01000803.1	Pla_F82	TGGATCAGATGGGGGAATAA
		Pla_R82	TCTTTGCCAAAAAGGGCTAA
Panthotenate kinase	GBZN01010715.1	Pla_F83	AGGCATGGCTCAAACAAATC
		Pla_R83	TTTGCCTGCCTCTGTATCAC
Détoxification (Planaire)			
Nom du gène	N° d'accension	N° primer	Séquence
Cytochrome P450 49A1	GBZN01008497.1	Pla_F84	GCCCTCTGGTAAATCATGG
		Pla_R84	ATTGCTGACCAATGCTTTCC
MRP1/2	GBZN01006843.1	Pla_F9	GTTTTTACGGATTGCGAGCA
		Pla_R9	CGAGTCCCGATAGCCAAGTA
cytochrome P450 3A5	GBZN01003456.1	Pla_F85	CCATGTTTGAATGCACATC
		Pla_R85	AAAAGTAGCACGGCCAAAAA
cytochrome P450 2G1 (EROD)	GBZN01014641.1	Pla_F86	TCCCAATTTTGGCATTCTC
		Pla_R86	GCCAGCGTCCTGAAAAATTA
cytochrome P450 3A29	GBZN01008993.1	Pla_F35	ACGAAACTACCGCAGTTCA
		Pla_R35	GGGACGCTGGAGGACAAATT
GST	GBZN01008988.1	Pla_F87	AAGAGCCATTGGCCAAATTA
		Pla_R87	CTCTCCAGCGAAAAATCCTG
CAT	GBZN01002816.1	Pla_F88	TCGACAATTGTGCCAAAAAG
		Pla_R88	CAAATGGCTGGTTAGGTTGG
SOD	GBZN01014938.1	Pla_F89	GCTGATGCCAGTGGAAAAAGT
		Pla_R89	TCCAACTACTCCGCATGCTA
Eya	GBZN01011554.1	Pla_F91	TGCAACGGTAATTCGGAAAC

Rootletin	GBZN01009041.1	Pla_R91	ACTGCCGTTGAAGCATCTTT
		Pla_F92	CTGAGGAAGCCAAGGATCAC
Smed_cubilin	GBZN01014042.1	Pla_R92	TGTTTGGAATCCCCTAGCTG
		Pla_F93	TCATTAGATGCGTTTGCTC
Smed_Plastin	GBZN01010833.1	Pla_R93	TGGGTCTAAGGACCATCCAG
		Pla_F94	CAATCCATTGGCAAGTCAGA
Smed_Alkaline phosphatase_1	GBZN01008839.1	Pla_R94	GCGTAAACGTTTGCTCCAAT
		Pla_F95	TATGGACGCCACCGTAAAT
Smed_Carbonic_Anhydrase	GBZN01004159.1	Pla_R95	AACTTCTGGATGGCGTTGAG
		Pla_F97	TGATCATTCTGCGGAACAAA
Smed_HCO ₃ ⁻ _transporter	GBZN01010710.1	Pla_R97	CGGCCAGGTTTTACCATTTA
		Pla_F98	CACCTAAGAGTGGGCCGATA
Smed_Na ⁺ /H ⁺ _exchanger	GBZN01002666.1	Pla_R98	GGATCAGCATGGCTTTCTTC
		Pla_F99	CCGGTCAATTTATCGGTCAC
Smed_Na ⁺ /Ca ²⁺ _exchanger	GBZN01001122.1	Pla_R99	TCCATCTGCATCGATAATCA
		Pla_F100	ACTGTCAGCCCAGGAGAAAA
Smed_Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺	GBZN01000322.1	Pla_R100	ACAATGCACACCCAAAATGA
		Pla_F101	TTTGCAGGGAGTCAACCTCT
Alakaline Phosphatase 2	GBZN01006263.1	Pla_R101	CATTGGATTCAATTCGGACAA
		Pla_F102	GGAAAGTTGATGCAAAGGAAA
KCNE2	GBZN01012443.1	Pla_R102	TGTCAATTTTCCCTCCTTCG
		Pla_F104	CGCAACCAACAACTCAGAA
		Pla_R104	TGTTTTCGGACGGGTAATC
Système nerveux (Planaire)			
Nom du gène	N° d'accession	N° primer	Séquence
Sphingomyelinase phosphodiesterase	GBZN01000533.1	Pla_F105	TCGAGCCCGTAAATGGTAAC
		Pla_R105	GTAACGGATTGGCGTAGGA
Synaptotagmin I	GBZN01012474.1	Pla_F106	ACGAGATGCCATTGGAGAAG
		Pla_R106	GAATGATCCGATCCGTGAGT
Otoferlin	GBZN01013867.1	Pla_F107	ATCGGTTCAAGCAATCTGG
		Pla_R107	AGCACTGGCGGATTAGACAT
SCN4A	GBZN01001217.1	Pla_F103	CGCAAGAAGAAGTCGGGATA
		Pla_R103	GGCAAGTCAAAGGAAACCAA
Six_1/2	GBZN01002787.1	Pla_F96	CGCCTCAAAGTTCTCCGTTA
		Pla_R96	AAAACCGGGCTAAACGATCT
POU class 3	GBZN01013546.1	Pla_F90	GGCTACACTCAAGCCGATGT
		Pla_R90	ATTTGTCGGCGATTCTGAAC
Presiniline	GBZN01005800.1	Pla_F69	GGTAGGGATGTTCTCACCA
		Pla_R69	TGATGGATGCAGAGAGGATG
Gènes de référence (Planaire)			
Nom du gène	N° d'accession	N° primer	Séquence
Aconitase	GBZN01003064.1	Aco_F1	ATTAGTGCCGCTGGAAAATG
		Aco_R1	AACCAAGAGATCCCTGCTT
CoxIV	GBZN01003284.1	Cox_F2	GGGAACACCTGAATGGTTGT

Ef1A	GBZN01008339.1	Cox_R2	ACGCCAGTTATAGGCTCGAA
		Ef1A_F2	ATCACCGGAACATCTCAAGC
		Ef1A_R2	TGTATGGTGGTTCGTTGAA
Fumarase	GBZN01013562.1	Fum_F1	GTTCTTCCCGTTGTCAAGA
		Fum_R1	GCCGGTATTCTGCTCATTGT
Plscr1	GBZN01001078.1	Plscr_F2	AGCTGCCTCGAACCAAGTTA
		Plscr_R2	GAACAAATCCCGACCACTGT
RPL13	GBZN01001828.1	Rpl_F2	AGGATTGGCAAAAGATGGTG
		Rpl_R2	CCTCTGCCTAAACGCAATTT
Succinate deshydrogénase	GBZN01008532.1	Succi_F1	TTAGCAACGGGAGGTTATGG
		Succi_R1	ACCTCGGCAACCTTCAGTAA
Amorces Radix			
Nom du gène	N° d'accension	N° primer	Séquence
	Rp1_ACES.1.2	F 1	ATAGAGACAGCCCGGGAGTT
		R 1	GGGTCCGTTGTGAGGAAGTA
	Rp1_CBR1	F 2	TGACTATGGCGAAACCAATG
		R 2	AGGCCTACGGACGACTGTTA
	Rp1_contig_00864 (Ref RPL18)	F 3	GACCCCTTTGGTGAACGAAGA
		R 3	CAAGGCCGTGAAGACAAGAT
	Rp1_contig_01011	F 4	AAAAGACACGCACGCACAC
		R 4	GTAGGAGCGTACGCCAACTT
	Rp1_contig_01288	F 5	CTCCGGGTTATTCCAGTGA
		R 5	GAGGTCCCTAGCCAGTCTCC
	Rp1_contig_01695	F 6	AATGTTGCCAGGGTTATTGC
		R 6	CTGACAAATGGCTCCGTCTT
	Rp1_contig_01993	F 7	GTGCCTTCAGGGGACTGTAA
		R 7	AATCTTTGTGCAGCCGATC
	Rp1_contig_02631	F 8	TAAAGCAAGGCTCCCAGTGT
		R 8	GCGTCGTAAACGGACTGAT
	Rp1_contig_04548	F 9	CAGTCCAGTGCCACCAGTAA
		R 9	TTGTCAATGAGCCCTTCTCA
	Rp1_contig_05517	F 11	TGGAAGGGCTGTTAGGACT
		R 11	GTTGCAGGAGCATGTCAGAG
	Rp1_contig_05989	F 12	GGCCCTCAGAGAAACATCAA
		R 12	ATGGCTAATGCAAAGGCATC
	Rp1_contig_07923	F 13	TGATTCACTGATCCCATCCA
		R 13	GCTGCGAGGGTCTCTACATC
	Rp1_contig_09129	F 14	GGCCTAGTGCCTTACACTGG
		R 14	GCGTCAAGCTGTTTGCTGTA
	Rp1_contig_09264	F 15	TCAGGTGGTTCATGTTGACG
		R 15	CTGATCGCGTAAGCTTGAT
	Rp1_contig_11706 (Ref Cortactin)	F 16	CGGAAGGATGAAGGAAATGA
		R 16	CCACCACCATTATGCCATGT
	Rp1_contig_12968	F 17	TTGCTTCTTAGTTATGTCCATCAG
		R 17	TGAAGCCAAGACTTCAAATTCA

Rp1_contig_13152	F 19	TGAAATCCCTTGTTTCAGAATGA
Rp1_contig_13618	R 19	GCATGCGTTTGATCTTGATG
Rp1_contig_13954	F 20	CCCGAATGAGAGTGTCTATC
Rp1_contig_16156	R 20	CACCTCTGAGCACGTAGTCG
Rp1_contig_16538	F 21	TGCCACAAGGGACACAATA
Rp1_contig_19175	R 21	TTGGATGTGGAGCAAATGAG
Rp1_contig_20905	F 22	GCCGTGCACAAAATATCTGA
Rp1_contig_22081	R 22	TCCTCGTCAACCAAACCTTC
Rp1_contig_22910	F 23	ATCACAGGGGCGTGTAATC
Rp1_contig_24357	R 23	TCAGAAATGCCACACTCAGC
Rp1_contig_24867	F 24	CGGGAAAGCAATAAGAGCTG
Rp1_contig_25496	R 24	CTGGATAGCCACCTTGCTG
Rp1_contig_28236	F 25	ACAAGCCGGTGTAGGAGATG
Rp1_contig_29006	R 25	CAACACGGAGGAACTCCATT
Rp1_contig_31128	F 26	CACACTTTGCTGGGTGTGTC
Rp1_contig_33362	R 26	ACACCCGTGAATCCTATCCA
Rp1_contig_33519	F 27	AGGTGTGTGGTTGGGATCAT
Rp1_contig_33698	R 27	TTCACCATCCTGGGATCAAT
Rp1_contig_34586	F 28	TTGGCCTGCCTAGTGTGAT
Rp1_contig_35127	R 28	CACAAGCCTCGACCTGAGA
Rp1_contig_36971	F 29	GCAGAGCAGGAGACGAAAAC
Rp1_contig_36978	R 29	AATGTTAGGCTACGGCGATG
Rp1_contig_37899	F 30	TCCAATGCAATCGTCAATGT
	R 30	GTTTGAGTTCAACGGGCAGT
	F 31	GTATTGGTGGTGGGGGATT
	R 31	ATGGGACGATTCTCTCATGC
	F 32	CTTTGGTGCCATTGATGATG
	R 32	AGTGGGCCGTGATTGAAATA
	F 33	TGGGTTAATTACAGCCATTGA
	R 33	AGGGGTTATCACTCCTTATTATCA
	F 34	CTCTGGCCAGCGTTAGTTTC
	R 34	GGCAATAGTCCGGAGTCAAG
	F 35	GAAGCCTCGGTCACTCCATA
	R 35	TGCATTTACAGGCGTCTAA
	F 36	GGCAGACATCAAAGCTGACA
	R 36	GACGGAGCAAACACTGTGAA
	F 37	CACAACAAATCAGTTAAGCTTCTG
	R 37	GGAAGCACTCAGTTCACACCT
	F 38	AGGGGCAAGAGAGGGAATTA
	R 38	TCACAATCTCAACCCGACAA
	F 39	ACCCGGTTAAGAAGGAGGAA
	R 39	CCACGGTGACCTTGAGAAAT
	F 40	GCAGAAGCAGATCAGGCATT
	R 40	ACTTCATATGCAGCCCTTGC
	F 41	GCCAAGGTAGTTGACGGAAA
	R 41	CGTCATGTATGGCAATTTTCG

Rp1_contig_38047	F 42	TCGGATCAATGGGAGGAATA
	R 42	ATGGCTCAGCTGTGACTGTG
Rp1_contig_38610	F 43	AGGTGAAGGTCGATGGTGAC
	R 43	CGCTGTTGATAAAACGCTGA
Rp1_contig_41364	F 44	ATGCGAAGCTTCTTTCCTGA
	R 44	TCTTTGCCCTACCAATGAC
Rp1_Fbn1.1.2	F 45	ACTGTGTCAATGGCGTGTGT
	R 45	GCCGTA CTGACCAGACACCT
Rp1_LOC100208653.1.2	F 47	AACAGCTGTGGCTGTAGAAGA
	R 47	GCCACGGCTAATCTTGTGT
Rp1_LOC100533548	F 48	GCATAAGCCAACTTTCCTGA
	R 48	GAGGGAGGATAGCATGAAAGAG
Rp1_LOC101732139.2.2	F 49	AGGAGGTCATACCCGGAAAA
	R 49	CTTGAGGATTGGTCGGTTG
Rp1_LOC101844963	F 50	GATGGCATGGCACCTATCTT
	R 50	CAAACGTCGTCAGGCTATCA
Rp1_LOC101845316.7.8	F 51	CCTGGCTACCCTTGTGGTAA
	R 51	ATCCGGTCAACGTTTCAGAG
Rp1_LOC101845447	F 52	GAGTTTGACGAGTCACCAA
	R 52	ACCACTCCCGTCATGTTGAT
Rp1_LOC101846931	F 53	TCTTGATCCTTGCTGCCTTT
	R 53	CAGCAGTTGGCATAAGACGA
Rp1_LOC101849024.2.2	F 54	GACATTGCTCCACCCAGTT
	R 54	TCCACAAGAAGGTCCTCACC
Rp1_LOC101849380	F 55	AATCCGGGGAATTCCAATAG
	R 55	GCCTGCTGTACGTCCTCAA
Rp1_LOC101849541.1.7	F 56	GGCCCTCAGAGAAACATCAA
	R 56	ATGGCTAATGCAAAGGCATC
Rp1_LOC101849541.2.7	F 57	ATCAGAGGCTTACGGTGAA
	R 57	TCAAGAAATCCATTGCCACA
Rp1_LOC101849541.7.7	F 58	GATTTTTGCCACAGCCATTT
	R 58	TGAGCTGCAGACTTGGTACG
Rp1_LOC101850460 (Ref EF1A)	F 59	CCTGGACACAGGGACTTCAT
	R 59	TTGACGCCTATGATGAGCTG
Rp1_LOC101852369.1.2	F 60	GGTTGTTGCTTGCCTTCAGT
	R 60	GGCCATAGAGGACATCCAGA
Rp1_LOC101853280.2.2	F 61	GGTTTTCGACTGCAAAGAGG
	R 61	TTGTTCTCCAACAGCGTCAC
Rp1_LOC101853696	F 62	AGGAGGATGATGCTGATTGG
	R 62	AGGGGCAATTACATCTTTGG
Rp1_LOC101853823	F 63	GATAACGAGGGCATCCTTGA
	R 63	CGCCGTCTGATATCCTTGAT
Rp1_LOC101855107.1.4	F 64	GGCTTACACACTGGCTGGAT
	R 64	CCGTGTAACCTGGAATGCT
Rp1_LOC101855193.1.2	F 65	CAAGAGGCCTTGGTGTTGTT
	R 65	CTACCCATGCAAGGAAGGAA

Rp1_LOC101855193.2.2	F 66	GTGAATGCGGAGGGGAACTA
Rp1_LOC101855555.1.3	R 66	GCCCAGCCAAAAACAAAGTA
Rp1_LOC101855914	F 67	CTCACAATCCTGGTGTCTGTG
Rp1_LOC101856763	R 67	TGCTGCTTTACATGCTTTGG
Rp1_LOC101857002	F 68	TGCAACAGTCCAAGACATGC
Rp1_LOC101858677	R 68	TGACTCATCAAGGGCAACAC
Rp1_LOC101859054	F 69	AGACGAGTTCTCAGGGTCCA
Rp1_LOC101859258.1.3	R 69	TTGCTCTGGATGTTGCAGTC
Rp1_LOC101859955.2.2	F 70	GTTTATGATGGGCAGGATCG
Rp1_LOC101860152.2.3	R 70	CAGAGCTGGCCAAAACCTAC
Rp1_LOC101860999.31.45	F 71	TTAGCAGTGGCATTGGACAG
Rp1_LOC101861648.2.2	R 71	AGGGTGGTATGGGAGGTGTT
Rp1_LOC101862413.2.3	F 72	GCCTGCAAAGATCTCAAACC
Rp1_LOC101862537	R 72	CAGTCGTGGGGTTGAATACC
Rp1_LOC101863302	F 73	GGTAAGCCCTCACTGTCAGC
Rp1_LOC101863471.1.9	R 73	ACCAATATCCCCATCAGTGG
Rp1_LOC101863642.4.7	F 74	CCAATGCAAACAGAGACCAA
Rp1_LOC102014543.2.4	R 74	CGACTTCTGCACCCTCTAC
Rp1_LOC102304721.1.2	F 75	CCAGGAGACCCGAACCTTACA
Rp1_LOC373215	R 75	AAAGCCAAATGGCAGAAATG
Rp1_LOC763190	F 76	TCTCGAACAATGCCTCACA
Rp1_MEGF6.8.16	R 76	CCCTGGGCTATGATAACGAA
Rp1_MORC4.2.2	F 77	AGAGCAATGCACGACTTCCT
	R 77	AACCATTGAAGGAGCAGGTG
	F 78	GTACCCGGACCTCTTTGACA
	R 78	ATCCGTCAGGTAGTCCCACA
	F 79	CCGAGTCAAAGATTCCCTTC
	R 79	TTTGTGGGTTCAATTTCTGT
	F 80	GGTTTTCGACTGCAAAGAGG
	R 80	TTGCTCTCAACAACGTCAC
	F 81	CCGCTGTCATCAATGTGTTT
	R 81	TCAAAGTCTTGGTGTACTGAA
	F 82	CCTTGTGCGAACCACTAC
	R 82	CCGCCTTTACATTTGGCTTA
	F 83	TCATTTGAGGGTTGCTATTCTT
	R 83	AATTTGTCAAACCTTGGCTCA
	F 84	TTGTGTGTGAGACATCTATAGTGAAAA
	R 84	AAAAACGTAATTTATTCAAAGGAAA
	F 85	AACAGGTTTCTGTGCCAAC
	R 85	GGCCACTCTCCAATGACAAT
	F 86	TGCCCTGAGTCATTCAAGTG
	R 86	AATCATGCAGGCCAGGTTAC
	F 87	ACGCTGTAGATGGGAACACC
	R 87	AAACCGTTTCAGTCGTTTTGG
	F 88	CTGAGGAATCAGGGTTGGAA
	R 88	TTTGGCTTTGTGCTCTCTGA

Rp1_MUA3	F 89	CATTGTTACACAGGGCGTTG
	R 89	AGTGCACAGGTGTTGGTCAG
Rp1_SMPD1	F 91	TACCCAACAAGCCCGTCTAC
	R 91	GAGTACACGCCACAGCGTAA
Rp1_TBB ref2	F 92	CGAGACCTACTGCATCGACA
	R 92	ATGTTGACTGCCAGCTTCCT
Rp1_Notch	F93	GTCACCGTCACCTCCTTCAG
	R93	CATCATCCCCACTTGGCCTT
Rp1_contig_08568	F94	TGCACCATTGGTATAGCCCC
	R94	GGCCAACCTTCCAGGACCAT
Rp1_contig_19175	F95	CAACCACCACACGGAGTCAT
	R95	GCTGGAAGGAAGGCAGTTCT
Rp1_LOC100533344	F96	AGGACTTCCTGCAGGACTCA
	R96	TGGCAGTACTGGTGGTTCAC
Rp1_LOC100880535	F97	TCACACGGGTTCTCATTGCA
	R97	GGCTACGAGTGTATCTGCCC
Rp1_LOC101859591 (Ref Fumarase)	F98	CGGGCTGGGAGAATTGACTT
	R98	GCAGGACGTTGCTGACAATC
Rp1_contig_04345 (Ref Aconitase)	F99	GCACTTGAGTTCCCAGGGAA
	R99	ACCTGGCAGTGGCATAATCC

Annexe 4 :

Table S1 Fold change of all differential expressed contigs from <i>R. balthica</i> under oxazepam exposure			
Down-regulated (Control VS T.A)			
Contig Name	Best hit accession	Best Hit Description	Fold Change
Rp1_contig_34053			0.051
Rp1_MORC4.2.2	XP_003317669	PREDICTED: MORC family CW-type zinc finger protein 4, partial [<i>Pan troglodytes</i>]	0.058
Rp1_LOC101853696	XP_005098306	PREDICTED: Dentin sialophosphoprotein-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.077
Rp1_contig_34046			0.085
Rp1_contig_33359			0.095
Rp1_CBR1	XP_003763459	PREDICTED: Carbonyl reductase [NADPH] 1 [<i>Sarcophilus harrisi</i>]	0.105
Rp1_contig_32770			0.111
Rp1_contig_03651			0.111
Rp1_contig_04231			0.119
Rp1_contig_32512			0.168
Rp1_contig_39289			0.204
Rp1_contig_05053			0.220
Rp1_contig_05989			0.272
Rp1_LOC101849541.1.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.285
Rp1_contig_31386			0.291
Rp1_LOC100533548	XP_005111242	PREDICTED: ADAM10 [<i>Aplysia californica</i>]	0.292
Rp1_contig_37628			0.300
Rp1_LOC101849541.2.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.307
Rp1_contig_31601			0.318

Rp1_LOC101849541.7.7	XP_005099982	PREDICTED: ADAM 17-like protease-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.328
Rp1_contig_27065			0.328
Rp1_contig_37418			0.331
Rp1_LOC101863642.4.7	XP_005112974	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101863642 [<i>Aplysia californica</i>]	0.337
Rp1_contig_42125			0.341
Rp1_contig_05722			0.356
Rp1_LOC101859258.1.3	XP_005102942	PREDICTED: Protocadherin Fat 4-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.358
Rp1_contig_20168			0.375
Rp1_contig_38788			0.382
Rp1_contig_39403			0.382
Rp1_contig_04548	ES572906.p.ls.1		0.394
Rp1_LOC101848170.2.2	XP_005091177	PREDICTED: Translation factor GUF1, mitochondrial-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.403
Rp1_LOC102304721.1.2	XP_005916073	PREDICTED: Probable E3 ubiquitin-protein ligase DTX2-like isoform X2 [<i>Haplochromis burtoni</i>]	0.406
Rp1_contig_36759			0.423
Rp1_contig_38610	E6ZJA8	Uncharacterised Beta-ketoacyl synthase [<i>Dicentrarchus labrax</i>]	0.436
Rp1_contig_32182			0.444
Rp1_LOC101863302	XP_005110056	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101863302 isoform X4 [<i>Aplysia californica</i>]	0.460
Rp1_contig_19175	BGLTMP011053-PA	Hypothetical protein	0.466
Rp1_contig_37899	GW7IPVU01C47HR.p.ls.1		0.480
Rp1_contig_10825			0.482
Rp1_contig_39832			0.496
Rp1_contig_36440			0.517
Rp1_contig_35106			0.539
Rp1_contig_33519	BGLTMP011029-PA	Hypothetical protein	0.549
Rp1_LOC101857002	XP_005091492	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101857002 isoform X1 [<i>Aplysia</i>]	0.551

		<i>californica</i>]	
Rp1_contig_03659	ES571700.p.ls.1		0.553
Rp1_contig_35127			0.560
Rp1_contig_36599			0.564
Rp1_MUA3	P34576	MUA3_CAEEL Transmembrane cell adhesion receptor mua-3 OS [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	0.565
Rp1_contig_00416			0.590
Rp1_contig_40203			0.605
Rp1_LOC101861648.2.2	XP_005093946	PREDICTED: Fibrillin-1-like, partial [<i>Aplysia californica</i>]	0.609
Rp1_contig_40932			0.613
Rp1_contig_31128			0.613
Rp1_LOC101860152.2.3	XP_005093674	PREDICTED: Cytochrome P450 3A29-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.617
Rp1_contig_17510			0.622
Rp1_contig_01813			0.628
Rp1_contig_40371			0.634
Rp1_contig_38845	GW7IPVU01AI3MF.p.ls.1		0.638
Rp1_LOC101858677	XP_005089513	PREDICTED: Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain- containing protein 2-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	0.642
Rp1_contig_01695	K1PY10	Uncharacterised Putative L-threonine 3-dehydrogenase [<i>Crassostrea gigas</i>]	0.646
Rp1_contig_41364	K1R2K2	Uncharacterised Periostin [<i>Crassostrea gigas</i>]	0.647
Rp1_SMPD1	XP_006203669	PREDICTED: Sphingomyelin phosphodiesterase [<i>Vicugna pacos</i>]	0.657
Rp1_contig_02631	BGLTMP009382-PA	Hypothetical protein	0.659
Rp1_contig_39999	GW7IPVU01ARYHJ.p.ls.1		0.668
Rp1_contig_41387			0.671
Rp1_MEGF6.8.16	Q80V70	MOUSE Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6 OS [<i>Mus musculus</i>]	0.671
Rp1_contig_41866			0.672

Rp1_contig_06284	ES573302.p.ls.1		0.679
Rp1_contig_37696			0.679
Rp1_contig_35921			0.681
Rp1_contig_33698	EKC35365	EKC35365 Description : Periostin	0.682
Rp1_LOC101849024.2.2	XP_005091185	PREDICTED: Pericentriolar material 1 protein-like isoform X5 [<i>Aplysia californica</i>]	0.686
Rp1_contig_42036	GW7IPVU01BVWB6.p.ls.1		0.695
Rp1_contig_31587	GW7IPVU01A1Z4Z.p.ls.1		0.697
Rp1_LOC101845316.7.8	XP_005096296	PREDICTED: Multidrug resistance-associated protein 1-like isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	0.697
Rp1_LOC101852369.1.2	XP_005089594	PREDICTED: Dedicator of cytokinesis protein 7-like isoform X6 [<i>Aplysia californica</i>]	0.702
Rp1_contig_02702	BGLTMP003797-PA	Hypothetical protein	0.713
Rp1_contig_01196			0.718
Rp1_contig_13954	K1Q965	Uncharacterised Protein NEF1 [<i>Crassostrea gigas</i>]	0.720
Rp1_LOC101853823	XP_005110352	PREDICTED: Beta-galactosidase-1-like protein 2-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.728
Rp1_contig_36971	XP_005106678.1	PREDICTED: glutathione S-transferase 3-like [<i>Aplysia californica</i>]	0.730
Rp1_LOC101862537	XP_005110307	PREDICTED: Calumenin-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	0.733
Rp1_contig_36978	A0A0B2V9E1	Uncharacterised Ribonuclease [<i>Toxocara canis</i>]	0.737
Rp1_contig_38047	K1QC26	Uncharacterised Plasma alpha-L-fucosidase [<i>Crassostrea gigas</i>]	0.745
Rp1_contig_07923			0.757
Up-Regulated (Control VS T.A)			
Contig Name	Best hit accession	Best Hit Description	Fold Change

Rp1_contig_36516	BGLTMP008682-PA	Hypothetical protein	1.366
Rp1_contig_03501			1.407
Rp1_contig_24277			1.439
Rp1_LOC101739898	XP_004933588	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101739898 [<i>Bombyx mori</i>]	1.447
Rp1_LOC101859955.2.2	XP_005103957	PREDICTED: Ganglioside GM2 activator-like [<i>Aplysia californica</i>]	1.454
Rp1_contig_06333			1.458
Rp1_contig_12968	EKC33205	Uncharacterised receptor-type tyrosine-protein phosphatase T [<i>Crassostrea gigas</i>]	1.459
Rp1_contig_13083			1.476
Rp1_LOC101856763	XP_005088876	PREDICTED: Puromycin-sensitive aminopeptidase-like isoform X2 [<i>Aplysia californica</i>]	1.507
Rp1_contig_19538			1.544
Rp1_contig_09129	EKC22995	EKC22995 Description : Amidase	1.545
Rp1_contig_19881			1.610
Rp1_contig_10965			1.611
Rp1_contig_39346			1.635
Rp1_LOC101855555.1.3	XP_005096347	PREDICTED: Centrosomal protein POC5-like isoform X3 [<i>Aplysia californica</i>]	1.636
Rp1_contig_05619			1.637
Rp1_contig_30150			1.648
Rp1_contig_20905	LotgiP221019		1.654
Rp1_contig_19882			1.657
Rp1_contig_25496	ES573003.p.ls.1		1.659
Rp1_contig_17309			1.673
Rp1_contig_29414	BGLTMP000184-PA	Hypothetical protein protein_coding LG12_random_Scaffold280:12803-21209:1 gene:BGLTMP000184	1.704
Rp1_contig_41404			1.704
Rp1_contig_25411			1.705

Rp1_contig_05779			1.715
Rp1_LOC101860999.31.45	XP_005107325	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101860999 [<i>Aplysia californica</i>]	1.735
Rp1_contig_01936			1.772
Rp1_contig_01861			1.775
Rp1_contig_29618			1.778
Rp1_LOC101853280.2.2	XP_005112645	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101853280 [<i>Aplysia californica</i>]	1.784
Rp1_contig_22484			1.828
Rp1_contig_30335			1.838
Rp1_contig_22910	GW7IPVU01C38UP.p.ls.1		1.843
Rp1_contig_39320			1.848
Rp1_contig_19848			1.865
Rp1_contig_32731			1.886
Rp1_contig_21747			1.938
Rp1_contig_14587			1.986
Rp1_contig_29006	XP_005301846	PREDICTED: Lysine-specific demethylase 6A-like isoform X8 [<i>Chrysemys picta bellii</i>]	1.999
Rp1_PFE0815w	XP_001351720	tRNA pseudouridine synthase, putative [<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7]	2.042
Rp1_LOC101857261.15.28	XP_005102678	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101857261 isoform X1 [<i>Aplysia californica</i>]	2.066
Rp1_contig_07361			2.078
Rp1_contig_23245			2.078
Rp1_contig_13618	K1QT99	Uncharacterised Hemagglutinin/amebocyte aggregation factor [<i>Crassostrea gigas</i>]	2.236
Rp1_contig_34417			2.245
Rp1_contig_24630			2.288
Rp1_contig_13152	BGLTMP000248-PA	Hypothetical protein	2.322
Rp1_contig_34586	BGLTMP004626-PA	Hypothetical protein	2.419
Rp1_contig_17953			2.449

Rp1_contig_22081	CN810345.p.ls.1		2.458
Rp1_contig_33362			2.615
Rp1_LOC101732139.2.2	XP_004919413	PREDICTED: Uncharacterized protein LOC101732139 [<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>]	2.673
Rp1_contig_25335			2.830
Rp1_contig_28236	XP_002734505	PREDICTED: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1-like [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>]	2.999
Rp1_LOC373215	XP_798111	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: Deleted in malignant brain tumors 1 protein [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	3.101
Rp1_contig_23341	LotgiP107859		3.252
Rp1_contig_05153	BGLTMP007253-PA	Hypothetical protein	3.871
Rp1_contig_30570			4.523
Rp1_contig_28740			8.173
Up-Regulated (Control VS T.B)			
Contig Name	Best hit accession	Best Hit Description	Fold Change
Rp1_contig_20905	K1QXB6	Otopetrin superfamily, PREDICTED: otopetrin-2-like [<i>Aplysia californica</i>]	1.644
Rp1_contig_33362			2.208