



**HAL**  
open science

**Les approches –omiques, métabolomique et protéomique,  
pour l'étude de la relation de cause à effet entre  
contaminants émergents, produits pharmaceutiques et  
organismes marins, *Mytilus galloprovincialis***

Thibaut Dumas

► **To cite this version:**

Thibaut Dumas. Les approches –omiques, métabolomique et protéomique, pour l'étude de la relation de cause à effet entre contaminants émergents, produits pharmaceutiques et organismes marins, *Mytilus galloprovincialis*. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTG026 . tel-03164580

**HAL Id: tel-03164580**

**<https://theses.hal.science/tel-03164580>**

Submitted on 10 Mar 2021

**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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Sciences de l'Eau

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche HydroSciences Montpellier

**Les approches –omiques (métabolomique & protéomique)  
pour l'étude de la relation de cause à effet entre  
contaminants émergents (produits pharmaceutiques) et  
organismes marins (*Mytilus galloprovincialis*)**

**Présentée par Thibaut DUMAS**

**Le 16 décembre 2020**

**Sous la direction de Frédérique COURANT  
et Elena GOMEZ**

**Devant le jury composé de**

François FENAILLE, Ingénieur - Chercheur, CEA

Jean Philippe ANTIGNAC, Ingénieur de recherche, ONIRIS-LABERCA

Marianne GRABER, Professeur, Université de La Rochelle

Damià BARCELO, Directeur de recherche, Catalan Institute for Water Research (ICRA)

Elena GOMEZ, Professeur, Université de Montpellier

Frédérique COURANT, Maître de conférences, Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président du jury

Co-directeur de thèse

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



## Résumé

Ces travaux de thèse s'insèrent dans le contexte de la contamination du milieu marin par les contaminants émergents, tels que les produits pharmaceutiques (PP), et de leurs effets sur les organismes marins. L'étude des liens de cause à effet entre l'exposition à un ou plusieurs contaminants et la réponse de la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, a été l'axe central des recherches présentées dans cette thèse. Afin de renseigner les mécanismes d'action et les potentiels effets toxiques des PP, données manquantes dans la littérature, les approches -omiques telles que la métabolomique et la protéomique ont été privilégiées. Les effets de l'antiépileptique carbamazépine (CBZ), un PP fréquemment détecté dans le milieu marin, ont dans un premier temps été investigués sur *M. galloprovincialis* à travers une approche intégrée de la métabolomique et de la protéogénomique. La stratégie de fusion des données appliquée a mis en évidence des signatures protéiques et métaboliques corrélées entre elles en réponse à l'exposition. L'utilisation d'outils bioinformatiques remettant les protéines et métabolites dans leur contexte biologique a ainsi révélé des changements concernant la synthèse des protéines, la dégradation des acides gras, la métabolisation des acides aminés et des glucides, et la programmation de la mort cellulaire. Bien que l'étude des effets d'un seul contaminant soit essentielle pour obtenir des informations d'ordre mécanistique, elle s'éloigne en revanche de la pertinence d'une exposition environnementale, les organismes étant exposés simultanément à une multitude de contaminants. Dans le but d'intégrer cette complexité, les moules *M. galloprovincialis* ont été exposées à un rejet de station d'épuration (STEP), voie d'entrée principale des PP dans le milieu marin. L'analyse des empreintes métaboliques générées a d'abord été effectuée sur les moules mâles afin d'écartier la variabilité biologique liée au sexe (susceptible de masquer la réponse à l'exposition). Plusieurs voies métaboliques ont ainsi été révélées comme impactées (ex. acides aminés, bases puriques et pyrimidiques, cycle de Krebs, neurohormones, etc.) pouvant perturber plusieurs fonctions et processus biologiques (ex. métabolisme énergétique, système immunitaire, osmorégulation, reproduction, formation du byssus, etc.) et avoir des conséquences néfastes sur l'organisme. En se basant sur la littérature, des hypothèses de relation de cause à effet ont pu être établies entre certains contaminants détectés dans le rejet de STEP (38 PP et 4 pesticides) et les effets observés. A partir de cette même expérimentation, le facteur sexe a ensuite été intégré dans le traitement des données issues des individus mâles/femelles et exposés/non-exposés afin de comprendre le rôle du sexe dans la réponse à l'exposition. Pour cela, l'approche statistique *Analyse of variance Multiblock Orthogonal Partial Least Square* s'est révélée pertinente pour ce genre de design expérimental multifactoriel. Cette approche a ainsi pu associer la variabilité des données métabolomiques à leur(s) facteur(s) d'origine(s). Une réponse commune entre les deux sexes, reliée au facteur exposition, a été mise en évidence à travers la modulation de plusieurs lysophospholipides induite par un stress oxydant. Tandis qu'une réponse sexe-dépendante, reliée à l'interaction entre les facteurs sexe et exposition, a été décrite suite à une modulation de certains lipides polaires selon le sexe et une perturbation de la voie de la kynurénine uniquement chez les mâles. Ces travaux de thèse ont pu renforcer les connaissances sur les effets d'un PP préoccupant pour l'environnement, la CBZ, exclue de tout cadre réglementaire, ainsi que sur les effets d'une exposition proche des conditions environnementales reconstituées à travers un rejet de STEP. Des approches originales d'investigation des effets et d'analyses des données ont été pertinemment appliquées.



## Abstract

This PhD thesis takes place in a context of the contamination of marine environment by emerging contaminants, such as pharmaceutical active compounds (PhAC), and their effects on marine organisms. The study of causal relationships between exposure to one or more contaminants and the response of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, was the central focus of the research presented in this thesis. In order to provide information on the mechanisms of action and potential toxic effects of PhAC, data lacking in the literature, -omic approaches such as metabolomics and proteomics were applied. The effects of the antiepileptic carbamazepine (CBZ), a PhAC frequently detected in the marine environment, were first investigated on *M. galloprovincialis* through an integrated approach of metabolomics and proteogenomics. The data fusion strategy applied revealed correlated protein and metabolic signatures in response to exposure. The use of bioinformatics tools that put proteins and metabolites into their biological context thus highlighted changes in protein synthesis, fatty acid degradation, amino acid and carbohydrate metabolism, and cell death programming. Although the study of the effects of a single contaminant is essential to obtain mechanistic information, it is far removed from the relevance of environmental exposure, since organisms are exposed simultaneously to a multitude of contaminants. In order to integrate this complexity, mussels *M. galloprovincialis* were exposed to a wastewater treatment plant (WWTP) effluent, the main pathway of PhAC into the marine environment. Analysis of the metabolic fingerprints generated was first performed on male mussels to rule out gender-related biological variability (which could hide the response to exposure). Several metabolic pathways were thus revealed to be impacted (e.g. amino acids, purines and pyrimidines, Krebs cycle, neurohormones, etc.) which can disrupt several biological functions and processes (e.g. energy metabolism, immune system, osmoregulation, reproduction, byssal formation, etc.) and have adverse consequences on the organism. Based on the literature, hypotheses of causal relationships have been established between certain contaminants detected in the WWTP effluent (38 PPs and 4 pesticides) and the effects observed. Based on the same experiment, the gender factor was then integrated into the processing of data acquired from male/female and exposed/unexposed individuals in order to understand the role of gender in the response to exposure. To this end, the statistical approach of Analysis of Variance Multiblock Orthogonal Partial Least Square proved to be relevant for this kind of multifactorial experimental design. This approach was thus able to characterize and relate the variability of metabolomics data to its different factors of origin. A common response between the two genders, related to the exposure factor, was demonstrated through the modulation of several lysophospholipids induced by oxidative stress. While a gender-specific response, related to the interaction between gender and exposure factors, has been described following a modulation of certain polar lipids according to gender and a disruption of the kynurenin pathway only in males. This thesis work was able to strengthen knowledge on the effects of a PhAC of concern for the environment, CBZ, excluded from any regulatory framework, as well as on the effects of an exposure close to the environmental conditions reconstituted through a WWTP effluent. Original approaches to effects investigation and data analysis have been pertinently applied.



## Remerciements

Ce travail de thèse mérite le remerciement d'un bon nombre de personnes qui, chacun à leur manière, a tout simplement rendu possible cette expérience (dans de bonnes conditions !).

Je tiens avant tout à exprimer ma reconnaissance envers les membres du jury pour l'évaluation de ce travail. Je remercie Messieurs François Fenaille, Ingénieur-Chercheur au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Saclay, et Jean Philippe Antignac, Ingénieur de recherche au Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) et à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation (ONIRIS), d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Je remercie au même titre, Madame Marianne Graber, Professeur à l'Université de La Rochelle, et Monsieur Damià Barceló, Directeur de Recherche à l'Institut Catalan de Recherche sur l'Eau (ICRA), d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je tiens grandement à remercier mes deux directrices de thèse, Frédérique Courant et Elena Gomez, les deux piliers de cette expérience, qui m'ont soutenu jusqu'au bout. Merci Fred pour ton enthousiasme, ta bienveillance et tes nombreuses connaissances que tu as su me transmettre. Merci Elena d'avoir pu te rendre disponible malgré ton emploi du temps si chargé, et de tes conseils qui ont su me faire prendre du recul sur mon travail. Merci à toutes les deux d'avoir œuvré à la valorisation de mes travaux à travers des expériences très enrichissantes comme les congrès scientifiques (merci les Journées Scientifiques du RFMF !).

J'adresse un grand remerciement à l'ensemble de l'équipe CONTEM : Mireille, David, Abdel, Aurélie, Serge, Hélène, Elena, Fred et Geoffroy (le petit dernier), pour leur accueil, leur générosité et toute la dynamique qui émane de cette belle cohésion. Merci à vous pour tous ces moments de partage : les repas « découvertes », les dissections *party*... souvent suivies d'une raclette, toutes ces pauses gourmandes (dont on ne connaîtra jamais la recette des milles trous) et ces quelques balles de Padel échangées (je sais, je n'ai pas encore le niveau). Ce fut tout simplement agréable de travailler dans cette bonne ambiance. Evidemment, cette expérience n'aurait pas été aussi vivante sans tous les stagiaires, doctorants et post-doc, Bénilde (oui ça compte), Monica, Nancy, Gaëlle, Rayana, Chan, Lucie, Rocio, Linsey, Isabelle, Andres, Juan, Christina : merci !

Cette thèse a grandement bénéficié de la collaboration avec Julien Boccard et Christine Almunia, que je tiens sincèrement à remercier pour leur travail de grande qualité et tous ces échanges scientifiquement et humainement très enrichissants.

Je souhaite remercier Bénédicte Marion et Céline Roques pour leur soutien dans la préparation d'une bonne centaine de standards analytiques, ainsi que Nicolas Creusot de nous avoir partagé son expérience sur Compound Discoverer et TraceFinder.

Je tiens également à remercier le laboratoire de Toxicologie et Biochimie des Substances Bioactives (Institut National Universitaire J-F. Champollion, Albi), et plus particulièrement Florence Géret, Alice Saunier et Elsa Bonnafé de m'avoir accueilli à deux reprises pour l'extraction d'ARN.

Merci à mes amis, Joris, Rémy, Lisa et toute la team D&D pour ces innombrables heures passées ensemble, en immersion dans un autre univers (loin de la thèse !). Merci aux copains de master (Fakho, Elisa, Totor, Elisane, Ramoutcho, Mégane et Sam) d'être restés unis et de continuer à prendre des nouvelles des uns et des autres malgré la distance. Une pensée à tous ceux que je n'ai pas pu voir (ou peu) durant ces trois années, à bientôt je l'espère !

Merci à ma famille qui m'a soutenue tout le long, surtout dans les moments difficiles (oui il y en a eu quelques-uns quand même), et spécialement à ma mère, redoutable terreur pour les coquilles. Merci particulièrement à mes grands-parents de m'avoir hébergé la première année et pour tous ces petits plats qui en ont fait saliver plus d'un.

Merci infiniment à celle qui m'a encouragé, supporté et aimé. Merci à toi, Julia. A nos trois ans, et à toutes ces belles années devant nous.

# Valorisations des travaux de thèse

## Publications scientifiques

- Dumas T., Bonnefille B., Gomez E., Boccard J., Ariza-Castro N., Fenet H., Courant F., 2020. **Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to WWTP effluent extract.** *Science of The Total Environment* 712, 136551. Impact Factor: 6.551 – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136551
- Dumas T., Boccard J., Gomez E., Fenet H., Courant F., 2020. **Multifactorial analysis of environmental metabolomic data in ecotoxicology: wild marine mussel exposed to WWTP effluent as a case study.** *Metabolites* 10, 269. Impact Factor: 4.097 – <https://doi.org/10.3390/metabo10070269>
- Dumas T., Almunia C., Boccard J., Gomez E., Duporté G., Fenet H., Courant F. **An integrated metabolomics and proteogenomics approach reveal metabolic alterations following by carbamazepine exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*.** *In preparation*
- Ariza-Castro N., Courant F., Dumas T., Marion B., Fenet H., Gomez E. **Elucidating venlafaxine metabolism in the mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by combining of targeted and non-targeted approaches.** *In preparation*
- Courant F., Fenet H., Bonnefille B., Dumas T., Gomez E., 2020. **Chapter 8 - Mass spectrometry to explore exposome and metabolome of organisms exposed to pharmaceuticals and personal care products.** In Álvarez-Muñoz D., Farré M. (Eds.), *Environmental Metabolomics: Applications in field and laboratory studies to understand from exposome to metabolome – 1<sup>st</sup> Edition.* Elsevier, pp. 235-257. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818196-6.00008-X>

## Communications orales

- Dumas T., Bonnefille B., Gomez E., Boccard J., Fenet H., Courant F. **Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to WWTP effluent extract.** Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 30<sup>th</sup> Annual Meeting, ~~Dublin (Ireland)~~ Virtual, May 3-7, 2020
- Dumas T., Bonnefille B., Gomez E., Boccard J., Fenet H., Roques C., Courant F. **Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to WWTP effluent.** 17<sup>th</sup> International Conference on Chemistry and the Environment (ICCE), Thessaloniki (Greece), June 16-20, 2019

- Courant F., Dumas T., Gomez E., Bonnefille B., Fenet H. **Etude des effets d'une exposition à des résidus de médicaments (seuls ou en mélange) chez la moule méditerranéenne par approche métabolomique.** Journée du Réseau Occitanie Métabolomique (ROcMe), Montpellier (France), 22 janvier 2019
- Dumas T., Bonnefille B., Gomez E., Boccard J., Fenet H., Courant F. **Approche métabolomique : étude des effets d'un rejet de station d'épuration sur un organisme marin (*Mytilus galloprovincialis*).** Colloque Société d'Écotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Montpellier (France), 27-28 juin 2018
- Dumas T., Bonnefille B., Gomez E., Boccard J., Fenet H., Courant F. **Investigation of the effects of a wastewater treatment plant effluent on the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* through a metabolomics approach.** 11<sup>ème</sup> Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), Liège (Belgique), 22-25 mai 2018
- Dumas T., Bonnefille B., Gomez E., Boccard J., Fenet H., Courant F. **Investigation des effets d'un rejet de station d'épuration chez le bivalve marin *Mytilus galloprovincialis* à travers l'approche métabolomique.** 4<sup>ème</sup> Journées des Doctorants de l'Institut Montpellierain de l'Eau et de l'Environnement (IM2E), Montpellier (France), 22 mars 2018 — **Prix de la meilleure communication orale**

## Réalisation guide métabolomique

- Support initiatique à l'approche métabolomique non ciblée par LC-HRMS (Power Point) ;
- Tutoriel : Approche métabolomique – Etape par étape, de l'extraction des données brutes à l'identification des métabolites (Power Point) ;
- Tutoriel : Améliorer et faciliter l'identification des métabolites – Etape par étape, création d'une base de données de spectres MS/MS *via* le logiciel TraceFinder v4.1 de Thermo Scientific (Power Point).

## Encadrement

- Stagiaire M2 Linsey Mouatcho (Université de Bordeaux) : Etude de l'endo- et xéno-métabolome chez la moule méditerranéenne : création d'une base de données spectrales des métabolites endogènes et développement d'une méthode d'extraction de la carbamazépine et ses produits de biotransformation. 6 janvier – 12 juin 2020
- Initiation de stagiaires et doctorants à l'acquisition des données par LC-HRMS et au traitement de leurs données métabolomiques.

# Table des matières

<b>Liste des figures</b> .....	i
<b>Liste des tableaux</b> .....	v
<b>Liste des abréviations</b> .....	vi
<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique &amp; Objectifs de thèse</b> .....	7
1. Produits pharmaceutiques et milieu marin : une préoccupation environnementale ?.....	8
1.1. Produits pharmaceutiques et législation : que dit la réglementation ?.....	8
1.2. Principales sources et voies d'entrée dans le milieu marin .....	9
1.3. Les STEP conventionnelles : peu efficaces contre les PP.....	11
1.4. Occurrence des produits pharmaceutiques dans le milieu marin .....	14
1.4.1. Eaux marines .....	14
1.4.2. Sédiments marins .....	16
1.4.3. Organismes marins.....	17
1.5. Devenir des PP dans le biotope et le biota.....	19
1.5.1. Facteurs abiotiques .....	19
1.5.2. Facteurs biotiques .....	21
1.6. Effets néfastes sur les organismes marins .....	23
1.7. Conclusion sur la problématique des PP en milieu marin.....	29
2. Relation de cause à effet entre contaminants et organismes : différents niveaux de complexités .....	30
2.1. Molécule seule : cas de la carbamazépine .....	32
2.1.1. Toxicocinétique : absorption, distribution, métabolisme, excrétion .....	32
2.1.2. Mécanisme d'action .....	35
2.1.3. Effets néfastes sur les invertébrés .....	37
2.1.4. Relier les effets à différents niveaux d'organisation biologique pour mieux agir : vers l'« Adverse Outcome Pathway » .....	40
2.2. Mixtures générées en laboratoire.....	42
2.3. Mélange complexe : contamination représentative du milieu .....	45
2.3.1. Mise en évidence des liens de causalité dans le cas d'échantillons environnementaux complexes.....	45
2.3.2. Effets des rejets de station d'épuration sur les invertébrés marins .....	47
2.4. Conclusion & perspectives de recherche .....	50
3. Des approches innovantes pour l'étude de la relation de cause à effet.....	51
3.1. L'entrée des -omiques en écotoxicologie.....	51

3.2.	La métabolomique au service de l'environnement.....	52
3.2.1.	Définition, principe & objectifs .....	53
3.2.2.	Etapas de l'approche métabolomique non ciblée.....	56
3.2.2.1.	Design expérimental.....	56
3.2.2.2.	Collecte des échantillons.....	58
3.2.2.3.	Préparation des échantillons.....	58
3.2.2.4.	Analyse des échantillons .....	60
3.2.2.5.	Prétraitement de données .....	63
3.2.2.6.	Analyses statistiques .....	68
3.2.2.7.	Elucidation structurale .....	71
3.2.2.8.	Visualisation & Interprétation des données métabolomiques .....	74
3.2.3.	Application de l'approche métabolomique à la problématique des produits pharmaceutiques dans l'environnement .....	78
3.3.	Les bases de l'approche protéomique .....	80
3.4.	Approches combinées : métabolomique et protéomique .....	83
3.4.1.	Intégration conceptuelle .....	83
3.4.1.1.	Intégration basée sur les voies métaboliques ou les ontologies .....	83
3.4.1.2.	Intégration basée sur les réseaux biologiques .....	84
3.4.2.	Intégration statistique .....	85
3.4.3.	Le point en écotoxicologie.....	86
4.	Organisme d'étude : <i>Mytilus galloprovincialis</i> , la moule méditerranéenne.....	88
4.1.	Ecologie & répartition .....	88
4.2.	Un genre d'intérêt, une espèce sentinelle .....	88
4.3.	Anatomie de la moule .....	90
4.4.	Reproduction & cycle de vie.....	92
4.5.	Physiologie de la moule.....	95
4.5.1.	Alimentation & métabolisme .....	95
4.5.2.	Système nerveux & récepteurs sensoriels .....	97
4.5.3.	Système immunitaire .....	98
4.6.	Qu'en est-il du génome, protéome et métabolome de la moule méditerranéenne ? ...	101
4.7.	Conclusion .....	102
5.	Objectifs de thèse & Stratégie de recherche .....	103

**Chapitre 2 : Evaluation des effets de la carbamazépine sur la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* : étude du métabolome et du protéome** .....

1.	Introduction et présentation de l'article n°1 .....	107
----	---	-----

2.	Article n°1 .....	109
2.1.	Introduction.....	109
2.2.	Materials & Methods.....	112
2.2.1.	Chemicals.....	112
2.2.2.	Animals, experimental design and sample collection .....	112
2.2.3.	Extraction and analysis of carbamazepine and its metabolites .....	113
2.2.3.1.	Seawater exposure – Solide Phase Extraction (SPE) method .....	113
2.2.3.2.	Mussel soft tissues – QuEChERS method.....	114
2.2.3.3.	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry method.....	114
2.2.4.	Metabolomics analyses .....	115
2.2.4.1.	Sample preparation.....	115
2.2.4.2.	Data acquisition and quality control .....	115
2.2.4.3.	Data pre-processing .....	116
2.2.4.4.	Metabolites annotation and identification .....	116
2.2.4.5.	Differential metabolite abundance analysis .....	116
2.2.5.	Proteogenomics analyses.....	117
2.2.5.1.	Protein extraction.....	117
2.2.5.2.	Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry method .....	117
2.2.5.3.	Peptides assignation and proteomics data analysis.....	117
2.2.5.4.	Differential protein abundance analysis .....	118
2.2.6.	Metabolomics and proteogenomics data fusion .....	118
2.2.7.	Bioinformatics analysis.....	119
2.3.	Results .....	121
2.3.1.	Analysis of carbamazepine and its metabolites .....	121
2.3.1.1.	In seawater.....	121
2.3.1.2.	In soft tissue .....	121
2.3.2.	Effects of carbamazepine on digestive gland of <i>M. galloprovincialis</i> .....	123
2.3.2.1.	Metabolomics and proteomics integrated analysis.....	123
2.3.2.2.	Proteome analysis .....	125
2.3.2.3.	Metabolome analysis .....	131
2.3.2.4.	Global analysis of metabolic pathways integrating impacted proteins and metabolites.....	133
2.4.	Discussion .....	142
2.4.1.	Métabolisation de la CBZ chez la moule <i>M. galloprovincialis</i> .....	142
2.4.2.	Effets de la CBZ sur le protéome et le métabolome de la glande digestive de la moule <i>M. galloprovincialis</i> .....	142

2.5. References.....	149
2.6. Supplementary data .....	155

**Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition**

.....	156
1. Introduction et présentation de l'article n°2 .....	157
2. Article n°2 .....	159
2.1. Introduction.....	160
2.2. Materials & Methods.....	162
2.2.1. Chemicals.....	162
2.2.2. WWTP effluent extract preparation.....	162
2.2.3. Animals and experimental design .....	162
2.2.4. Tissue sample preparation .....	163
2.2.5. Metabolic fingerprint LC-HRMS analysis .....	163
2.2.6. Quality control.....	164
2.2.7. Data processing and statistical analysis .....	164
2.2.7.1. Data processing .....	164
2.2.7.2. Statistical analysis.....	165
2.2.8. Metabolite annotation and identification strategy.....	165
2.2.9. Characterization of the WWTP effluent extract.....	166
2.3. Results .....	167
2.3.1. Characterization of the WWTP effluent extract.....	167
2.3.2. Metabolic fingerprint LC-HRMS analysis .....	170
2.3.2.1. Analytical performance and statistical analysis .....	170
2.3.2.2. Metabolite modulation and pathway analysis.....	171
2.4. Discussion .....	176
2.4.1. Energy metabolism.....	179
2.4.2. Osmoregulation.....	180
2.4.3. DNA and RNA synthesis.....	181
2.4.4. Immune system .....	181
2.4.5. Byssus formation and adhesion .....	181
2.4.6. Reproduction.....	182
2.4.7. Defense mechanisms.....	182
2.5. Conclusion .....	183
2.6. References.....	184

2.7.	Supplementary data .....	191
3.	Discussion & Conclusion.....	209
<b>Chapitre 4 : Importance du design expérimental : prise en compte du sexe en réponse à l'exposition au rejet de STEP – Application d'une analyse statistique multifactorielle sur les données métabolomiques.....</b>		
1.	Introduction et présentation de l'article n°3 .....	211
2.	Article n°3.....	213
2.1.	Introduction.....	214
2.2.	Materials & Methods.....	216
2.2.1.	Chemicals.....	216
2.2.2.	WWTP effluent extract preparation.....	217
2.2.3.	Animals and experimental design .....	217
2.2.4.	Tissue sample preparation .....	217
2.2.5.	Metabolic fingerprint LC-HRMS analysis .....	218
2.2.6.	Data processing and statistical analysis .....	219
2.2.6.1.	Data processing .....	219
2.2.6.2.	Analysis of variance Multiblock Orthogonal Partial Least Squares (AMOPLS)....	219
2.2.6.3.	Multivariate metabolite selection and univariate statistical evaluation .....	219
2.2.7.	Metabolite annotation and identification.....	220
2.3.	Results & Discussion.....	221
2.3.1.	General overview of the dataset.....	221
2.3.2.	Contribution of experimental factors to the total variability.....	221
2.3.3.	Impact of exposure.....	222
2.3.4.	Impact of the interaction exposure × gender .....	225
2.3.5.	Perspective of environmental metabolomics in ecotoxicology based on multifactorial experiments.....	227
2.4.	Conclusion .....	229
2.5.	References.....	230
2.6.	Supplementary data .....	233
3.	Discussion & Conclusion.....	234
<b>Discussion générale .....</b>		<b>237</b>
<b>Conclusion générale.....</b>		<b>247</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>254</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> : Sources et voies d'entrée des produits pharmaceutiques (PP) dans l'environnement comprenant les milieux d'eaux douces, terrestres et marins (le réceptacle terminal). Les flèches en rouge représentent les voies d'entrée directes des PP dans le milieu marin (modifié de OECD, 2019). .....	10
<b>Figure 1.2</b> : Pertinence mécanistique ou écologique selon le niveau d'organisation biologique étudié (Source : IRSN).....	30
<b>Figure 1.3</b> : Schématisation des concepts de toxicocinétique et de toxicodynamie .....	31
<b>Figure 1.4</b> : Métabolisme principal de la carbamazépine (CBZ) dans le foie (A) et par les leucocytes (B). Pour les composés hydroxylés, seule l'hydroxylation en position 2 est représentée (adaptée de Breton et al., 2005).....	33
<b>Figure 1.5</b> : Cinétique d'accumulation (jour 0 à 7) et de dépuration (jour 7 à 13) de la carbamazépine (CBZ) et d'un autre composé (la 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazépine ; 10OH ; métabolite actif de l'oxcarbazépine) chez <i>M. galloprovincialis</i> exposée à 10 µg/L de CBZ (ou de 10OH). La courbe correspond au modèle cinétique de premier ordre. La lettre « A » indique une absence de différence significative tandis que « a » et « b » sont significativement différents (Boillot et al., 2015). .....	34
<b>Figure 1.6</b> : Cadre conceptuel de l' « Adverse Outcome Pathway » (adapté d' Ankley et al., 2010)....	40
<b>Figure 1.7</b> : Réseau d'AOP composé de quatre AOPs individuels, chacun représentant une séquence unique d'évènements clés (KEs) reliant un évènement moléculaire initiateur (MIE) à un effet néfaste (AO) : AOP 1 [MIE1, KE1, KE2, KE3, AO1, AO2]; AOP 2 [MIE2, KE4, KE1, KE2, KE3, AO1, AO2]; AOP 3 [MIE1, KE1, KE2, KE5, KE6, AO3]; AOP 4 [MIE2, KE4, KE1, KE2, KE5, KE6, AO3] (modifié de Villeneuve et al., 2014). .....	41
<b>Figure 1.8</b> : Paradigme général pour l'évaluation des effets de mélanges (adaptée d' Eggen et al., 2004). .....	42
<b>Figure 1.9</b> : Evaluation de la toxicité aiguë de la mixture acide clofibrique + carbamazépine (A) et de la mixture ibuprofène + diclofénac (B) sur l'immobilisation de <i>Daphnia magna</i> prédite par les modèles de Concentration-Addition et d'Action Indépendante, en comparaison avec les toxicités individuelles de chaque composé (Cleuvers, 2003). .....	43
<b>Figure 1.10</b> : Illustration des deux approches (A) Effect-Directed Analysis (EDA ; Analyse Orientée vers les Effets) et (B) Toxicity Identification Evaluation (TIE ; Évaluation et Identification de la Toxicité), pour l'étude du lien de causalité entre des échantillons environnementaux complexes (i.e. mélange de contaminants) et des effets observés sur un système biologique (Burgess et al., 2013). .....	46

<b>Figure 1.11</b> : Vue schématique de la stratégie descriptive de l’approche métabolomique pour apporter des connaissances en écotoxicologie. ....	55
<b>Figure 1.12</b> : Capacité de l’approche métabolomique à établir une relation de cause à effet à travers l’analyse de l’endo- et du xéno-métabolome. ....	55
<b>Figure 1.13</b> : Déroulement de l’ensemble des étapes constituant l’approche métabolomique non-ciblée. Les informations et abréviations accompagnant chacune des étapes seront détaillées dans les sous-parties qui suivent. ....	56
<b>Figure 1.14</b> : Structure des données tridimensionnelles générées par LC-MS (source : Daniel Norena-Caro, Wikipédia) .....	63
<b>Figure 1.15</b> : Différentes étapes du traitement de données en métabolomique non ciblée, utilisant plusieurs outils fonctionnant sous environnement R .....	64
<b>Figure 1.16</b> : Illustration de l’algorithme centWave appliquée à l’étape de peak detection effectuée par XCMS (Domingo-Almenara and Siuzdak, 2020) .....	65
<b>Figure 1.17</b> : Représentation graphique d’une ACP ou d’une PLS-DA. Score plot : carte factorielle du poids des individus ; Loading plot : carte factorielle du poids des variables (Roux et al., 2011). ....	71
<b>Figure 1.18</b> : Stratégie pour parvenir à l’identification d’un métabolite selon les 4 niveaux d’annotation décrits par Sumner et al. (2007) (modifiée de Rathahao-Paris et al., 2015).....	72
<b>Figure 1.19</b> : Réseau métabolique représenté par des nœuds (i.e. métabolites) reliés par des traits (i.e. connexion entre les métabolites). En rouge sont représentés les métabolites ayant un fort degré de centralité et en bleu le métabolite ayant une forte centralité intermédiaire. ....	76
<b>Figure 1.20</b> : Illustration des résultats issus de l’outil MetPA pour l’analyse des voies métaboliques. (A) Visualisation de l’analyse globale, (B) visualisation des voies métaboliques, (C) visualisation des métabolites (Xia and Wishart, 2010). ....	77
<b>Figure 1.21</b> : Stratégie de l’approche protéogénomique en relation avec des organismes d’étude non-séquencés (Gouveia et al., 2019). ....	81
<b>Figure 1.22</b> : Vue d’ensemble de l’analyse conjointe d’enrichissement des voies avec l’analyse topologique combinant à la fois les protéines et métabolites identifiés (Feng et al., 2018).....	84
<b>Figure 1.23</b> : Carte métabolique des protéines et métabolites impactés par l’exposition du poisson <i>Danio rerio</i> à l’oxyde de graphène (Sun et al., 2019). ....	87
<b>Figure 1.24</b> : Répartition géographique des espèces de moules du genre <i>Mytilus</i> (Gaitán-Espitia et al., 2016).....	88
<b>Figure 1.25</b> : Structure anatomique du genre <i>Mytilus</i> spp. (modifiée de González Fernández, 2016) 90	
<b>Figure 1.26</b> : Section histologique des gonades de moules mâles et femelles, colorées avec hématoxyline/éosine. (A) Stade 0 ; (B) Stade 1 ; (C) Stade 2, femelle ; (D) Stade 2, mâle ; (E) Stade 3,	

femelle ; (F) Stade 3, mâle ; (G) Stade 4, femelle ; (H) Stade 4, mâle (González-Fernández et al., 2016). .....	93
<b>Figure 1.27</b> : Représentation schématique du système nerveux chez les moules <i>Mytilus</i> spp. (modifiée de Zwann and Mathieu, 1992) .....	98
<b>Figure 1.28</b> : Représentation schématique des différentes étapes de la phagocytose et de l'encapsulation (rectangles bleus) ainsi que de l'intervention des facteurs humoraux (rectangles oranges) (Soudant et al., 2013). .....	100
<b>Figure 2.1</b> : Consensus OPLS score plots of the two conditions solvent control exposure versus low dose exposure (SCvsLD) ( <b>A</b> ) and solvent control versus high dose (SCvsHD) ( <b>B</b> ). Shared and Unique Structure (SUS) plot integrating both comparisons SCvsLD and SCvsHD with common and specific modulations ( <b>C</b> ). The thresholds are represented with black lines and irrelevant variables are shaded. The numbers correspond to different modulation patterns, specific or common to the two doses. ....	124
<b>Figure 2.2</b> : Venn diagrams highlighting specific and common variables (metabolites and proteins) between both comparisons solvent control exposure versus low dose exposure (SCvsLD) and solvent control versus high dose (SCvsHD). Results are given for the selected signals according to the SUS-plot and then for the annotated ones. ....	125
<b>Figure 2.3</b> : Gene ontology classification of proteins that were expressed in digestive gland of mussels exposed to low and high dose of carbamazepine. ....	126
<b>Figure 2.4</b> : KEGG pathways in which the regulated proteins are involved at the low and high dose of carbamazepine. ....	127
<b>Figure 2.5</b> : Folding, sorting and degradation processes disrupted by exposure to low and high doses of carbamazepine. ....	128
<b>Figure 2.6</b> : Hierarchical classification of regulated proteins into protein families at the low and high dose, using the KEGG BRITE database.....	130
<b>Figure 2.7</b> : Distribution of regulated enzymes according to their function after an exposure to carbamazepine at a low (SCvsLD) and high dose (SCvsHD). ....	131
<b>Figure 2.8</b> : Global metabolic pathways analysis based on significantly regulated proteins and modulated metabolites in digestive gland of <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposed to a low dose of carbamazepine (80 ng/L). Features with several annotations are marked with an apostrophe " ' " ....	136
<b>Figure 2.9</b> : Global metabolic pathways analysis based on significantly regulated proteins and modulated metabolites in digestive gland of <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposed to a low dose of carbamazepine (8 µg/L). Features with several annotations are marked with an apostrophe " ' " .....	137

**Figure 3.1:** PCA score plot of metabolic fingerprints from control (green circle) and exposed (red triangle) mussels showing a clustering pattern between these two conditions. In blue (cross), QC are clustered. The numbers represent the injection order. .... 170

**Figure 3.2:** Partial map of phenylalanine and tyrosine metabolism in the response of *M. galloprovincialis* to a WWTP effluent exposure extract. Metabolites modulated by exposure are shown in bold, while metabolites not detected or not modulated are not in bold. The red arrow corresponds to down-modulation and the green arrow to up-modulation (exposed compared to control). Direct connections between metabolites are indicated with full arrows. .... 175

**Figure 3.3:** Partial map of tryptophan metabolism in the response of *M. galloprovincialis* to a WWTP effluent extract exposure. Metabolites modulated by exposure are shown in bold, while metabolites not detected or not modulated are not in bold. Red arrows correspond to down-modulation and green arrows to up-modulation (exposed compared to control). Direct connections between metabolites are indicated with full arrows while indirect connections are shown with dashed arrows. .... 175

**Figure 3.4:** Partial map of purine metabolism (A) and pyrimidine metabolism (B) in the response of *M. galloprovincialis* to a WWTP effluent extract exposure. Metabolites modulated by exposure are shown in bold, while metabolites not detected or not modulated are not in bold. Red arrows correspond to down-modulation and green arrows to up-modulation (exposed compared to control). Direct connections between metabolites are indicated with full arrows, while indirect connections are shown with dashed arrows. Underlined metabolites of the same color correspond to several possible annotations for the same feature. .... 176

**Figure 4.1:** Effect-specific variable importance in the projection (VIP<sup>2</sup>) values for the 50 highest ranked metabolites according to the impact of the Exposure factor. .... 222

**Figure 4.2:** Boxplots illustrating an exposure-specific modulation of LPC (14:0/0:0) in both male and female mussels (A) and a gender-specific modulation of 1-pentadecanoyl-glycero-3-phosphate only in males (B). Different letters (a and b) mean significant difference (q-value < 0.05) between relative abundances. .... 223

**Figure 4.3:** Effect-specific variable importance in the projection (VIP<sup>2</sup>) values for the 50 highest ranked metabolites according to the impact of the interaction Gender × Exposure. .... 225

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1:</b> Concentrations de PP (ng/L) appartenant à différentes classes thérapeutiques retrouvées dans l'effluent d'une STEP française de 55 000 équivalent-habitants avec un traitement primaire, un traitement secondaire aérobic et une étape de déphosphoration, selon le mois d'avril ou mai (Chiffre et al., 2016).....	12
<b>Tableau 1.2 :</b> Principaux effets de diverses classes thérapeutiques de PP sur les organismes marins.	27
<b>Tableau 1.3 :</b> Spécificité des deux approches Effect-Directed Analysis (EDA ; Analyse Orientée vers les Effets) et Toxicity Identification Evaluation (TIE ; Évaluation et Identification de la Toxicité) (Burgess et al., 2013).....	47
<b>Table 2.1:</b> Quantification of CBZ and its metabolites in seawater exposure (ng/L) and in mussels soft tissue (ng/g) from the different exposure conditions. ....	122
<b>Table 2.2:</b> Relevant proteins selected by the models, involved in the transport and catabolism cellular process. ....	128
<b>Table 2.3:</b> Over-representation analysis of pathways based on metabolites modulated at the low and high carbamazepine doses... ..	131
<b>Table 2.4:</b> Regulated proteins and modulated metabolites involved in common metabolic pathways.....	138
<b>Table 3.1:</b> Detected pharmaceutically active compounds and pesticides in the WWTP effluent extract. ....	168
<b>Table 3.2:</b> List of the main metabolic pathways modulated by exposure to WWTP effluent extracts in male mussel digestive glands, considering also metabolites with a p-value < 0.1. ....	172
<b>Table 4.1:</b> Relative variability and block contributions of the AMOPLS analysis of metabolomic data acquired from digestive glands of male and female mussels ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) exposed to WWTP effluent extract. ....	221

## Liste des abréviations

**5-HT** : sérotonine (5-hydroxytryptamine)

**AC** : adénylate cyclase

**AChE** : acétylcholinestérase

**ACP** : analyse en composante principale

**AMOPLS** : *analys of variance multiblock orthogonal partial least square* (ANOVA Multiblock OPLS)

**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique

**ANOVA** : analyse de la variance

**AOP** : *Adverse Outcome Pathway*

**APCI** : ionisation chimique à pression atmosphérique

**APPI** : photo-ionisation à pression atmosphérique

**BCF** : facteur de bioconcentration

**CAH** : classification ascendante hiérarchique

**CAT** : catalase

**CBZ** : carbamazépine

**CEC** : capacité d'échange cationique

**ChemRICH** : *Chemical Similarity Enrichment Analysis*

**CV** : coefficient de variation

**CYP3A4** : cytochromes P450 3A4

**Da** : Dalton

**DCSMM** : Directive Cadre « Stratégie Milieu Marin »

**DDT** : dichlorodiphényltrichloroéthane

**EIC** : chromatogramme de l'ion extrait

**EDA** : *Effect-Directed Analysis*

**EI** : ionisation électrique

**EMA** : Agence Européenne du Médicament

**EPA** : Agence Américaine de Protection de l'Environnement

**ESI** : l'ionisation par électrobulisation (ou électrospray)

**ETM** : éléments traces métalliques

**FDR** : *False Discovery Rate*

**GC** : chromatographie en phase gazeuse

**GNPS** : *Global Natural Product Social Molecular Networking*

**GO** : *gene ontology*

**GR** : glutathion réductase

**GSH** : glutathion

**GST** : glutathion-S-transférases

**HAP** : hydrocarbures aromatiques polycycliques

**HILIC** : chromatographie liquide à interaction hydrophile

**HMDB** : *Human Metabolome Database*

**HRMS** : spectrométrie de masse à haute résolution

**IFREMER** : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

**IPCS** : Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques

**KEGG** : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

**LC** : chromatographie en phase liquide

**LEEM** : Les Entreprises du Médicament

**LLE** : Extraction liquide-liquide

**LOESS** : *Locally Estimated Scatter-plot Smoother*

**LPO** : peroxydation lipidique

**MetPA** : *Metabolomics Pathway Analysis*

**MS** : spectrométrie de masse

**MXR** : mécanisme de résistance cellulaire aux xénobiotiques

**NCBI** : *National Center for Biotechnology Information*

**NIST** : *National Institute of Standards and Technology database*

**NOEC** : *No Observed Effect Concentration*

**OCDE** : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PAMM** : Plans d'Actions pour le Milieu Marin

**PAMPs** : *pathogen-associated molecular patterns*

**PCB** : polychlorobiphényles

**PLS-(DA)** : *Partial Least Squares (Discriminant Analysis)* ou régression aux moindres carrés partiels

**POCIS** : *Polar Organic Chemical Integrative Samplers*

**PP** : produits pharmaceutiques

**QC** : contrôle qualité

**QSPR** : quantitatives structures-propriétés

**RMN** : résonance magnétique nucléaire

**RNA-Seq** : séquençage de l'ARN

**RNO** : Réseau d'Observation National

**ROI** : région d'intérêt

**ROS** : espèces réactives à l'oxygène

**RPLC** : chromatographie en phase inverse

**RT** : temps de rétention

**SIMV** : Syndicat de l'industrie du médicament et diagnostic vétérinaires

**SOD** : superoxyde dismutase

**SPE** : extraction sur phase solide

**STEP** : station d'épuration

**TIE** : *Toxicity Identification Evaluation*

**UE** : Union Européenne

**UPLC** : chromatographie liquide ultra performante

**VIP** : *Variable Importance in Projection*

# Introduction générale

---

L'aube du XXI<sup>e</sup> siècle est marqué par la détection de contaminants dits « émergents » sur l'ensemble du globe, quelque soit le type de milieu (eau, air, sol). Le terme « émergent » exprime en réalité la détection récente de ces contaminants à l'état de trace (ng/L ; déjà présent dans l'environnement bien avant leur détection), grâce au développement d'instruments et de méthodes analytiques plus performants. Les contaminants émergents, ou devrait-on dire contaminants de préoccupation émergente, font référence à de nombreuses molécules de l'industrie « moderne » pour lesquelles peu de mesures réglementaires sur leur conception et rejet ont été établies en faveur de l'environnement, par faute de données. Cela concerne les retardateurs de flammes bromés, les produits pharmaceutiques et de soins personnels, les nanoparticules, les plastifiants, les surfactants, etc. (Sauvé and Desrosiers, 2014).

Parmi ces contaminants, les produits pharmaceutiques (PP) regroupent une vaste diversité de molécules comptant plus de 4000 composés. Les PP sont répartis en de nombreuses classes balayant un large spectre d'effets thérapeutiques (ex. anti-inflammatoires, psychotropes, cardiovasculaires, hormones stéroïdiennes, antibiotiques, etc.). Un des faits marquant est l'augmentation sans répit de la consommation de ces substances et par conséquent, de leur rejet dans l'environnement. Pour témoigner de cette ampleur, la consommation des PP atteindrait globalement 4500 milliards de doses en 2020, soit environ 24 % de plus qu'en 2015 ; dans le même temps, 50 % de la population mondiale peut maintenant consommer plus d'une dose par personne et par jour (QuintilesIMS Health, 2015). Contrairement aux autres contaminants détectés dans l'environnement, les PP sont à l'origine conçus pour avoir une activité biologique à très faible dose et modifier des fonctions physiologiques chez l'être humain, les animaux d'élevages et les animaux domestiques. Par conséquent, les PP sont susceptibles d'avoir une activité biologique sur la faune sauvage et produire des effets non désirés. De nos jours, les PP sont donc considérés parmi les contaminants émergents de plus grande préoccupation environnementale (Boxall et al., 2012; Caliman and Gavrilescu, 2009; Daughton and Ternes, 1999; Fabbri and Franzellitti, 2016; Fent et al., 2006; Kümmerer, 2009; Mezzelani et al., 2018). Les PP, détectés dans tous les milieux aquatiques, pourraient participer à l'accélération du déclin de la biodiversité, et notamment celle du milieu marin déjà très fragilisée par la pression anthropique (i.e. relatif à l'activité humaine).

Les zones côtières comprennent certains des écosystèmes les plus productifs, à hauts services écosystémiques<sup>1</sup>, et les plus attractifs au monde (Crain et al., 2009; Liqueste et al., 2013). Ces zones comptent également parmi les plus fortement dégradées par la pression anthropique qui ne cesse d'augmenter (Crain et al., 2009). La croissance démographique sur les côtes s'accompagne de

---

<sup>1</sup> Notion d'évaluation économique et marchande de la biodiversité et des services fournis par les écosystèmes, fondée sur une vision anthropocentrée de la nature.

nombreuses activités humaines tant sur terre qu'en mer, avec pour conséquence un impact menaçant sur les environnements marins. La perte de la biodiversité est la conséquence majeure de ces activités, dont les trois causes principales sont la surexploitation, la destruction des habitats et en troisième position, la pollution (organique et inorganique) (Kappel, 2005; Venter et al., 2006). Les PP, inclus dans la pollution en top 3 du classement, sont en revanche exclus de tout cadre réglementaire relatif à leur rejet dans l'environnement. Ainsi, la forte augmentation de la consommation des PP de concert avec une croissance démographique continue sur les littoraux positionnent les écosystèmes marins comme des zones exposées aux PP et potentiellement menacées.

A l'heure actuelle, les connaissances scientifiques ne permettent pas d'expliquer clairement l'impact des PP sur les organismes dans leur milieu et le risque qu'ils représentent sur le long terme pour les écosystèmes marins. Des études expérimentales, menées dans des conditions contrôlées de laboratoire, ont toutefois démontré divers effets néfastes des PP sur la croissance, la reproduction, le comportement, le système immunitaire, etc., des organismes marins (Fabbri and Franzellitti, 2016a; Mezzelani et al., 2018; Prichard and Granek, 2016). Cependant, très peu d'études ont révélé comment les PP agissent sur l'organisme pour causer de tels effets, c'est-à-dire, par quel(s) mécanisme(s) d'action y parviennent-ils. Connaître le mécanisme d'action d'un PP offrirait une meilleure compréhension de ses effets observés en laboratoire et donc des relations de cause à effet. Ainsi, l'enrichissement des connaissances sur la relation de cause à effet aiderait à la mise au point d'outils de biosurveillance plus spécifiques aux PP (ex. biomarqueurs d'effet ou d'exposition), ainsi que des outils conceptuels pour une évaluation des risques plus précise (ex. *Adverse Outcome Pathways*). Cette thèse a pour **premier objectif** d'étudier la relation de cause à effet entre l'exposition à un PP, la carbamazépine, et la réponse biologique d'un organisme marin, la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*. La carbamazépine est un antiépileptique persistant dans les milieux aquatiques et fréquemment détecté dans les tissus d'organismes marins tels que *M. galloprovincialis* (Mezzelani et al., 2020), dont divers effets néfastes sont référencés sans que les mécanismes d'action soient bien renseignés.

Cette notion de relation de cause à effet se complexifie lorsque les conditions d'exposition tendent vers des conditions environnementales plus réalistes. En effet, dans l'environnement un PP ne se trouve pas seul mais co-existe avec d'autres PP ainsi qu'une multitude de contaminants divers et variés. Intégrer progressivement cette complexité dans les études expérimentales permettrait une compréhension plus réaliste de l'impact des PP et des contaminants en général sur le milieu marin. Le **deuxième objectif** de cette thèse est donc d'investiguer les liens de causalité entre l'exposition à un mélange représentatif de la contamination environnementale, tel qu'un effluent de station d'épuration, et la réponse biologique de la moule *M. galloprovincialis*.

Afin d'étudier les relations de cause à effet entre contaminants et réponse des organismes marins, nous avons favorisé dans cette thèse l'application des approches -omiques. Ces approches offrent une vision intégrative des processus moléculaires interagissant à différents niveaux : le génome, le transcriptome, le protéome et le métabolome. Parmi ces approches, la métabolomique, introduite récemment dans les sciences environnementales, vise à étudier les produits finaux des processus de régulation sous-jacents, les métabolites, et est donc plus étroitement liée à la condition biologique de l'organisme (Miracle and Ankley, 2005). Ainsi, l'étude du métabolome donne accès à deux types d'information pertinents pour l'étude des liens de causalité : l'endo-métabolome et le xéno-métabolome. L'endo-métabolome, ensemble des métabolites endogènes produits naturellement par le métabolisme, témoigne des perturbations métaboliques induites par une exposition, tandis que le xéno-métabolome, ensemble des substances chimiques exogènes retrouvées et parfois biotransformées dans l'organisme, reflète la présence des contaminants en cause de ces perturbations métaboliques. L'accès à ces informations est essentiel pour comprendre les mécanismes d'action des PP sur l'organisme, et faire le lien vers des effets néfastes, à l'échelle individuelle et sub-individuelle. Certains de ces effets ont pu être déjà rapportés dans la littérature. La métabolomique peut toutefois gagner à être combinée avec l'étude des niveaux antérieurs (ex. transcriptomique, protéomique) pour une meilleure interprétation mécanistique de l'action des PP sur l'organisme.

La moule *Mytilus galloprovincialis*, choisie comme organisme d'étude pour ces travaux de thèse, est un organisme marin largement intégré dans des programmes de biosurveillance des milieux en raison de ses qualités d'espèce sentinelle (ex. large répartition géographique, sessile, bioaccumule les contaminants, tolérante aux variations environnementales). Toutefois, travailler avec un organisme sauvage nécessite d'intégrer la variabilité biologique intra-spécifique qui peut être élevée, parfois jusqu'à masquer la réponse à une exposition. Le **troisième objectif** de cette thèse est d'intégrer un facteur biologique supplémentaire dans le design expérimental, le sexe, afin de mieux relier la variabilité biologique observée par l'approche métabolomique à ses différentes origines, et ainsi de mieux comprendre le rôle de ce facteur dans la réponse à l'exposition à l'effluent de STEP.

Le **premier chapitre** de cette thèse, présenté sous forme d'une synthèse bibliographique, vise dans un premier temps à décrire l'état actuel de la problématique des PP dans le milieu marin. La relation de cause à effet entre contaminants et réponse de l'organisme étant une notion centrale de cette thèse, ce chapitre traite dans un deuxième temps l'évolution de cette notion dès lors que l'on tend vers une intégration de la complexité des conditions environnementales en termes d'exposition (molécule seule → mixture de molécules connues → mélange complexe). Dans un troisième temps, les

approches –omiques comme la métabolomique et la protéomique sont introduites comme des approches pertinentes pour l'étude de la relation de cause à effet, offrant des informations d'ordre mécanistique actuellement manquantes dans le contexte des PP. Comme il est essentiel de bien connaître son organisme d'étude afin de correctement répondre aux questions de recherche posées, la quatrième partie est réservée à l'intérêt porté pour la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* ainsi qu'à la description de sa biologie. Enfin, la synthèse bibliographique s'ouvre sur les objectifs de cette thèse accompagnés des différentes stratégies mises en œuvre pour y répondre.

Le **chapitre 2**, présenté sous la forme d'un article scientifique, permet de répondre au premier objectif posé : investiguer les mécanismes d'action et les effets toxicologiques potentiels de l'antiépileptique carbamazépine, préoccupant pour l'environnement, chez la moule *M. galloprovincialis*. Ce travail est l'occasion de proposer une stratégie d'intégration des approches métabolomique et protéomique pour l'étude des liens de causalité entre un PP et la réponse d'un organisme marin. Cette étude est complétée par l'analyse des voies de biotransformation de la carbamazépine chez la moule, important pour mieux comprendre les interactions entre ce composé et l'organisme.

Le **chapitre 3**, en lien avec le deuxième objectif, concerne l'intégration de la complexité d'une exposition représentative des conditions environnementales. Cela se traduit par l'étude des effets d'un effluent de station d'épuration, voie d'entrée principale des PP dans l'environnement, sur la moule *M. galloprovincialis*, à travers une approche métabolomique non-ciblée. L'étude de la relation de cause à effet est rendue possible par la caractérisation chimique de l'effluent de station d'épuration qui, combinée avec une étude bibliographique approfondie, permet d'établir des liens entre les effets observés et les contaminants présents. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique intitulé *Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve Mytilus galloprovincialis exposed to a WWTP effluent extract* publié en 2020 dans la revue *Science of the Total Environment*.

Le **chapitre 4** répond au troisième objectif, concernant l'implication du sexe de la moule *M. galloprovincialis* dans la réponse biologique suite à l'exposition à l'effluent de station d'épuration. Cette étude permet de présenter pour la première fois en écotoxicologie une méthode d'analyse multivariée originale pour le traitement et l'interprétation des données métabolomiques issues d'un design expérimental multifactoriel. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique intitulé *Multifactorial analysis of environmental metabolomic data in ecotoxicology: wild marine mussel exposed to WWTP effluent as a case study* publié en 2020 dans la revue *Metabolites*.

## Introduction générale

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de deux projets financés par l'ANSES, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (AMeCE 2015/1/091), et l'Agence Nationale de la Recherche (IMAP ANR-16-CE34-0006-01).

# Chapitre 1

---

## Synthèse bibliographique & Objectifs de thèse

## 1. Produits pharmaceutiques et milieu marin : une préoccupation environnementale ?

Pour comprendre le risque que représentent les PP, et mettre en place des réglementations et des plans de gestions adaptés pour la protection de ces milieux, il est indispensable de rassembler des connaissances sur leur présence et comportement dans l'environnement, ainsi que leur impact sur les organismes. Cette partie a pour objectif dans un premier temps de replacer les PP dans leur contexte législatif, puis de faire le point sur l'état des connaissances actuelles relatives à leurs sources et voies d'entrée dans le milieu marin, leur occurrence et concentrations ainsi que leur devenir dans les différents compartiments de l'environnement (biotope et biota). Enfin, les principaux effets renseignés des PP sur les organismes marins seront détaillés à différents niveaux d'organisations biologiques (i.e. moléculaire, cellulaire, tissulaire, organique, individuel et populationnel). La mise en évidence de zones d'ombres rencontrées dans la littérature constituera la base de nouvelles perspectives de recherche.

### 1.1. Produits pharmaceutiques et législation : que dit la réglementation ?

A présent, différentes organisations gouvernementales et non-gouvernementales, incluant l'Union Européenne (UE), l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (EPA), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ou encore le Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques (IPCS), considèrent la pollution des milieux et mettent en place des directives et des cadres juridiques afin de protéger et d'améliorer la qualité des ressources en eau douce. Néanmoins, aucune mesure réglementaire n'a encore fixé des seuils limitants le rejet des PP dans l'environnement. A l'échelle européenne, la Directive Cadre sur l'Eau a établi une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance, contenant actuellement 3 hormones ( $17\alpha$ -éthynylestradiol,  $17\beta$ -estradiol et estrone) et 5 antibiotiques, dont 3 macrolides (amoxicilline, ciprofloxacine ; macrolides : erythromycine, clarythromycine et azithromycine). Les antibiotiques macrolides ont été inclus en tant que groupe dans cette liste de vigilance pour tenir compte du fait que des substances possédant le même mode d'action pourraient avoir des effets additifs. Jusqu'à la décision d'exécution 2018/840/EU du 5 juin 2018, le diclofénac (anti-inflammatoire non stéroïdien) faisait partie de cette liste. La Commission européenne a décidé de retirer le diclofénac, argumentant que suffisamment de données de surveillance d'une qualité élevée étaient disponibles pour cette substance. La liste de vigilance a pour but de soutenir le processus de priorisation lors des futures révisions de la directive des substances prioritaires.

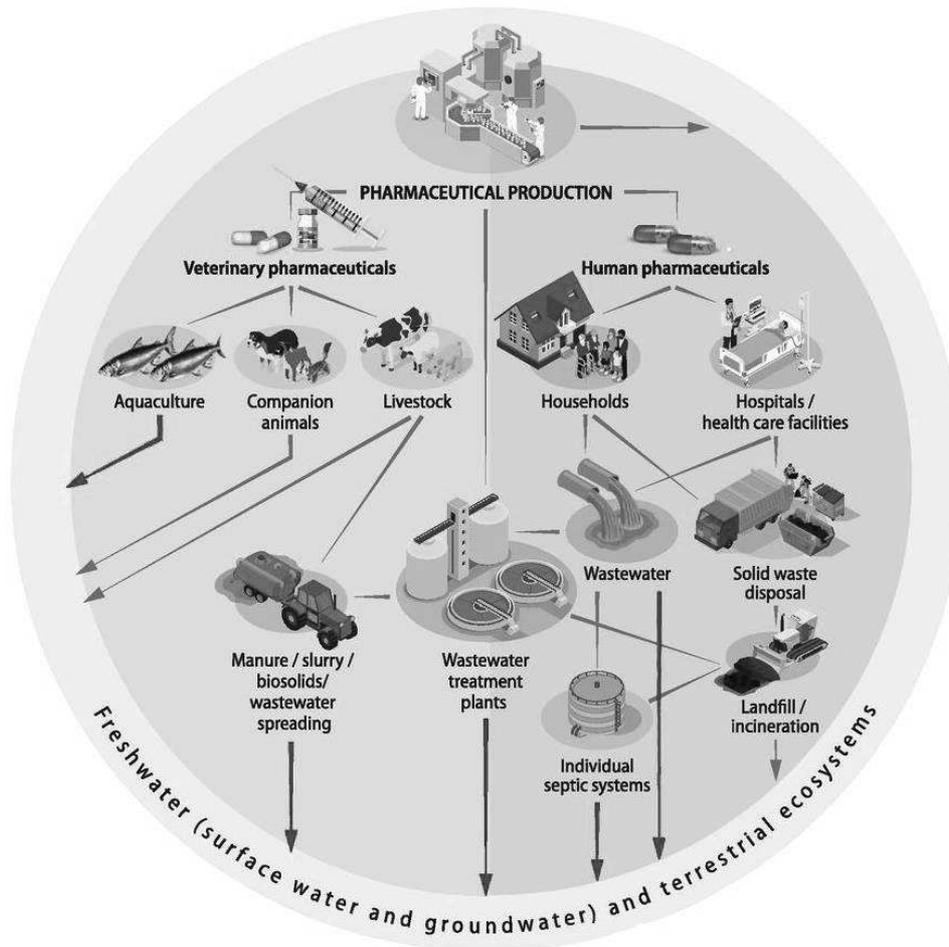
Différentes mesures prennent également en compte l'état écologique des milieux marins. La Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est (Convention OSPAR), entrée

en vigueur le 25 mars 1998 et actualisée à plusieurs reprises (le 9 mai 2002, le 7 février 2005 et le 18 mai 2006), couvre toutes les sources de pollution du milieu marin ainsi que les effets préjudiciables sur celui-ci des activités anthropiques. Parmi la liste des substances potentiellement préoccupantes de la Convention OSPAR, 6 hormones et 25 PP y sont référencés (<https://www.ospar.org/work-areas/hasec/hazardous-substances/possible-concern/list> ; accès le 16 avril 2020). Enfin, la Directive Cadre « stratégie milieu marin » (DCSMM) parue en 2008 (2008/56/CE) vise le bon état écologique des milieux marins pour 2020. La mise en œuvre de la DCSMM s'appuie sur la création de plans d'actions pour le milieu marin (PAMM) dans lesquels un volet « surveillance des contaminants » a été intégré. Ce volet fait notamment part de la nécessité de suivre la présence de contaminants chimiques dans le milieu marin et les organismes ainsi que les effets qu'ils engendrent chez ces mêmes organismes. Toutefois, aucun PP n'est présent dans la liste des contaminants suivis dans ces matrices.

L'intégration des PP dans ces différents textes législatifs reste donc limitée, et ce malgré une volonté d'acquérir de nouvelles données concernant leur présence et effets dans l'environnement.

## 1.2. Principales sources et voies d'entrée dans le milieu marin

La forte pression anthropique exercée sur les systèmes aquatiques continentaux (lac, rivière, fleuve) et marins (estuaire, lagune, littoral) génère diverses voies d'entrée des PP dans le milieu marin, le réceptacle terminal. Cette diversité se doit aux différents usages des PP, ainsi qu'à la manière dont les déchets et rejets sont traités et/ou valorisés, tel que schématisé en Figure 1.1.



**Figure 1.1 :** Sources et voies d'entrée des produits pharmaceutiques (PP) dans l'environnement comprenant les milieux d'eaux douces, terrestres et marins (le réceptacle terminal). Les flèches en rouge représentent les voies d'entrée directes des PP dans le milieu marin (modifié de OECD, 2019).

En se basant sur le cycle de vie d'un PP, une première source est émise lors de sa fabrication en usine *via* les eaux usées reçues en station d'épuration (STEP) (Collado et al., 2014; Tahrani et al., 2016). Se distinguent ensuite deux usages : humain et vétérinaire. La part du marché des PP pour la santé humaine dépasse largement celle des PP à usage vétérinaire avec un chiffre d'affaire en 2014 de \$ 678 milliards contre environ \$ 24 milliards (chiffres donnés par la LEEM et SIMV). Les PP à usage humain, consommés à domicile ou dans les centres hospitaliers, sont excrétés par l'organisme sous leur forme originelle et/ou métabolisée, actifs ou non, et rejoignent le système des eaux usées à destination des STEP, quand de tels systèmes d'assainissement sont disponibles (Santos et al., 2013; Tran et al., 2018). Tandis que les PP à usage vétérinaire, ne pouvant être traités après application, sont directement rejetés dans le milieu aquatique pour l'aquaculture (Douet et al., 2009; He et al., 2016) et le sol dans le cas de l'élevage, comprenant l'épandage du lisier sur les terres agricoles (Díaz-Cruz et al., 2003). Il est à noter que les PP présents dans le sol peuvent ensuite être lessivés vers les eaux superficielles ou atteindre les eaux souterraines par infiltration (Sui et al., 2015). Les PP à usage humain étant majoritairement excrétés dans le système d'assainissement, les STEP représentent donc la

barrière principale entre nos rejets et l'environnement. Cependant, les procédés de traitement actuels des STEP conventionnelles ne permettent pas un taux d'abattement complet des PP (cf. Section 1.2). Cela a pour conséquence une diffusion directe de ces molécules et de leurs métabolites dans les milieux aquatiques *via* les effluents de STEP (Margot et al., 2015), et indirecte *via* l'épandage des boues de STEP puis le lessivage de ces contaminants vers les milieux aquatiques (Verlicchi and Zambello, 2015). D'autres voies d'entrée des PP dans le milieu marin sont susceptibles de se produire, notamment par l'intermédiaire des lixiviats en provenance des décharges côtières recevant des déchets ménagers et cliniques, ou encore *via* les rejets des bateaux de croisières (Gaw et al., 2014).

Pour résumer, les principales voies d'entrée des PP dans le milieu marin sont soit indirects *via* l'écoulement (ex. fleuves) et le ruissèlement (ex. lessivage des terres agricoles côtières) des eaux continentales contaminées, soit directs *via* l'aquaculture en zone côtières et le développement des émissaires en mer de STEP. Les rejets de STEP sont reconnus comme la voie d'entrée majoritaire des PP dans les milieux aquatiques.

### 1.3. Les STEP conventionnelles : peu efficaces contre les PP

Actuellement, les procédés de traitement des eaux usées de STEP dites « conventionnelles », ont pour principaux objectifs l'élimination des déchets solides, des solides en suspension, de la matière organique facilement biodégradable et des nutriments tels que l'azote et le phosphore (Margot et al., 2015). Les principales étapes de traitement comprennent un prétraitement (ex. dégrillage-tamassage), un traitement primaire (ex. sédimentation), un traitement secondaire (ex. boues activées, clarification) et parfois un traitement tertiaire (ex. déphosphatation, désinfection). Malgré ces procédés, les STEP ne sont pas conçues pour abattre complètement les micropolluants dans les eaux usées, dont font partie les PP. Des exemples de concentrations de PP retrouvés en sortie d'une STEP en France, de l'ordre d'une dizaine à des centaines de ng/L, sont mentionnés en Tableau 1.1 (Chiffre et al., 2016).

**Tableau 1.1:** Concentrations de PP (ng/L) appartenant à différentes classes thérapeutiques retrouvées dans l'effluent d'une STEP française de 55 000 équivalent-habitants avec un traitement primaire, un traitement secondaire aérobic et une étape de déphosphoration, selon le mois d'avril ou mai (Chiffre et al., 2016).

Classe thérapeutique	Composé	Concentration (ng/L)
		avril - mai
Antibiotiques	Ofloxacine	18 - 53
	Sulfaméthoxazole	656 - 615
	Thriméthoprim	62 - 46,4
	Métronidazole	36 - <LOD
Anti-épileptiques	Carbamazépine	443 - 566
Anti-inflammatoires	Diclofénac	966 - 467
	Kétoprofen	143 - 261
	Naproxen	255 - <LOD
Hormones	Androsténédione	<LOD - 6
	Estrone	10 - 2
Hypolipémiant	Bézafrate	16 - 58
Psychotropes	Lorazépam	29 - 47
	Oxazépam	<LOD - 168
$\beta$ -bloquants	Aténolol	324 - 381
	Porpranolol	2 - <LOD

L'abattement des PP dans les STEP est un processus complexe, dépendant (i) des caractéristiques physico-chimiques de ces molécules (*i.e.* solubilité, volatilité, biodégradabilité, capacité d'adsorption aux particules solides ou aux boues activées), (ii) des procédés de traitement biologiques, physiques et chimiques, (iii) des conditions de fonctionnement telles que le temps de rétention hydraulique, le temps de séjour des boues, la cinétique de biodégradation, la communauté de microorganismes, mais également (iv) des conditions environnementales telles que la température (efficacité moindre en période hivernale et dans les climats froids), les conditions d'oxydoréduction (différentes efficacités d'abattement entre les conditions anaérobies et aérobies) et le pH (les variations du pH affectent la cinétique de réaction des PP) (Evgenidou et al., 2015).

Au cours du traitement primaire et secondaire, le taux d'abattement par adsorption aux particules solides et aux boues activées peut être significatif pour les PP hydrophobes ou chargés positivement, tels que l'ofloxacine (58 %), la norfloxacin (69 %) ou la ciprofloxacine (69 %) (Margot et al., 2015). Cependant, les PP sont majoritairement hydrophiles et souvent chargés négativement à pH neutre. Cela a pour conséquence une faible adsorption des PP aux boues (chargées négativement), se retrouvant le plus souvent dans la phase dissoute. Plusieurs PP dont la carbamazépine, le diclofénac, le métoprolol et l'estriol ont montré un taux d'abattement inférieur à 30 % dans des bassins de sédimentation primaires (Behera et al., 2011). En revanche, au cours du traitement secondaire l'abattement des PP par biodégradation peut s'avérer plus efficace que le phénomène d'adsorption aux boues activées. A l'issue de ce traitement biologique, certains analgésiques (ex. paracétamol, acide salicylique), anti-inflammatoires (ex. ibuprofène), stimulants (ex. caféine) et hormones naturelles (ex.

testostérone, androstérone, estriol, 17  $\beta$ -estradiol) sont considérablement biodégradés à des taux compris entre 80 et 99 % (Margot et al., 2015). Néanmoins, le traitement secondaire se montre peu efficace contre les molécules difficilement biodégradables, telles que la carbamazépine, le diclofénac, l'irbésartan ou l'oxazépam, avec un taux d'abattement inférieur à 20% (Margot et al., 2015). Des taux d'abattement négatif ont également été reportés pour certains PP comme la carbamazépine, entraînant une augmentation des concentrations de ces molécules dans les effluents de STEP (Kwon and Rodriguez, 2014). Ce phénomène s'explique généralement par la déconjugaison ou l'hydrolyse des métabolites des PP, c'est-à-dire des produits de biotransformation des PP générés et excrétés par le corps humain, présents dans les eaux usées pour reformer la molécule mère, ou encore la désorption des molécules mères des particules en suspension. Ainsi, les processus de déconjugaison et d'hydrolyse devraient être pris en compte dans l'interprétation des taux d'abattement des PP. Les métabolites des PP sont fréquemment détectés dans les eaux usées, et quantifiés dans la même gamme de concentration, voire à des niveaux plus élevés, que les molécules mères (< 10 ng/L à 3-4  $\mu$ g/L). Les métabolites des PP à usage humain sont généralement plus polaires et plus hydrophiles que les composés parents, en raison de leur transformation dans le foie ou les reins pour être facilement excrétés dans l'urine ou la bile. Ces composés peuvent donc ne pas être éliminés de manière significative par le processus d'adsorption. Certains de ces métabolites sont bien dégradés au cours du traitement biologique, avec par exemple un taux d'abattement supérieur à 90 % pour le N-acétyl-sulfaméthoxazole, mais beaucoup d'autres ne le sont pas (Margot et al., 2015). La concentration des métabolites des PP pouvant atteindre 1 à 4  $\mu$ g/L dans les effluents de STEP, leur présence devrait systématiquement être prise en compte dans l'évaluation de l'efficacité des traitements des eaux usées.

Différentes techniques de traitement avancé se sont développées, ou sont en cours de développement, afin d'améliorer l'abattement des micropolluants dans les eaux usées de STEP. A l'heure actuelle, les techniques les plus prometteuses concernent : l'adsorption sur différents substrats (ex. charbon actif, oxyde de graphène, nanotube de carbon), les procédés d'oxydation avancée (ex. ozonation, couplage UV/péroxyde d'hydrogène), des processus biologiques de biodégradation (ex. culture pure ou mixte) ou encore la filtration sur membrane (Rivera-Utrilla et al., 2013; Wang and Wang, 2016). Toutefois, ces techniques de traitement avancé ne permettent pas encore un abattement complet de l'ensemble des PP et nécessitent d'être davantage optimisées avant leur utilisation à plus grande échelle. De plus, la généralisation de ces procédés à l'ensemble des STEP se voit limitée par le coût encore trop onéreux de certains traitements (Wang and Wang, 2016). En outre, il convient de prêter davantage attention au devenir environnemental des produits de dégradation et de biotransformation que peuvent générer ces traitements avancés, ainsi qu'à leur écotoxicité.

Les effluents de STEP constituent donc la voie d'entrée à une multitude de contaminants comprenant les PP, leurs produits de biotransformation et de dégradation, déversées en continu dans l'environnement, le milieu marin étant le réceptacle terminal. L'occurrence des PP dans le milieu marin a plusieurs fois été mise en relation direct avec les rejets de STEP (Fang et al., 2012; McEneff et al., 2014).

#### 1.4. Occurrence des produits pharmaceutiques dans le milieu marin

Une importance tardive a été portée à la présence des PP dans le milieu marin par comparaison au milieu d'eau douce, sous prétexte qu'un facteur de dilution très important limiterait l'exposition de ce milieu à ces contaminants. Pourtant, la très forte pression démographique en zone côtière (plus de 50 % de la population mondiale) (Barragán and de Andrés, 2015) et les différentes voies d'entrée des PP dans l'environnement énoncées précédemment, exposent le milieu marin à de tels contaminants. Par conséquent, l'occurrence de ces molécules dans les différents compartiments du milieu marin, que sont la colonne d'eau, les sédiments et les organismes, est bien avérée mais encore peu documentée.

##### 1.4.1. *Eaux marines*

Pour répondre aux enjeux de dilution en milieu marin et des niveaux de concentrations attendus plus faibles qu'en milieu d'eau douce, de nouvelles stratégies d'échantillonnage ont dû être mises en place. A la différence des échantillonneurs ponctuels, les échantillonneurs passifs présentent l'avantage d'intégrer le prélèvement dans le temps et de permettre d'atteindre des niveaux de concentrations mesurables pour certains PP et leurs métabolites. Les échantillonneurs passifs sont constitués d'une phase réceptrice qui, immergée dans la colonne d'eau, permet sur la base de mécanismes de diffusion et de sorption l'échantillonnage de molécules dissoutes présentant une affinité pour la phase réceptrice. Parmi les différentes phases réceptrices adaptées à l'échantillonnage des composés organiques polaires, le POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers) s'est avéré efficace pour l'étude qualitative et semi-quantitative des PP dans le milieu marin (Martínez Bueno et al., 2016; Munaron et al., 2012). Cependant, cette technique d'échantillonnage, basée sur la phase dissoute, ne considère pas les PP véhiculés par les matières en suspensions dans l'analyse globale de la contamination de la colonne d'eau. En raison des difficultés à multiplier les échantillonnages, très peu d'études prennent en considération les distributions spatiales et temporelles. Des paramètres qui influencent la distribution spatio-temporelle de la contamination, comme l'hydrodynamique, la conformation du site, la profondeur de prélèvement, sont essentiels à la compréhension du devenir, de la distribution et des risques d'exposition des PP dans les systèmes côtiers complexes. Les travaux de Bayen et al. (2013) ont montré que la proximité de la source d'émission n'avait pas toujours d'influence sur les concentrations des PP dans l'eau et que ces niveaux dépendaient fortement des

schémas de mélange des eaux côtières et des temps de séjour, c'est-à-dire que les niveaux étaient les plus élevés sur les sites d'échantillonnage ayant la plus faible circulation de masse d'eau. Fenet et al. (2014) ont appliqué le modèle MARS 3D pour obtenir des prévisions de concentration plus précises des antiépileptiques carbamazépine et oxcarbazépine et leurs métabolites au sein d'une STEP et à proximité de son émissaire sous-marin, situé sur la zone côtière méditerranéenne de Montpellier (France). La modélisation de diffusion et d'advection de la carbamazépine juste au-dessus de l'émissaire sous-marine et dans les eaux de surface a montré l'influence de la thermocline en été, avec une très faible diffusion de la carbamazépine du fond vers la surface, suggérant ainsi une influence majeure de la stratification des masses d'eau. D'autres paramètres tels que le pH et la salinité influencent le comportement des PP dans les écosystèmes marins (Fabbri and Franzellitti, 2016). Dans les estuaires et les milieux de transition entre eau douce et eau de mer, le pH évolue progressivement vers la valeur typique de l'eau de mer (pH = 8), ce qui influence le comportement des molécules possédant des groupes fonctionnels ionisables avec des constantes de dissociation (pKa) proches de cette valeur. En même temps, l'augmentation de la salinité participe à une modification des équilibres chimiques avec une plus forte ou plus faible affinité de ces molécules pour les matières en suspension et les organismes planctoniques (exemple de la tétracycline [Wang et al., 2010]).

Les milieux de transition constituent des zones sensibles essentielles à la reproduction de nombreuses espèces et au maintien de la biodiversité. Cependant, les concentrations en PP relevées dans ces milieux comme les lagons, les baies semi-fermées ou encore les étangs côtiers, se sont révélées plus élevées que dans les eaux marines « libres » (Bayen et al., 2013; Munaron et al., 2012). D'après la revue de littérature Arpin-Pont et al. (2016), certains PP sont fréquemment recherchés et détectés dans les eaux marines, comme par exemple des antibiotiques : l'érythromycine, recherchée dans 220 sites et détectée dans 77 % des échantillons sur sept études (0,8 – 1900 ng/L), le sulfaméthoxazole, recherché dans 251 sites et détecté dans 71 % d'entre eux sur neuf études (15 – 100 ng/L), et le triméthoprim, recherché dans 168 sites et détecté dans 80 % d'entre eux sur 6 études (5 – 340 ng/L). D'autres molécules issues d'autres classes thérapeutiques, comme l'antiépileptique carbamazépine (recherché dans 88 sites et trouvé dans 23 % des échantillons sur cinq études ; 4 – 185 ng/L), l'anti-inflammatoire ibuprofène (recherché dans 79 sites, trouvé dans 38 % des échantillons sur cinq études ; 0,7 – 1000 ng/L) ou encore l'antalgique acétaminophène (recherché dans 65 sites, trouvé dans 81 % des échantillons sur trois études ; 2 – 1952 ng/L) présentent également des fréquences de détection importantes. Selon une autre revue portant sur l'occurrence des PP et leurs métabolites dans les eaux côtières, 113 molécules ont été détectées à des concentrations comprises entre 0,01 et 6800 ng/L (Gaw et al., 2014). Pour 69 d'entre elles, les concentrations maximales mesurées dépassent

le seuil de concentration environnementale prévisible (*predicted environmental concentration*) fixé par l'Agence européenne du médicament (EMA) à 10 ng/L.

De récentes études attirent l'attention sur des environnements particuliers (sous des climats extrêmes et dans des sites confinés), en raison des niveaux de concentration élevés rarement retrouvés dans des climats tempérés (les plus étudiés). Ainsi, González-Alonso et al. (2017) ont mis en évidence des concentrations en acétaminophène, diclofénac et ibuprofène largement supérieures au microgramme par litre, avec des concentrations allant respectivement jusqu'à 48, 15 et 10 mg/L, dans le nord de la péninsule antarctique. Dans un environnement très contrasté par rapport au précédent soit les eaux côtières de l'Arabie saoudite sur la mer Rouge, Ali et al. (2017) ont trouvé de l'acétaminophène et de la metformine à des concentrations de 2 379 ng/L et dépassant les 3 000 ng/L, respectivement. Ces concentrations extrêmes se retrouvent dans des milieux confinés, directement impactés par des rejets d'eaux usées et, pour le premier, avec des conditions de lumière, température et salinité qui ne favorisent pas la dégradation. Malgré ces conditions hors normes, ces deux cas mettent en évidence que des écosystèmes peuvent se retrouver ponctuellement face à des concentrations en PP largement au-delà de celles considérées comme des « concentrations environnementales » (comprises entre le ng/L et le mg/L) et montrent les limites de nos connaissances en milieu marin où la diversité des écosystèmes est grande.

#### 1.4.2. *Sédiments marins*

La plupart des études ont été menées dans le compartiment aqueux dans la mesure où les PP sont particulièrement solubles dans l'eau. Cependant, certains PP sont plus hydrophobes et pourraient être plus sujet au phénomène de sorption aux sédiments marins. La capacité de sorption de ces molécules est déterminée par leurs propriétés physico-chimiques (pKa, log Kow), et la nature du sédiment (capacité d'échange cationique [CEC], teneur en matière organique et en argiles). Ainsi, certains PP (cationiques, par exemple) se retrouveront plus adsorbés sur le sédiment en milieu marin qu'en eau douce, pour des CEC de sédiments similaires, phénomène qui peut être amplifié pour les molécules ayant des log Kow les plus élevés.

Parmi 150 molécules recherchées dans les sédiments, 62 d'entre elles ont été détectées à des concentrations comprises entre 0,04 et 130 ng/g de poids sec, sans compter la concentration exceptionnelle de 2 615 000 ng/g pour l'antibiotique norfloxacin dans les sédiments d'un élevage de crevettes au Vietnam (Fabbri and Franzellitti, 2016; Gaw et al., 2014). La 17 $\alpha$ -éthynylestradiol, considérée comme perturbateur endocrinien, a été la molécule la plus fréquemment recherchée et trouvée dans les sédiments marins avec la concentration la plus élevée de 130 ng/g. Bien que moins étudiés, Gaw et al. (2014) rapportent également la présence de métabolites et produits de

transformation de PP dans les sédiments, comme le  $\alpha$ -hydroxy-métoprolol ou la *simvastatin hydroxycarboxylic acid*, à des concentrations de quelques ng/g.

Les sédiments marins constituent donc un compartiment de stockage pour certains PP et métabolites, mais sont susceptibles d'agir, à l'inverse, comme une source de pollution secondaire à partir de laquelle ces molécules peuvent être désorbées lors de modifications des conditions environnementales telles que la salinité et le pH (Liang et al., 2013). Les sédiments contaminés peuvent également être remis en suspension durant les changements de marée et pendant les tempêtes, exposant ainsi les organismes marins aux PP.

#### 1.4.3. Organismes marins

L'une des raisons pour lesquelles il est nécessaire de connaître la distribution spatio-temporelle des PP dans les différents compartiments marins, est l'estimation du risque toxique qu'ils représentent pour la faune et la flore de ces milieux. Le transfert des PP biodisponibles du milieu vers les organismes peut se produire par bioconcentration, c'est-à-dire par absorption d'un contaminant et son accumulation dans les tissus de l'organisme à la suite d'un contact direct avec le milieu environnant (ex. par la respiration pour les poissons pélagiques ou ingestion de colloïdes pour les mollusques et poissons benthiques), et/ou par bioamplification à la suite de l'ingestion d'espèces du niveau trophique inférieur. Dès lors qu'un organisme absorbe plus vite un contaminant qu'il ne l'élimine, il y a bioaccumulation.

Les PP, pour une bonne partie d'entre eux, sont des substances de lipophilie faible à modérée, avec un potentiel de bioaccumulation négligeable au regard du seuil proposé par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques d'un log Kow de plus de 3 (OECD 2008). Cependant, après investigation du potentiel bioaccumulatif de 275 PP retrouvés dans l'environnement, Howard and Muir (2011) ont démontré que 92 d'entre eux sont susceptibles d'être bioaccumulés selon les relations quantitatives structures-propriétés (QSPR) et leur jugement scientifique. Il s'avère que ces 92 PP ont un log Kow supérieur à 3. Néanmoins, d'autres facteurs sont importants à intégrer pour comprendre le processus de bioaccumulation de ces molécules dans l'organisme, tels que l'habitat, la stratégie respiratoire, l'alimentation, l'état reproducteur, le sexe, le stade de vie, le contenu lipidique, la taille de l'organisme ainsi que les conditions environnementales (pH, température et présence de colloïdes) (Arnot and Gobas, 2006; Liu et al., 2011; Meredith-Williams et al., 2012; Yang et al., 2011).

D'après la revue de la littérature de Gaw et al. (2014), les concentrations de 60 PP et 7 métabolites ont été rapportées dans les tissus d'organismes marins tels que des poissons, des crustacés et des mollusques à des concentrations, dépendantes de l'espèce et du tissu, comprises entre 0,01 et 490 ng/g de poids sec. Les antibiotiques (38 molécules), suivis des antihypertenseurs (6

molécules), représentent la classe de PP la plus souvent détectée dans les tissus d'organismes marins. Li et al. (2012) ont relevé des concentrations moyennes d'antibiotiques comprises entre 0,01 et 19 ng/g, dans les tissus de 5 espèces de mollusques collectés dans la mer de Bohai de Chine, avec une concentration maximale de 370 ng/g pour la norfloxacine. Parmi les molécules les plus ciblées et les plus fréquemment détectées, se trouvent l'antiépileptique carbamazépine et les deux antibiotiques ciprofloxacine et enrofloxacine, dans des gammes respectives de 1 à 6 ng/g (moules), de 1 à 208 ng/g (moules et poissons) et de 0,7 à 147 ng/g (moules et poissons) (Gaw et al., 2014). D'autres classes thérapeutiques sont également représentées parmi les PP retrouvés dans les tissus d'organismes marins, telles que les antidépresseurs (ex. venlafaxine, 2,7 ng/g ; amitriptyline, 0,2 – 6,2 ng/g), anti-inflammatoires non-stéroïdiens (ex. acide méfénamique, 23 ng/g), analgésiques (ex. acétaminophène, 65 – 115 ng/g), estrogènes (ex. éthynyl estradiol, 2,7 – 38 ng/g), diurétiques (ex. triamtèrene, 0,6 ng/g), ou encore les antihistaminiques (ex. diphénhydramine, 0,3 – 11 ng/g) (Alvarez-Muñoz et al., 2015b; Gaw et al., 2014).

Le lien entre l'historique d'exposition des organismes sauvages et les concentrations mesurées lors des échantillonnages est difficile à établir. Pour pallier cette problématique, la méthode d'encagement d'organismes, comme les mollusques bivalves, a été utilisée dans différentes études. De cette manière, Wille et al. (2011) ont détecté 5 PP dans les tissus de la moule bleue *Mytilus edulis*, encagée sur la côte Belge sur une période de 6 mois. L'acide salicylique a été retrouvé avec la plus haute concentration de 490 ng/g de poids sec, tandis que de plus faibles concentrations ont été observées pour la carbamazépine (1 à 11 ng/g), l'ofloxacine (5 à 65 ng/g), le propranolol (19 à 52 ng/g) et le paracétamol (65 à 115 ng/g). Sur les côtes Irlandaises, la même approche a été appliquée par encagement de moules *Mytilus* spp. proche d'émissaires en mer de STEP pendant un an, afin de quantifier la présence de 5 PP (carbamazépine, diclofénac, gemfibrozil, acide méfénamique et triméthoprime) (McEneff et al., 2014). Tous les PP sélectionnés ont été détectés dans les eaux de surface (jusqu'à 1,41 µg/g) et les effluents de STEP environnantes (jusqu'à 3,16 µg/g), à l'exception du gemfibrozil qui a été détecté sporadiquement. Trois des cinq composés ont finalement été bioaccumulés par les moules transplantées, la triméthoprime étant mesurée à des concentrations allant jusqu'à 9,22 ng/g de poids sec.

La présence des PP dans les tissus des organismes marins est encore très peu documentée et celle de leurs métabolites l'est encore moins. Seulement 5 études ont rapporté les concentrations de métabolites chez ces organismes sauvages, tels que ceux de la venlafaxine, la carbamazépine, l'acide acétylsalicylique et l'érythromycine (Alvarez-Muñoz et al., 2015a, 2015b; Klosterhaus et al., 2013; Martínez Bueno et al., 2014; Wille et al., 2011). Des concentrations plus élevées des métabolites de la

venlafaxine par rapport au composé parent ont été quantifiées chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. Cette observation soulève l'importance de considérer ces molécules, parfois plus toxiques que le composé parent. Cependant, des difficultés peuvent être rencontrées afin de remonter à l'origine de leur présence dans l'organisme, ces molécules pouvant être issues de la transformation des PP dans le milieu ou bien produites par le métabolisme même de l'organisme.

#### 1.5. Devenir des PP dans le biotope et le biota

Afin de mieux caractériser l'exposition aux PP et l'impact de ces derniers sur les organismes vivants, il est indispensable de comprendre leur devenir dans le milieu (le biotope) et dans les organismes (le biota). Les PP sont soumis dans l'environnement à différents facteurs abiotiques (ex. adsorption, photolyse, hydrolyse, oxydation-réduction) et biotiques (ex. dégradation par les microorganismes ou métabolisation par les organismes supérieurs) pouvant ainsi être (bio)dégradés ou (bio)transformés de manière complète ou incomplète. L'influence de facteurs environnementaux est donc prédominante sur l'occurrence de ces processus biotiques et abiotiques, tout comme les caractéristiques physico-chimiques des PP. En ce sens, les données existantes sur le devenir des PP dans les écosystèmes continentaux ne pourraient s'extrapoler aux environnements marins. Cette limite a par exemple déjà été confirmée pour l'ibuprofène dont la transformation est différente dans les eaux douces et marines (Weigel et al., 2004).

Cette partie a pour but de recenser les différents processus responsables du devenir des PP dans les écosystèmes marins en séparant les facteurs abiotiques, se produisant dans le biotope, des facteurs biotiques, ayant lieu dans le biota.

##### 1.5.1. Facteurs abiotiques

Le partitionnement est un processus important dans la détermination du devenir des PP dans les milieux aquatiques. La sorption et la désorption sont responsables du partitionnement des PP entre la phase aqueuse et la phase solide, en suspension ou sédimentée, et affectent donc la biodisponibilité des PP dans le biotope. Plusieurs études ont rapporté qu'environ 50 % de la concentration totale des PP peut être adsorbée par les particules en suspension (Lara-Martín et al., 2014; Yang et al., 2011). Dans les milieux marins, la sorption de certains composés peut être favorisée car la solubilité des composés lipophiles diminue avec l'augmentation de la salinité, augmentant ainsi le partitionnement vers la phase solide (Challis et al., 2014). L'augmentation de la force ionique des systèmes salins entraîne l'agrégation et la sédimentation des particules en suspension, qui s'accumulent dans les zones de transition telles que les estuaires.

La photodégradation causée par le rayonnement solaire est un processus clé dans l'élimination des PP dans les milieux aquatiques, notamment pour ceux conçus pour résister à l'hydrolyse (Nikolaou et al., 2007). La photolyse peut être directe ou indirecte. Au cours de la photolyse directe, la molécule est excitée par l'absorption d'un photon conduisant généralement à une oxydation (Dąbrowska and Namieśnik, 2004). Quant à la photolyse indirecte, un photosensibilisateur naturel (ex. nitrates et acides humiques) absorbe la lumière et forme des intermédiaires radicalaires très réactifs ( $O^*$ ,  $O_2^*$ ,  $HO^*$ ) ou encore des peroxydes (R-O-O-R) qui réagissent sur les composés ciblés (Remucal, 2014). Les photosensibilisateurs peuvent fonctionner comme activateurs ou comme protecteurs selon la molécule ciblée. Par exemple, les substances humiques présentes dans l'eau accélèrent la photodégradation de la fluoxétine (Kwon and Armbrust, 2006), le sulfaméthoxazole, l'acide clofibrique, l'ofloxacine et le propranolol (Andreozzi et al., 2003) mais ralentissent celle de la paroxétine (Kwon and Armbrust, 2004), la carbamazépine et le diclofénac (Andreozzi et al., 2003). De plus, les mécanismes de photodégradation sont également influencés par la présence de matières organiques dissoutes et de particules, car celles-ci peuvent soit absorber soit diffuser la lumière, ce qui modifie la photodégradation (Batchu et al., 2014). Le pH et la salinité sont également des facteurs clés intervenant dans les processus de photodégradation. La différence de pH modifie la spéciation et donc la quantité de lumière absorbée par le composé, soit en inhibant soit en augmentant la photodégradation. La teneur en sel de l'eau de mer peut inhiber la photodégradation indirecte car les espèces inorganiques, comme les ions chlorure, peuvent piéger les radicaux hydroxyles (Batchu et al., 2014). De cette manière, les mécanismes de photodégradation et les produits de transformation qui en résultent sont susceptibles de différer entre les milieux d'eau douce et les milieux marins en raison des différences de chimie de l'eau. Ali et al. (2017) ont étudié la photodégradation de 13 PP dans de l'eau de mer en conditions de laboratoire. Ils ont ainsi identifié des produits de dégradation tels que l'acide carbazol-1-yl-acidique et l'acide 8-chloro-9H-carbazol-1-yl-acétique pour le diclofénac, l'acridine, la carbamazépine-10,11-époxyde et la 10,11-dihydroxy-carbamazépine pour la carbamazépine, et la 1-(2-amino-5 hydroxyphényl) éthanone pour l'acétaminophène. La présence de ces produits de photodégradation a ensuite été confirmée dans des échantillons d'eau de mer ou de poissons prélevés sur des sites exposés aux effluents d'eaux usées sur la côte saoudienne de la mer Rouge. Il est à noter que les produits de dégradation peuvent parfois être plus toxiques et biologiquement actifs que les composés parents (Bergheim et al., 2014). Par exemple l'acridine, produit de photodégradation et de biotransformation de la carbamazépine, est connue pour avoir une activité mutagène et cancérigène (Chiron et al., 2006). La lumière du soleil étant atténuée par la profondeur, la photodégradation peut être réduite dans les eaux côtières par rapport aux systèmes d'eau douce peu profonds. Lunestad et al. (1995) ont étudié la photostabilité de 8 agents

antibactériens (utilisés en aquaculture) dans l'eau de mer, en surface et à 1 mètre de profondeur. Ils ont ainsi démontré que des composés rapidement photodégradés en surface (<21 jours) pouvaient être plus ou moins stables en profondeur au-delà de 56 jours, tel est le cas de l'acide oxolinique et de la fluméquine, tandis que la triméthoprimine et l'orméthoprimine restaient stables même en surface après 21 jours d'exposition à la lumière du jour. Par conséquent, les temps de demi-vies des PP libérés par les émissaires de STEP en profondeur peuvent être prolongés par rapport à ceux rejetés près de la surface. Cela pourrait engendrer une diffusion plus large de ces composés qu'on pourrait le prévoir sur la base de leurs demi-vies dans les systèmes d'eau douce moins profonds.

Parce que les PP sont habituellement résistants au phénomène d'hydrolyse, cette réaction peut être considérée comme négligeable par rapport à la photolyse (Nikolaou et al., 2007). Par exemple, Pouliquen et al. (2007) ont démontré que l'hydrolyse était responsable à 20 % de la dégradation de l'oxytétracycline dans l'eau de mer contre 70 % par le processus de photolyse, tandis que la fluméquine n'a été dégradé que de 10 %, uniquement par photolyse après 14 jours d'exposition à la lumière et non par hydrolyse.

#### 1.5.2. Facteurs biotiques

Peu de publications renseignent sur la dégradation microbienne des PP dans les milieux aquatiques en comparaison avec la biodégradation en STEP, notamment pour les eaux marines et estuariennes. Ce processus est influencé par différents facteurs, comprenant les propriétés intrinsèques de la molécule (ex. solubilité, hydrophobie) ainsi que les facteurs environnementaux et conditions climatiques (ex. température, pH, rayonnement solaire, nutriments), et surtout la présence et l'activité de la communauté microbienne capable de biodégrader la molécule *via* des voies métaboliques et/ou co-métaboliques (Barra Caracciolo et al., 2015; Benotti et Brownawell, 2009). La biodégradation par voie métabolique fait référence à l'utilisation d'un produit chimique comme source d'énergie, de carbone, d'azote ou d'autres nutriments. Le co-métabolisme est la dégradation fortuite d'un contaminant par une enzyme ou un cofacteur produit lors du métabolisme microbien d'un autre composé.

Les travaux de Benotti et Brownawell (2009) sur la dégradation microbienne de plusieurs PP dans les eaux de mer montrent différentes cinétiques de biodégradation très dépendantes de la molécule considérée. Une cinétique de biodégradation relativement rapide a été observée pour l'acétaminophène et la fluoxétine ( $t_{1/2} < 12$  jours), tandis que d'autres molécules comme la carbamazépine ( $t_{1/2} > 96$  jours), le sulfaméthoxazole ( $t_{1/2} > 85$  jours) et la triméthoprimine ( $t_{1/2} > 100$  jours) sont beaucoup plus persistantes dans le milieu marin. Toutefois, une étude plus récente a

comparé la cinétique de biodégradation de nombreux PP, en conditions contrôlées de laboratoire, entre des eaux de mer et des eaux douces (Baena-Nogueras et al., 2017). Il ressort de cette étude un taux de biodégradation plus rapide dans les eaux de mer que les eaux douces pour la plupart des composés avec une différence d'environ 40 % entre les deux eaux testées. Cette différence peut s'expliquer par une différence de communauté microbienne entre les deux eaux mais également par plusieurs facteurs qui peuvent influencer le taux de dégradation et la biodisponibilité des molécules (ex. température, nutriments, pH, etc.) (Baena-Nogueras et al., 2017). Cependant, les molécules les plus persistantes, comme par exemple la carbamazépine, ne se dégradent pas systématiquement plus vite dans les eaux douces que les eaux marines. Au cours du processus de biodégradation, les différentes réactions enzymatiques exercées sur les PP n'aboutissent pas toujours à une dégradation complète et peuvent générer des métabolites de biodégradation détectables dans le milieu. Par exemple, le triclosan peut être biodégradé jusqu'à 95 % en 5 jours générant des métabolites tels que le phénol, le catéchol et le 2,4-dichlorophenol (Veetil et al., 2012), tandis que l'acétaminophène est dégradé en 4-aminophenol et en hydroquinone (Zhang et al., 2013). Dans une autre étude, Robinson et Hellou (2009) ont étudié la biodégradation des perturbateurs endocriniens  $17\beta$ -estradiol et éthinyloestradiol dans le milieu côtier. Des temps de demi-vie de 1 et 5 jours respectivement ont été observés. Ils ont également observé la formation d'un métabolite intermédiaire au cours de la dégradation du  $17\beta$ -estradiol mais non-persistant dans le milieu. La présence de certains PP, comme les antibiotiques, peut impacter les communautés microbiennes naturelles, limitant ainsi la biodégradation d'autres contaminants (Barra Caracciolo et al., 2015; Grenni et al., 2018; Näslund et al., 2008). Näslund et al. (2008) ont par exemple montré que l'antibiotique ciprofloxacine altérait significativement la diversité bactérienne présente dans des sédiments marins de manière dose-dépendante dès 0,1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de sédiments (poids sec), ayant pour conséquence une biodégradation limitée du pyrène, de la famille des HAP. Dans l'environnement, les PP sont soumis simultanément aux processus de dégradation biotiques et abiotiques. Des effets synergétiques de dégradation sont donc susceptibles de se produire, comme cela a été reporté pour le triclocarban sous l'effet de la lumière et de bactéries phototrophes (Lv et al., 2014).

Malgré l'ensemble de ces facteurs biotiques et abiotiques, la dégradation des PP n'aboutit pas systématiquement à leur élimination complète, générant parfois des sous-produits. De plus, leur déversement en continu dans l'environnement leur octroie le titre de contaminants pseudo-persistants (Daughton, 2004). Ces molécules étant capables d'agir à très faible dose, leur présence dans les écosystèmes marins constitue donc un risque écotoxicologique pour la faune et la flore marine.

### 1.6. Effets néfastes sur les organismes marins

Les PP sont conçus pour agir sur des cibles moléculaires, enzymatiques ou de signalisation cellulaires spécifiques et produire des effets thérapeutiques chez les organismes cibles (i.e. humains, animaux d'élevages et domestiques). Cependant, les organismes non cibles (i.e. pour lesquels les PP ne sont pas destinés) peuvent présenter des récepteurs communs, conservés au cours de l'évolution, ou compatibles avec ces molécules et subir ainsi des effets non désirables. Les manifestations de ces effets sont très variables en fonction du niveau et de la durée d'exposition ainsi que des systèmes biologiques considérés. Par conséquent, diverses publications ont fait état de tels effets à des concentrations environnementales (ng- $\mu$ g/L) et à différents niveaux d'organisation biologique tels que moléculaire, cellulaire, tissulaire, individuel, voire plus rarement populationnel (Fent et al., 2006). En revanche, peu de ces études se penchent sur les organismes marins, contraignant nos connaissances à une faible visibilité des conséquences des PP sur ces milieux et empêchant des mesures concrètes en faveur de leur protection. Malgré ce nombre limité d'études, une large variété d'effets néfastes a été rapportée chez environ 55 espèces marines, les bivalves suivis des gastéropodes étant les classes les plus étudiées (Fabbri and Franzellitti, 2016; Mezzelani et al., 2018; Prichard and Granek, 2016). Parmi diverses classes thérapeutiques, les principaux effets des PP les plus rapportés dans la littérature sont référencés en Tableau 1.2. A des concentrations environnementales (ng/L- $\mu$ g/L) comme à des concentrations plus élevées ( $\mu$ g/L-mg/L), les PP démontrent des effets sublétaux aux niveaux moléculaire, cellulaire et individuel, avec notamment des effets cytotoxiques, immunotoxiques, génotoxiques ou encore neurotoxiques.

Parce qu'une majorité des effets secondaires d'un traitement à des doses prolongées ou élevées avec des PP concerne la génération d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), une quantité importante de données est disponible sur l'activité des enzymes antioxydantes chez des organismes exposés. Par exemple, une augmentation de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et du glutathion reductase est observée après 3 et 7 jours d'exposition de la moule *M. galloprovincialis* à 250 ng/L d'ibuprofène, puis retourne à des niveaux d'activité basale après 15 jours (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2012). De la même manière, l'activité de la SOD, CAT et glutathion réductase (GR) est augmentée suite à une exposition au diclofénac de la moule méditerranéenne après 3 jours, et retourne à un niveau basal au bout de 7 et 15 jours, malgré la présence continue du PP (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2014). Une telle réponse en « forme de cloche » est souvent obtenue dans les études reportant l'activité enzymatique des défenses antioxydantes. Il est suggéré qu'une réponse cytoprotective soit élaborée à faible concentration, qui pourrait être surpassée à des doses plus élevées ou répétée, entraînant l'accumulation de ROS dans la cellule (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2014). En revanche, la réponse des défenses antioxydantes est parfois plus complexe avec une

induction ou inhibition de l'activité selon les enzymes, qui peut être spécifique des espèces et des tissus étudiés et dépendant du statut physiologique des organismes (Fabbri and Franzellitti, 2016). L'induction du stress oxydant par les PP se traduit généralement par des dégâts causés au niveau des membranes lipidiques des cellules, à travers le phénomène de peroxydation des lipides. Ces produits du stress oxydant ont par exemple été mesurés de façon dose-dépendante chez le crabe *Carcinus maenas* exposé 28 jours à l'antibiotique novobiocine, ou à la carbamazépine, à des concentrations comprises entre 0,1 et 50 µg/L (Aguirre-Martínez et al., 2013). Le stress oxydant peut également causer d'autres dommages affectant le matériel génétique suite à des cassures des brins d'ADN. De tels effets génotoxiques se sont par exemple produits chez *M. galloprovincialis* dès 0,5 µg/L de kétoprofène, 25 µg/L d'acétaminophène ou encore 2,5 µg/L de diclofénac, après 14 jours d'exposition, voire même 60 jours pour le diclofénac (Mezzelani et al., 2016b, 2016a; Mezzelani et al., 2018).

De nombreux auteurs ont investigué le stress cellulaire induit par les PP, particulièrement chez des bivalves marins, à travers l'étude de la stabilité des membranes lysosomales. Les lysosomes sont des organites cytoplasmiques impliqués notamment dans la dégradation et le recyclage du matériel cellulaire obsolète, grâce à une multitude d'enzymes hydrolytiques (ex. protéases, lipases, nucléases, etc.)(Moore, 1985). Les lysosomes constituent également un site central pour la séquestration et l'accumulation de contaminants inorganiques et organiques, et jouent un rôle clé dans les processus de détoxification et d'excrétion de ces composés chez les bivalves (Moore, 1985). En revanche, l'accumulation de xénobiotiques et de leurs métabolites dans les lysosomes peut provoquer une déstabilisation de leur membrane, ayant pour conséquence une diffusion des enzymes hydrolytiques dans le cytosol, suivie de dommages plus sévères pouvant causer la mort cellulaire (Viarengo et al., 2007). Chez *M. galloprovincialis*, une diminution de la stabilité membranaire lysosomale a par exemple été mesurée après 4 jours d'exposition à l'antibiotique oxytétracyclique (1 et 100 µg/L) (Banni et al., 2015). D'autres PP comme l'ibuprofène, la caféine, la carbamazépine et la novobiocine ont également causé une altération de la stabilité de la membrane lysosomale chez la moule *Ruditapes philippinarum*, à des concentrations comprises entre 1 et 50 µg/L ainsi qu'à plusieurs temps d'exposition (7, 14, 21, 28 et 35 jours) (Aguirre-Martínez et al., 2013). Bien plus qu'un biomarqueur du stress cellulaire, la stabilité de la membrane lysosomale a directement été corrélée à la capacité de croissance et de survie des moules (Moore et al., 2006).

Les lysosomes jouent également un rôle dans le système immunitaire. Ceux présents dans les hémocytes (i.e. cellules du système immunitaire présentes chez les invertébrés, circulant dans l'hémolymphe) sont capables d'excréter des hydrolases afin de dégrader les pathogènes en circulation (Grundy et al., 1996). En revanche, une libération imprévue ou non appropriée de ces enzymes pourrait avoir des conséquences désastreuses sur l'intégrité fonctionnelle des hémocytes. Par la perturbation

de la stabilité membranaire des lysosomes présents dans les hémocytes, les PP peuvent donc causer une défaillance du système immunitaire chez ces organismes. La classe des anti-inflammatoires non stéroïdiens semble particulièrement affecter certains paramètres du système immunitaire des moules *M. galloprovincialis* (Mezzelani et al., 2016b; Mezzelani et al., 2018) et *R. philippinarum* (Matozzo, 2014; Milan et al., 2013). En plus d'une déstabilisation des membranes lysosomales, une diminution du ratio granulocytes/hyalinocytes (principaux types d'hémocytes rencontrés chez les bivalves) a été observée chez *M. galloprovincialis* exposée à des AINS, accompagnée d'une inhibition de la capacité phagocytaire, essentielle contre des pathogènes (Mezzelani et al., 2016b; Mezzelani et al., 2018). Parmi les AINS, l'ibuprofène a induit chez *R. philippinarum* une modification de la circulation des hémocytes ainsi qu'une diminution de l'activité de l'enzyme lysozyme dans l'hémolymphe, un agent bactériolytique très important chez les bivalves (Matozzo, 2014; Milan et al., 2013). Les effets des AINS pourraient induire une immunodépression chez les bivalves marins, moins résistants face aux pathogènes.

Des effets neurotoxiques sont également imputables aux PP suite à l'altération de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE), un biomarqueur d'exposition aux composés neurotoxiques. L'AChE joue un rôle important dans le système neuromusculaire en empêchant la contraction musculaire en continu chez les animaux. Une augmentation de l'activité de l'AChE a été mesurée chez *M. galloprovincialis* exposée 3 jours à 75 ng/L de fluoxétine suivi d'un retour à un niveau d'activité basal à 7 jours puis une diminution après 15 jours d'exposition (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2013). Une diminution de l'activité de l'AChE a également été observée chez ce même organisme, exposé 7 jours à de plus faibles (0,03 et 0,3 ng/L) ou plus hautes concentrations (30 et 300 ng/L) de fluoxétine (Franzellitti et al., 2014).

Certains PP sont également capables d'affecter des fonctions à l'échelle de l'individu chez des organismes marins. La simvastatine, un hypolipémiant, impacte fortement la croissance, le développement des gonades et la reproduction de l'amphipode estuarien *Gammarus locusta*, après une exposition de 45 jours à des concentrations comprises entre 320 et 8000 ng/L (Neuparth et al., 2014). D'autres PP sont susceptibles de provoquer des déformations lors du développement larvaire de *M. galloprovincialis* comme le diclofénac à partir de faibles concentrations (10-100 ng/L ; 96 h), ou encore l'ibuprofène et le bézafibrate (hypolipémiant) à des concentrations plus élevées (10-1000 µg/L) (Fabbri et al., 2014). A de fortes concentrations (0,1-10 mg/L), le diclofénac et le propranolol peuvent également diminuer l'abondance et la force du byssus de la moule bleue *Mytilus edulis trossulus* après 8 et 21 jours d'exposition. Le byssus constitue un ensemble de filaments permettant à la moule de se fixer à un substrat, indispensable pour sa survie.

Enfin, le comportement des organismes marins peut être affecté par la présence de PP dans le milieu. La fluoxétine a notamment démontré des effets à très faibles concentrations (1-100 ng/L ; 15 jours) en altérant la capacité de camouflage et l'activité d'extraction du sable de la sèche *Sepia officinalis*, rendant cet organisme plus exposé à la prédation (Di Poi et al., 2014). La fluoxétine semblerait également affecter la mémoire de ce même organisme (Di Poi et al., 2013). Chez la moule *M. galloprovincialis* le taux de filtration pour se nourrir est significativement diminué suite à une exposition au propranolol (147 µg/L ; 10 jours) tandis que l'acétaminophène induit une augmentation de ce taux (23-403 µg/L ; 10 jours) (Solé et al., 2010).

Les données disponibles sur l'exposition des organismes marins reposent principalement sur des études en conditions contrôlées de laboratoire, fournissant des preuves convaincantes des effets sublétaux des PP observés chez ces organismes, même à des concentrations environnementales pertinentes. Cependant, davantage de connaissances sont requises sur les effets potentiels des PP sur les organismes non-cibles pour permettre d'interpréter des effets complexes après des expositions *in situ* et de discriminer la contribution des PP parmi une large combinaison de facteurs stress (Fabbri and Franzellitti, 2016).

**Tableau 1.2 :** Principaux effets de diverses classes thérapeutiques de PP sur les organismes marins.

Classe thérapeutique	Espèce	Molécule	Conditions d'exposition	Effets	Références		
Anti-inflammatoires non stéroïdiens	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Acétaminophène	0,5-2,5-25 µg/L ;	Altération du <b>système immunitaire</b> (stabilité membranaire lysosomale, ratio granulocytes/hyalinocytes, activité phagocytaire), modulation du <b>métabolisme des lipides</b> (inhibition de l'activité enzymatique Acyl-CoA oxydase, lipides neutres, contenu en lipofuscines), <b>dommage à l'ADN</b> , variation du profil transcriptionnel (gènes impliqués dans le <b>renouvellement cellulaire</b> , les <b>fonctions immunitaires</b> , le <b>métabolisme de l'acide arachidonique</b> et des lipides)	Mezzelani et al., 2016a,b, 2018		
		Diclofénac	14, 30, 60 jours				
		Ibuprofène					
		Kétoprofène					
		Nimesulide					
			Diclofénac	250 ng/L ; 3, 7, 15 jours	Induction d' <b>enzymes antioxydantes</b> (CAT, SOD, GR), augmentation de la <b>peroxydation lipidique</b> , <b>perturbation endocrinienne</b> (augmentation alkali-labile phosphate), <b>métabolisme de phase II</b> (GST), modulation de la <b>voie des protéines NF-κB</b>	Gonzalez-Rey and Bebianno, 2011; 2012; 2014; Maria et al., 2016	
			<i>Mytilus edulis trossulus</i>	Diclofénac	1-100-1000-5000-10000 µg/L ; 8, 14, 19 et 21 jours	Diminution de la force du <b>byssus</b> et de l' <b>énergie</b> disponible pour la <b>croissance</b> et la <b>reproduction</b>	Ericson et al., 2010
			<i>Ruditapes philippinarum</i>	Ibuprofène	100-500-1000 µg/L ; 1, 3, 5, 7 jours	Altération du <b>système immunitaire</b> , expression de gènes impliqués dans le <b>métabolisme de l'acide arachidonique</b> , l' <b>apoptose</b> , les récepteurs activés par les <b>proliférateurs de peroxysomes</b> , le <b>métabolisme des protéines NF-κB</b> et le <b>métabolisme des xénobiotiques</b> , inhibition des activités de la <b>superoxyde dismutase</b> (SOD), de l' <b>acétylcholinestérase</b> et du <b>lysozyme</b>	Matozzo et al., 2012; Milan et al., 2013
			<i>Carcinus maenas</i>	Ibuprofène	0,1-5-10-50 µg/L ; 28 jours	Altération de la <b>stabilité membranaire lysosomale</b> , <b>stress oxydant</b> (GPX), <b>dommage à l'ADN</b> , <b>peroxydation lipidique</b> , <b>métabolisation de phase I</b> (cytochrome P4501A) et <b>II</b> (GST)	Aguirre-Martínez et al., 2013c
			<i>Crassostrea gigas</i>	Acétaminophène Ibuprofène	1-100 µg/L ; 1, 4, 7 jours	Expression des gènes impliqués dans la <b>métabolisation</b> et la <b>biotransformation des xénobiotiques</b>	Bebianno et al., 2017; Serrano et al., 2015
Psychotropes	<i>M. galloprovincialis</i>	Carbamazépine	0,1-10 µg/L ; 7 jours	Altération de la <b>stabilité membranaire lysosomale</b> , perturbation de la <b>voie de l'AMPc</b> (activité protéine kinase A, niveaux d'AMPc, expression du gène <i>MgPgp</i> ), <b>stress oxydant</b> (CAT), <b>dommage à l'ADN</b> , <b>peroxydation lipidique</b> , <b>métabolisme de phase II</b> (GST)	Martin-Díaz et al., 2009		
		Fluoxétine	0,03-0,3-3-30-300 ng/L ; 7 jours	Altération des <b>lysosomes</b> (stabilité membranaire, ratio du volume lysosome/cytoplasme, contenu en lipides neutres et lipofuscines), perturbation de la <b>voie de l'AMPc</b> (activité protéine kinase A, niveaux d'AMPc), <b>stress oxydant</b> (CAT), <b>métabolisme de phase II</b> (GST), <b>peroxydation lipidique</b> , diminution de l' <b>activité de l'acétylcholinestérase</b> , inhibition de l'expression d'un gène impliqué dans les <b>voies de détoxification</b> (gène ABCB codant pour le transporteur ABC P-glycoprotéine lié au MXR)	Franzellitti et al., 2014		
		Fluoxétine	75 ng/L ; 3, 7 et 15 jours	<b>Stress oxydant</b> (CAT, SOD), <b>peroxydation lipidique</b> , <b>métabolisme de phase II</b> (GST), perturbation de l' <b>activité de l'acétylcholinestérase</b> , perturbation du <b>système endocrinien</b> (diminution des niveaux d'alkali-labile phosphate chez les mâles et femelles)	Gonzalez-Rey and Bebianno, 2013		
			<i>M. galloprovincialis ; Venerupis philippinarum</i>	Carbamazépine	0,03-0,3-3-6-9 µg/L ; 7 et 28 jours	<b>Stress oxydant</b> (CAT, SOD, GR), <b>peroxydation lipidique</b> , <b>métabolisme de phase I</b> (cytochrome P450 3A4) et <b>II</b> (GST), perturbation des <b>capacités reproductives</b> (indice gonado-somatique) et de <b>croissance</b> (indice de condition), baisse de l' <b>activité de filtration</b>	Almeida et al., 2015; Oliveira et al., 2017
			<i>Sepia officinalis</i>	Fluoxétine	1-100 ng/L ; 15 jours	Altération de la <b>capacité de camouflage</b> , augmente l' <b>activité d'extraction de sable</b> , altération de la <b>voie dopaminergique</b> , altération de la <b>mémoire</b>	Di Poi et al., 2013, 2014

**Tableau 1.2** (continu)

Classe thérapeutique	Espèce	Molécule	Conditions d'exposition	Effets	Références
Cardiovasculaires	<i>M. galloprovincialis</i>	Propranolol	<b>0,3-3-30-300-30000</b> ng/L ; 7 jours	Altération du <b>système immunitaire</b> , perturbation de la <b>voie de l'AMPc</b> (activité protéine kinase A, expression du gène <i>MgPgp</i> , niveaux d'AMPc), <b>stress oxydant</b> (CAT), <b>métabolisme de phase II</b> (GST)	Franzelli et al., 2011, 2013
	<i>M. edulis trossulus</i>	Propranolol	<b>1-100-1000-5000-10000</b> µg/L ; <b>8, 14, 19</b> et <b>21</b> jours	Diminution de la force du <b>byssus</b> et de l' <b>énergie</b> disponible pour la <b>croissance</b> et la <b>reproduction</b>	Ericson et al., 2010
Antibiotiques	<i>M. galloprovincialis</i>	Oxytétracycline	<b>1-100</b> µg/L ; 4 jours	Altération de la <b>stabilité membranaire lysosomale</b> , <b>peroxydation lipidique</b> , inhibition du <b>métabolisme de phase II</b> (GST), augmentation des niveaux d'AMPc	Banni et al., 2015
	<i>Carcinus maenas</i>	Novobiocine	<b>0,1-1-10-50</b> µg/L ; 28 jours	Induction du <b>métabolisme de phase I</b> (cytochrome P4501A) <b>et II</b> (GST), <b>stress oxydant</b> , <b>peroxydation lipidique</b> , <b>dommage à l'ADN</b>	Aguirre-Martínez et al., 2013a
	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Novobiocine	<b>0,1-1-10-50</b> µg/L ; 35 jours	Altération de la <b>stabilité membranaire lysosomale</b>	Aguirre-Martínez et al., 2013b
Stimulants	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Caféine	<b>0,1-5-15-50</b> µg/L ; 35 jours	Altération de la <b>stabilité membranaire lysosomale</b>	Aguirre-Martínez et al., 2013b
	<i>Carcinus maenas</i>	Caféine	<b>0,1-5-15-50</b> µg/L ; 28 jours	Altération de la <b>stabilité membranaire lysosomale</b> , <b>stress oxydant</b> (GPX), <b>dommage à l'ADN</b> , <b>peroxydation lipidique</b> , <b>métabolisation de phase I</b> (cytochrome P4501A) <b>et II</b> (GST)	Aguirre-Martínez et al., 2013c
Hypolipémiants	<i>Mytilus</i> spp.	Gemfibrozil	<b>1-1000</b> µg/L ; <b>24</b> et <b>96</b> heures	<b>Peroxydation lipidique</b> , <b>dommage à l'ADN</b> , <b>perturbation endocrinienne</b> (modulation alkali-labile phosphate), <b>métabolisme de phase II</b> (GST)	Schmidt et al., 2011
	<i>Gammarus locusta</i>	Simvastatine	<b>64-320-1200-8000</b> ng/L ; 45 jours	Impact sur la <b>croissance</b> , le <b>développement des gonades</b> et la <b>reproduction</b>	Neuparth et al., 2014
Hormones stéroïdiennes	<i>Hediste diversicolor</i>	17α-éthynylestradiol	<b>0,01-0,1-1-10-100</b> ng/g de sédiment ; 14 jours	Induction du <b>métabolisme de phase I</b> (cytochrome P4501A), <b>stress oxydant</b> (GR), <b>peroxydation lipidique</b> , altération de l'activité de l' <b>acétylcholinestérase</b> , inhibition de l' <b>activité de la monoamine oxydase (MAO)</b> et des <b>cyclooxygénases (COX)</b>	Maranho et al., 2014; 2015

*En gras sont marqués les conditions d'exposition pour lesquelles des effets significatifs ont été mesurés.*

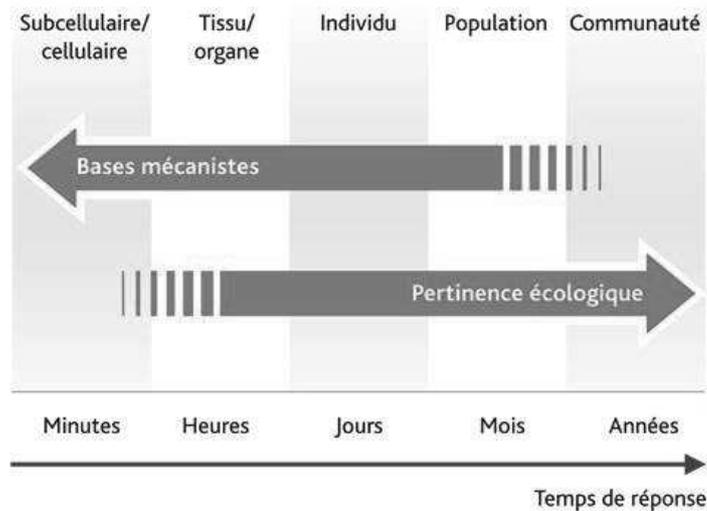
### 1.7. Conclusion sur la problématique des PP en milieu marin

Les informations présentes dans la littérature attestent bien de la contamination des écosystèmes marins par les PP, dont les principales voies d'entrée dans le milieu ont été identifiées. Introduit en continue, majoritairement *via* les effluents de STEP, les PP ont été mesurés dans les différents compartiments du milieu marin, que sont l'eau et les sédiments, ainsi que dans les tissus d'organismes vivants. A ce niveau, l'étude bibliographique a révélé un manque de considération des métabolites issus de la dégradation ou de la biotransformation des PP lors de la caractérisation de la contamination dans le milieu ou dans l'organisme. Les métabolites pouvant avoir une activité biologique similaire voire plus importante que celle de la molécule mère, il est essentiel de les prendre en compte pour une meilleure caractérisation de l'exposition et donc une meilleure compréhension des liens de cause à effet.

La biodisponibilité des PP est avérée et constitue donc un risque pour les organismes marins. En effet, l'exposition de ces derniers à de tels contaminants peut engendrer des effets néfastes sur l'organisme, comme cela a été prouvé par de nombreuses études conduites en laboratoire pour la plupart. L'un des challenges actuels est de pouvoir expliquer d'un point de vue mécanistique comment les PP sont capables de causer les effets observés par exemple sur la croissance, la reproduction, le comportement ou bien sur la réponse de biomarqueurs mesurés chez des organismes exposés. La connaissance du mécanisme d'action d'une molécule constitue un maillon essentiel dans la compréhension des liens de cause à effet. Cependant, cette notion de lien de causalité se complexifie lorsque les conditions d'exposition tendent vers des conditions environnementales plus réalistes. En effet, dans l'environnement un PP ne se trouve pas seul mais co-existe avec d'autres PP ainsi qu'une multitude de contaminants divers et variés. Intégrer progressivement cette complexité dans le design expérimental permettrait une compréhension plus réaliste de l'impact des PP et des contaminants en général sur le milieu marin.

2. Relation de cause à effet entre contaminants et organismes : différents niveaux de complexités

La clé pour prédire les effets des contaminants sur les populations et communautés dans l'environnement est de comprendre les mécanismes sous-jacents. Bien que les effets au niveau populationnel et communautaire soient plus pertinents d'un point de vue écologique, l'étude de la relation de cause à effet au niveau de l'individu, et plus particulièrement aux niveaux cellulaire et subcellulaire, offre en revanche davantage de connaissances mécanistiques (Figure 1.2). Les réponses biologiques à un contaminant peuvent être reliées à des altérations cellulaires ou subcellulaires de certains tissus ou organes spécifiques. La mesure de ces altérations constitue un indicateur précoce et sensible (i.e. biomarqueur) de l'exposition à des contaminants ou à leurs effets. La compréhension de cette relation de cause à effet est donc essentielle pour la mise en place d'outils de prédiction applicables à la biosurveillance des milieux et à l'évaluation du risque environnemental.



**Figure 1.2 :** Pertinence mécanistique ou écologique selon le niveau d'organisation biologique étudié (Source : IRSN)

Pour y parvenir, il est indispensable de caractériser deux processus étroitement liés, qui définissent notamment le degré de toxicité d'une substance : la toxicocinétique (i.e. effet de l'organisme sur la substance) et la toxicodynamie (i.e. effet de la substance sur l'organisme) (Figure 1.3). La toxicocinétique couvre les phénomènes d'absorption, de distribution tissulaire, de métabolisme et d'excrétion, c'est-à-dire qu'elle a pour principal objectif de déterminer la quantité de substance toxique susceptible d'atteindre sa cible biologique et de préciser sous quelle forme (composé initial ou métabolites) elle y parvient. La toxicodynamie se préoccupe de l'interaction du xénobiotique avec sa cible (i.e. mécanisme d'action) et de l'effet toxique que cela produit (i.e. mode d'action). De façon générale, plus la forme toxique d'un xénobiotique est capable d'atteindre la cible et plus cette dernière est sensible à l'agent exogène et plus l'effet toxique sera important. Les caractéristiques physico-

chimiques d'un contaminant déterminent le type (ex. liaison covalente, interaction ionique, interaction de van der Waals, etc.) et le degré d'interaction avec des molécules biologiques cibles (ex. ADN, protéines/peptides ou lipides membranaires). Un seul contaminant est susceptible d'avoir plusieurs types d'interactions ou des interactions avec différentes cibles biologiques (i.e. mécanismes d'action) et, par conséquent, causer de multiples effets biologiques (i.e. modes d'action) (Escher and Hermens, 2002). Ainsi, il est donc nécessaire de découvrir l'ensemble des mécanismes et modes d'action d'un contaminant afin d'évaluer son risque pour l'environnement, et ce, pour de nombreuses espèces et à différents stades de développement.

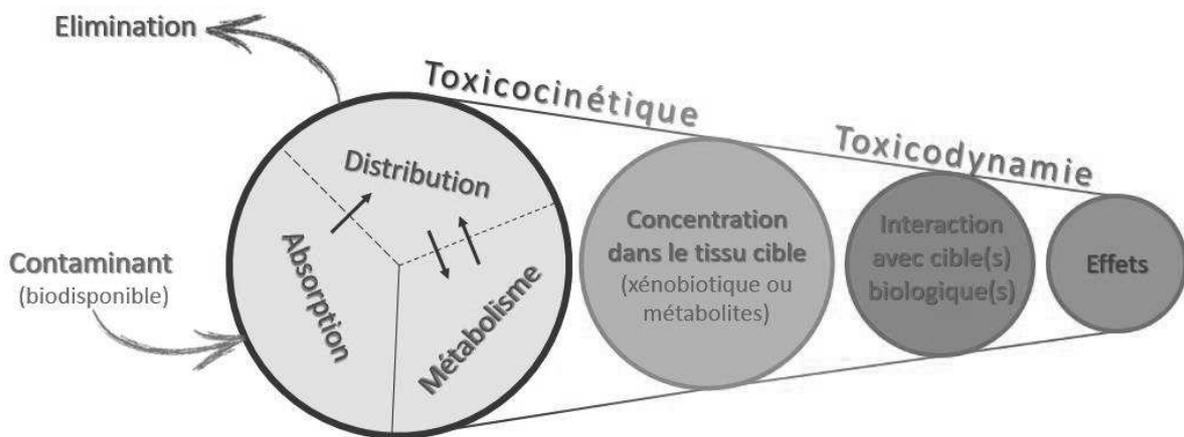


Figure 1.3 : Schématisation des concepts de toxicocinétique et de toxicodynamie

Toutefois, étudier la réponse d'un organisme à un seul contaminant consiste à simplifier les conditions d'exposition. Dans l'environnement, les organismes sont en réalité continuellement exposés à des mélanges chimiques composés de divers contaminants, de différentes formes chimiques (espèces chimiques), de métabolites ou de contaminants en complexes (Eggen et al., 2004). Les interactions entre ces contaminants sont susceptibles de modifier leur toxicocinétique et/ou toxicodynamie et engendrer des effets additifs, synergiques ou antagonistes chez les organismes (Spurgeon et al., 2010). De nombreuses études ont ainsi investigué ces différentes interactions en exposant des organismes à des mixtures de contaminants générées en laboratoire, tandis que d'autres études se sont plutôt concentrées sur les effets de mélanges complexes représentatifs d'une contamination environnementale, tels que les rejets de STEP. Cette partie a donc pour objectif d'exposer l'apport des connaissances de l'étude des trois niveaux de complexité : (i) molécule seule ; (ii) mixture générée en laboratoire ; (iii) mélange environnemental complexe, et ce, à travers des exemples basés sur la problématique des PP.

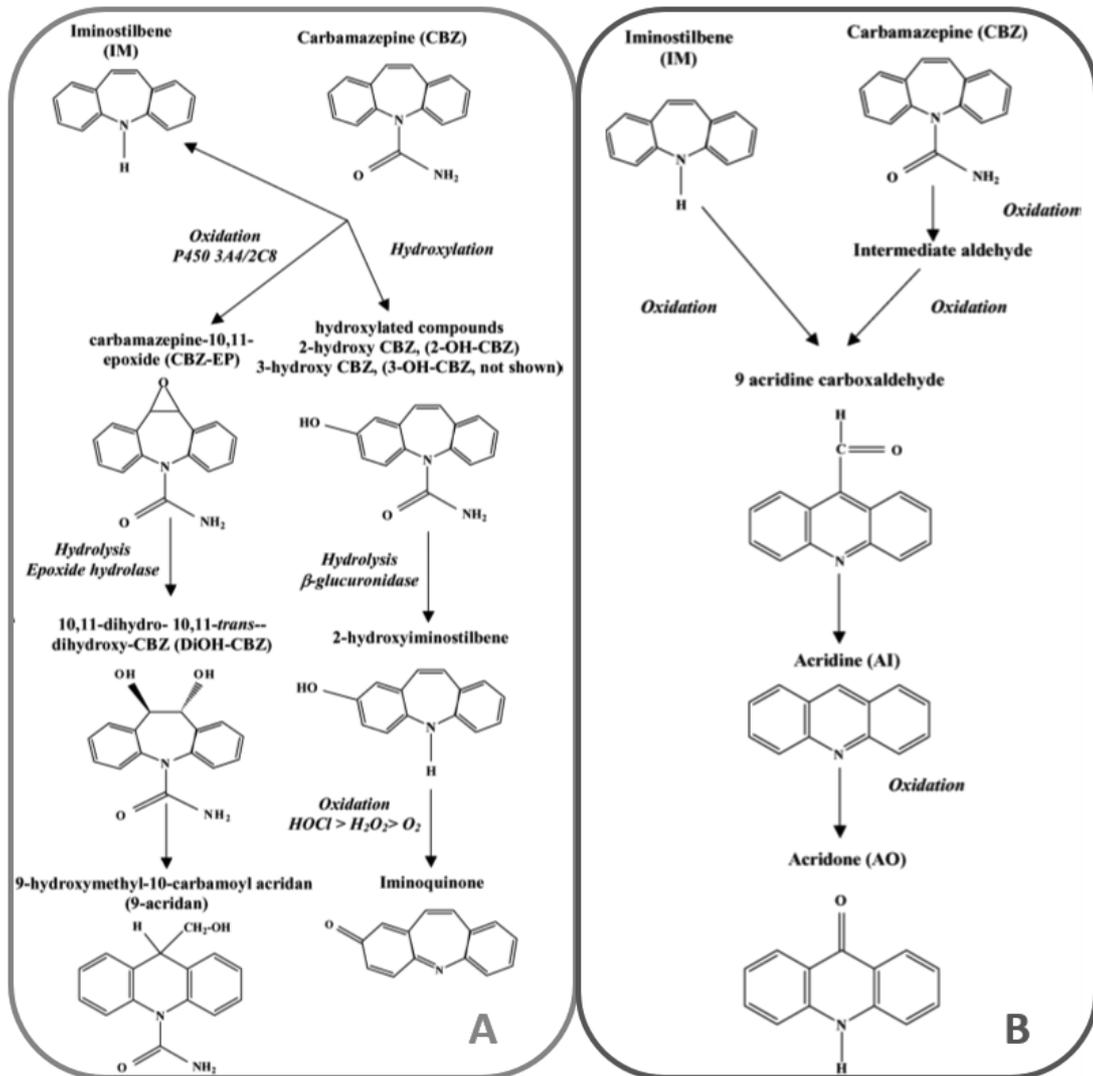
## 2.1. Molécule seule : cas de la carbamazépine

La carbamazépine (CBZ), est un PP à usage humain largement prescrit pour le traitement de l'épilepsie ainsi que pour d'autres applications psychothérapeutiques. Cependant, la CBZ est devenue préoccupante pour l'environnement étant donné sa présence dans tous les milieux aquatiques, fréquemment détectée dans les influents et effluents de STEP, les eaux de surface, les eaux marines, les eaux souterraines et les eaux de consommation, à des concentrations comprises entre 2 ng/L et 6,3 µg/L (Arpin-Pont et al., 2016; Zhang et al., 2008). Son caractère ubiquiste s'explique par son faible taux d'abattement dans les STEP (< 20 %; Margot et al., 2015) et sa faible (bio)dégradation dans l'environnement (Benotti and Brownawell, 2009; Calisto et al., 2011). Par conséquent, la CBZ a été désignée comme étant un marqueur anthropique de la pollution urbaine (Clara et al., 2004; Hai et al., 2018). De plus, la CBZ s'avère difficilement adsorbée par les sédiments ou particules solides, restant dans la phase aqueuse et donc biodisponible notamment pour les organismes filtreurs comme les mollusques bivalves (Ternes et al., 2004; Zhang et al., 2008). La CBZ et certains de ces métabolites ont déjà été détectés dans les tissus de bivalves marins (Alvarez-Muñoz et al., 2015a; Martínez Bueno et al., 2013; McEneff et al., 2013; Wille et al., 2011), et représente le PP le plus fréquemment détecté dans les tissus de la moule *M. galloprovincialis* (Mezzelani et al., 2020). Des études de toxicocinétique et de toxicodynamie permettraient de mieux comprendre les différents effets néfastes susceptibles de se produire chez ces organismes suite à une exposition à la CBZ.

### 2.1.1. Toxicocinétique : absorption, distribution, métabolisme, excrétion

Chez l'être humain, l'organisme cible, la CBZ est bien absorbée après administration orale. Sa biodisponibilité est de 80 % et son pic plasmatique est atteint 2 à 8 h après une dose unique (Ayano, 2016). La CBZ est détectée dans la salive, le plasma et le fluide cérébrospinal. Dans le plasma, la CBZ est principalement liée à des protéines (70-80 %) (Ayano, 2016). Son temps de demi-vie dans le plasma est d'environ 30 heures pour une dose unique (Ayano, 2016). Cependant, après une administration sur le long terme, sa demi-vie diminue à environ 15 heures (Ayano, 2016). Ce changement apparaît suite à une forte induction des enzymes hépatiques P450 par la CBZ, et augmente par conséquent le taux de métabolisation de la CBZ elle-même (auto induction). La CBZ possède plusieurs voies métaboliques qui se traduisent par 33 métabolites identifiés dans l'urine (Lertratanangkoon and Horning, 1982). La voie la plus importante comprend la transformation métabolique de la CBZ en CBZ-10,11-époxyde, un métabolite pharmacologiquement actif, transformé ensuite en 10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxy-CBZ (Figure 1.4A). Cette voie majeure catalysée par des époxydes hydrolases représente plus de la moitié du métabolisme total de la CBZ (Jiang et al., 2019). Les deux autres voies métaboliques

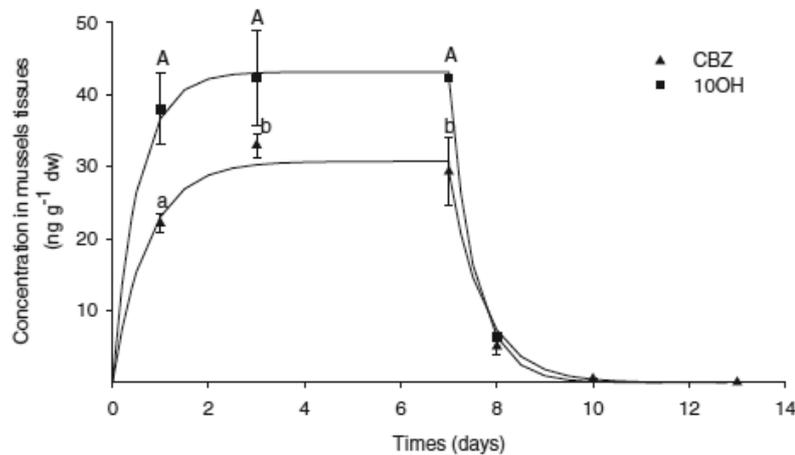
principales dans le foie sont la formation de la 2-hydroxy-CBZ et de la 3-hydroxy-CBZ, ainsi que la production d'imino stilbène (Figure 1.4A). Outre le foie, les leucocytes, en raison de leur fonction immunitaire, sont aussi impliqués dans l'oxydation de la CBZ. Ainsi, la myéloperoxydase joue un rôle important dans la formation d'une série de métabolites comme l'acridine et l'acridone (Figure 1.4B). La fraction de CBZ éliminée dans l'urine sous forme inchangée représente environ 1 à 3 % de la dose totale (Milovanovic and Jankovic, 2011). Les métabolites quant à eux peuvent être excrétés sous leur forme libre ou bien conjugués à un acide glucuronique (Kudriakova et al., 1992).



**Figure 1.4 :** Métabolisme principal de la carbamazépine (CBZ) dans le foie (A) et par les leucocytes (B). Pour les composés hydroxylés, seule l'hydroxylation en position 2 est représentée (adaptée de Breton et al., 2005).

Cependant, les données toxicocinétiques de la CBZ sont très peu renseignées chez les organismes non cibles et plus particulièrement chez les invertébrés. Quelques études ont toutefois rapporté des facteurs de bioconcentration (BCF) et des données de biotransformation de la CBZ chez des gammars et des bivalves. Chez *Gammarus pulex* exposé 48 h à 1 µg/L de CBZ, suivi d'une phase de dépuración de 48 h, le BCF a été estimé à environ 30 L.Kg<sup>-1</sup> (Miller et al., 2017), contre environ 5

L.Kg<sup>-1</sup> chez *Gammarus fossarum* (Sordet et al., 2016). Par ailleurs, Boillot et al. (2015) ont déterminé un BCF de 3,9 L.Kg<sup>-1</sup> dans les tissus de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* exposée 7 jours à 10 µg/L de CBZ, suivi d'une phase de dépuraction de 7 jours. Dans cette même expérience, la courbe cinétique d'accumulation de la CBZ révèle un plateau atteint au bout de 3 jours jusqu'au 7<sup>ème</sup> (30 ng/g), avant de chuter après une demi-journée suivant la phase de dépuraction, jusqu'à rejoindre un niveau 0 vers le 10<sup>ème</sup> jour (Figure 1.5). Au vue de ces données, la CBZ s'accumule relativement peu dans les tissus de ces organismes et semble donc rapidement métabolisée et excrétée. Ce faible potentiel de bioaccumulation est en accord avec le log Kow de la CBZ compris entre 2,15 et 2,45, mais également avec les faibles BCF obtenus pour d'autres PP polaires (log Kow < 3,2) (Gomez et al., 2012). Chez *M. galloprovincialis*, la CBZ se distribue dans l'ensemble des tissus (ex. glande digestive, branchie, manteau) avec une légère préférence pour la glande digestive (Boillot et al., 2015), haut lieu de métabolisation des xénobiotiques chez cet organisme (Faggio et al., 2018).



**Figure 1.5 :** Cinétique d'accumulation (jour 0 à 7) et de dépuraction (jour 7 à 13) de la carbamazépine (CBZ) et d'un autre composé (la 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazépine ; 10OH ; métabolite actif de l'oxcarbazépine) chez *M. galloprovincialis* exposée à 10 µg/L de CBZ (ou de 10OH). La courbe correspond au modèle cinétique de premier ordre. La lettre « A » indique une absence de différence significative tandis que « a » et « b » sont significativement différents (Boillot et al., 2015).

Parmi les différents métabolites de la CBZ connus chez l'être humain, Boillot et al. (2015) ont également recherché 5 d'entre eux dans les tissus de la moule (CBZ-10,11-époxyde ; 10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxy-CBZ ; 2-hydroxy-CBZ ; acridine et acridone). Ils ont ainsi mis en évidence la capacité de *M. galloprovincialis* à métaboliser la CBZ en CBZ-10,11-époxyde et acridine. Chez *Scrobicularia plana*, un autre bivalve, Abdelhafidh et al. (2018) ont démontré la présence de la 3-hydroxy-CBZ après une exposition à la CBZ, sans que la 2-hydroxy-CBZ, la CBZ-10,11-époxyde, la 10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxy-CBZ et des CBZ-glucuronides n'aient été détectées. L'étude de Miller et al. (2017), conduite sur la toxicocinétique de la CBZ chez *G. pulex*, a également confirmé la présence de la CBZ-10,11-époxyde après 24 h et 48 h d'exposition, tandis que ce métabolite n'est plus détecté après la phase de dépuraction (48 h supplémentaires). Certaines études conduites sur les invertébrés,

ont observé l'induction de l'activité de certaines enzymes responsables de la biotransformation de la CBZ. Almeida et al. (2015, 2014) ont ainsi mesuré l'induction de l'activité enzymatique des cytochromes P450 3A4 (CYP3A4) chez les bivalves *Venerupis decussata* et *Venerupis philippinarum* suite à une exposition chronique (28 jours) ou aiguë (96 h) à 0,03 ; 0,3 ; 3 et 9 µg/L de CBZ. En revanche, la capacité de métabolisation chez *V. philippinarum* semble moins importante aux plus hautes concentrations (3 et 9 µg/L) après 28 jours d'exposition, suggérant probablement une inhibition de l'activité CYP3A4 par la CBZ à forte concentration (Almeida et al., 2015). Les glutathion-S-transférases (GST) sont une autre famille d'enzymes de biotransformation de phase II dont l'activité a souvent été induite chez des invertébrés suite à l'exposition de la CBZ (Aguirre-Martínez et al., 2015; Almeida et al., 2015, 2014; Freitas et al., 2016; Martin-Díaz et al., 2009; Vernouillet et al., 2010). Ces enzymes pourraient être impliquées dans la formation de métabolites thiol résultant de l'oxydation de la CBZ, dans laquelle le glutathion (GSH) serait conjugué au groupe carbonyle (C=O) de celle-ci (Vernouillet et al., 2010).

L'étude de la biotransformation de la CBZ chez les invertébrés étant uniquement basée sur les métabolites connus chez l'être humain, aucune voie métabolique spécifique à ces organismes n'a été découverte à ce jour.

### 2.1.2. Mécanisme d'action

Les mécanismes d'action de la CBZ sont essentiellement renseignés chez les mammifères. La CBZ pourrait agir à différents niveaux (canaux, récepteurs et voies de signalisation), sa principale cible étant les canaux sodiques voltage-dépendants (Ambrósio et al., 2002). La CBZ stabilise l'état inactivé de ces canaux ayant pour conséquence une diminution de l'influx d'ions sodium Na<sup>+</sup>. De manière plus incertaine, la CBZ exercerait aussi un effet antagoniste sur les canaux calciques Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants et modulerait le courant des canaux potassiques K<sup>+</sup> voltage-dépendants. D'autres mécanismes semblent être induits sous l'action directe ou indirecte de la CBZ (Ambrósio et al., 2002; Ayano, 2016). Cette dernière a été démontrée comme agoniste des récepteurs GABA constitués des sous-unités α1, β2 et γ2. GABA est un neurotransmetteur inhibiteur qui joue un rôle important dans la régulation de la neurotransmission de la dopamine et du glutamate. La CBZ pourrait exercer des effets anti glutamatergiques notamment par une diminution de la libération du glutamate. La CBZ entrainerait indirectement une perturbation de la voie dopaminergique avec pour conséquence une diminution de la libération et du renouvellement de la dopamine, mais également de la norépinephrine. La voie sérotoninergique serait également affectée suite à une libération plus importante de la sérotonine, la CBZ serait peut-être même un inhibiteur de la recapture de celle-ci.

L'interaction de la CBZ avec les sites de liaison de l'adénosine a aussi été reportée dans le cerveau. La CBZ agit comme un antagoniste des récepteurs adénosine A<sub>1</sub> et pourrait agir sur les récepteurs A<sub>2</sub> de façon plus incertaine. La CBZ interagit avec d'autres récepteurs comme les récepteurs benzodiazépines. Enfin, d'autres études montrent que la CBZ inhibe l'activité de l'adénylate cyclase et par conséquent diminue les niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans le fluide cérébrospinal (Ambrósio et al., 2002; Montezinho et al., 2007; Palmer, 1979), diminue l'incorporation de l'acyl-coenzyme A et le renouvellement de l'acide arachidonique dans les phospholipides du cerveau (Bazinet et al., 2006), et inhibe l'histone désacétylase qui joue un rôle important dans l'expression des gènes (Beutler et al., 2005).

En se basant sur les mécanismes d'action de la CBZ connus chez les mammifères, quelques études ont investigué ces mécanismes chez des organismes non cibles tels que les invertébrés. Suivant cette stratégie, Martin-Diaz et al. (2009) ont étudié chez la moule *M. galloprovincialis* l'effet de la CBZ sur l'AMPC, mais également sur deux autres processus dépendants des niveaux de l'AMPC dans la cellule, comme l'activité de la protéine kinase A et l'expression de trois gènes (*MgPgp*, *MgMrp2* et *MgMvp*) relatifs au mécanisme de résistance cellulaire aux xénobiotiques (MXR). Similairement à l'être humain, cette étude a montré une diminution des niveaux d'AMPC sous l'action de la CBZ (0,1 et 10 µg/L ; 7 jours), et ce, dans les différents tissus de la moule (manteau/gonades, branchies et glande digestive). De la même manière, cette diminution s'est traduite par une baisse de l'activité de la protéine kinase A et une moindre expression des trois gènes MXR. Ces résultats suggèrent donc pour cet organisme que la CBZ interagit directement avec l'enzyme adénylate cyclase (AC), et/ou avec les récepteurs membranaires couplés au système AC/AMPC. Le mécanisme d'action de la CBZ a également été vérifié au niveau de la neurotransmission des récepteurs GABA chez le bivalve *V. philippinarum* (Almeida et al., 2018b). Dans cette étude, la CBZ a augmenté la transcription du gène relatif au récepteur GABA, et pourrait être, comme chez l'être humain, un agoniste des récepteurs GABA chez ce bivalve. Par ailleurs, l'exposition du bivalve *S. plana* à la CBZ a également conduit à une élévation de la concentration des ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup>, indiquant que la CBZ pourrait affecter l'homéostasie cellulaire acido-basique (Freitas et al., 2016). Un trouble de cet équilibre (l'acidose) a été signalé comme un effet secondaire d'une surdose de CBZ chez l'être humain (Hughes et al., 1985).

Ces différents mécanismes d'action de la CBZ découverts sur les invertébrés peuvent potentiellement engendrer des effets non désirés. De plus, davantage de mécanismes d'action sont susceptibles d'opérer chez les organismes non cibles pouvant conduire eux aussi à des effets néfastes, dont certains ont pu être observés chez les invertébrés tels que décrits dans la partie suivante.

2.1.3. Effets néfastes sur les invertébrés

La majorité des études concernant les effets de la CBZ sur les invertébrés s'est focalisée sur la réponse initiale de ces organismes par la mesure de biomarqueurs, indicateurs d'effets précoces de l'exposition à des contaminants.

Les biomarqueurs du stress oxydant comptent parmi les plus fréquemment mesurés chez les invertébrés, notamment chez les mollusques bivalves exposés à la CBZ. L'activité d'enzymes antioxydantes, comme la CAT, la SOD ou la GR, neutralise l'effet néfaste des ROS produites notamment lors de la détoxification ou métabolisation d'un xénobiotique. Par exemple, (Oliveira et al., 2017) ont mesuré une baisse de l'activité enzymatique de la CAT, SOD et GR avec l'augmentation de la concentration de la CBZ (0,03 à 9 µg/L) suite à l'exposition de *M. galloprovincialis* pendant 96 h. La diminution des défenses du système antioxydant pourrait révéler que le CBZ n'a pas produit suffisamment de ROS pour déclencher l'activation de ces enzymes. Cette hypothèse est supportée par une absence de dommage des membranes cellulaires, traduite par une diminution des niveaux de peroxydation lipidique (LPO) lorsque les concentrations de CBZ augmentent. D'autres études ont cependant mis en évidence l'apparition d'un stress oxydant suite à l'induction de l'activité enzymatique de la SOD et GR, ayant pour conséquence une augmentation des niveaux de LPO, comme c'est le cas chez *V. philippinarum* après 28 jours d'exposition à 9 µg/L de CBZ (Almeida et al., 2014). L'induction d'un stress oxydant par la CBZ semble donc dépendante de l'espèce, de la dose et du temps d'exposition.

La CBZ s'avère cytotoxique pour des hémocytes prélevés chez *M. galloprovincialis* (Tsiaka et al., 2013) et la moule zébrée *Dreissena polymorpha* (Parolini et al., 2011). Après 24 h d'exposition, la viabilité cellulaire diminue chez *M. galloprovincialis* avec l'augmentation de la concentration, soit 50 % moins viable à 0,01 et 10 µg/L contre 60 % à 100 µg/L. Chez *D. polymorpha*, la viabilité cellulaire est affectée en 24 h pour la dose la plus élevée (10 mg/L) et en 96 h pour les doses plus faibles (1 et 100 µg/L). Un autre biomarqueur du stress cellulaire est affecté par la CBZ comme la stabilité membranaire des lysosomes. Martin-Diaz et al. (2009) ont montré une diminution de la stabilité membranaire des lysosomes présents dans les hémocytes de *M. galloprovincialis*, de 60 % à 0,1 µg/L et de 80 % à 10 µg/L après 7 jours d'exposition. Une corrélation négative a également été relevée entre la dose et l'effet de la CBZ, avec un impact plus marqué sur la stabilité membranaire lysosomale des hémocytes de la moule *V. philippinarum* à 0,1 qu'à 50 µg/L, et ce, du 7<sup>ème</sup> au 35<sup>ème</sup> jour d'exposition (Aguirre-Martínez et al., 2013). Comme vu précédemment, l'altération des lysosomes pourrait avoir un impact sur le système immunitaire, dans lequel ils jouent un rôle majeur chez les bivalves (Gosling, 2015). D'autres éléments supportent l'immunotoxicité de la CBZ chez les bivalves. Parmi de nombreux PP investigués dans l'étude de Gagné et al. (2006), la CBZ perturbe l'activité phagocytaire des

hémocytes de la moule *Elliptio complanata*, l'une des fonctions du système immunitaire. De plus, une augmentation de la transcription de l'ARNm des enzymes lysosomales cathepsines (cystéine protéases) a été mesurée chez *M. galloprovincialis* (Brandts et al., 2018) et *V. philippinarum* (Almeida et al., 2018b) exposés respectivement à 6,3 µg/L (96 h) et 1 µg/L (28 jours) de CBZ. Les cathepsines interviennent dans de nombreux processus physiologiques dont le système immunitaire (Turk et al., 2012).

La CBZ présente également un caractère génotoxique. Des dommages significatifs à l'ADN ont été mesurés dans les glandes digestives du bivalve *Corbicula fluminea* après 21 jours d'exposition à des concentrations variant de 0,1 à 50 µg/L (Aguirre-Martínez et al., 2015). De plus, ce caractère génotoxique de la CBZ se confirme après l'observation de dommages à l'ADN mesurés dans l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* exposée 96 h à 6,3 µg/L, accompagnés d'une augmentation de l'expression d'un gène relatif à la réparation des dommages liés à l'ADN (Brandts et al., 2018).

Récemment, plusieurs études ont mis en évidence que la CBZ pourrait agir comme un perturbateur endocrinien chez des crustacés. A des concentrations comprises entre 10 et 200 µg/L, la CBZ impacte la reproduction des daphnies *Daphnia magna* en diminuant le nombre de juvéniles produit par les femelles, en altérant le déterminisme sexuel, et en développant des anomalies chez les embryons exposés *in utero* (Oropesa et al., 2016). De plus, la CBZ est capable d'initier la reproduction asexuée (parthénogénèse) chez *D. magna*. Suite à une exposition chronique à la CBZ (0,03-30 µg/L ; 21 jours), Chen et al. (2019a) ont également montré chez *Daphnia similis*, une diminution significative du nombre de mues, de la taille de la première couvée, du nombre moyen de descendants par couvée, du nombre de couvées par femelle et du nombre total de descendants par femelle avec l'augmentation des concentrations. En plus de ces résultats, la CBZ affecte le développement et la croissance de *D. magna* avec une diminution de la taille (moins 60 % à 1 µg/L) et du taux de croissance (Tian et al., 2019). Chez le crabe *Eriocheir sinensis*, Chen et al. (2019b) reportent que la CBZ inhibe la croissance et le processus de mue en interférant avec l'activité des enzymes chitinolytiques et la voie de signalisation de l'hormone de mue, et ce, à des concentrations de 1 ou 10 µg/L sur une période d'exposition de 4 à 40 jours.

En ce qui concerne le stade larvaire du bivalve *M. galloprovincialis*, des tests d'embryotoxicité de la CBZ (1 µg/L ; 48 h post-fécondation) ont montré des malformations de la coquille (Franzellitti et al., 2019). L'investigation des effets transcriptionnelles de la CBZ sur le stade larvaire a révélé une sous-régulation de deux transcrits impliqués dans la biogénèse de la coquille pouvant expliquer ces malformations. La transcription de gènes impliqués dans l'activité d'enzymes lysosomales, dans les réponses immunitaires et antioxydantes, ainsi que dans les récepteurs sérotonine et estrogène a

également été affectée, à travers des sur- ou sous-régulations selon la concentration (0,01 ou 1 µg/L) et le stade investigué (24 ou 48 h post-fécondation).

Bien que peu d'études comportementales aient été réalisées chez les invertébrés, Nkoom et al. (2019) ont tout de même démontré une altération significative du comportement phototactique de *D. magna* exposée à la CBZ, d'une manière non-monotonique. Les doses 5 et 15 µg/L ont un effet négatif sur le comportement après 7 jours d'exposition, rendant les daphnies plus attirées par la lumière et donc plus sujettes à la prédation pendant la journée. Cependant, de plus fortes doses (50 et 100 µg/L) pourraient réduire la sensibilité des récepteurs du neurotransmetteur, ayant pour conséquence une réduction de cet effet sur le comportement. Chez les crustacés, la réponse comportementale à la lumière est modulée notamment par la sérotonine et la dopamine. L'un des mécanismes d'action de la CBZ connus chez l'être humain est sa capacité à perturber la voie dopaminergique et sérotoninergique. Cela pourrait expliquer les résultats observés par Nkoom et al. (2019) si ce mécanisme d'action s'avère similaire chez les crustacés. Cette étude a par ailleurs révélé un effet négatif sur la capacité de *D. magna* à se nourrir avec l'augmentation de la dose de CBZ, ainsi qu'un effet neurotoxique de la CBZ réduisant l'activité de l'AChE quelle que soit la concentration.

Les facteurs environnementaux pouvant influencer la toxicité d'une molécule (ex. spéciation, biodisponibilité, métabolisation, etc.), quelques études se sont intéressées aux effets combinés de la CBZ avec des modifications du pH (Almeida et al., 2018b; Freitas et al., 2015a, 2016), mais aussi de la température, de la limitation en nourriture, de la quantité de matières organiques, de la densité de population (Heye et al., 2019), ou encore avec la présence d'acide humique et d'espèces azotées (Ding et al., 2019). Freitas et al. (2016) ont montré par exemple qu'une exposition du bivalve *S. plana* à la CBZ combinée avec l'acidification des océans entraîne des effets synergiques, traduit par une mortalité et un stress oxydant plus élevés par rapport aux effets de la CBZ ou de l'acidification étudiés séparément.

Malgré un manque d'études rapportant les effets néfastes de la CBZ sur les invertébrés, l'ensemble de ces résultats révèle une situation préoccupante de la présence de ce PP dans l'environnement et constitue un risque écotoxicologique pour ces organismes. En effet, la *fitness* de ces organismes pouvant être affectée (i.e. développement, reproduction, survie), des conséquences de plus grandes ampleurs pourraient avoir lieu sur les populations, les communautés, voire les écosystèmes. Davantage d'études sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes et modes d'action de la CBZ et faire le lien avec des effets à plus grande échelle (i.e. niveaux d'organisation biologique supérieurs).

2.1.4. Relier les effets à différents niveaux d'organisation biologique pour mieux agir : vers l'« Adverse Outcome Pathway »

Face à la génération d'une vaste quantité de données (éco)toxicologiques, il est devenu indispensable d'organiser ces données d'une manière accessible et profitable aux évaluateurs des risques, afin de prioriser la prise de décision au regard du très grand nombre de produits chimiques présents sur le marché. Pour répondre à ce problème, un cadre conceptuel permettant de maximiser l'utilisation du savoir (éco)toxicologique existant a été proposé sous le concept de l'« Adverse Outcome Pathway » (AOP ; Ankley et al., 2010). Ce dernier se construit de sorte à faire le lien entre des évènements moléculaires initiateurs (ex. une interaction moléculaire entre un xénobiotique et une biomolécule spécifique) et des évènements clés (ex. réponse de la cellule et de l'organe) causant des effets néfastes à des niveaux d'organisation biologique pertinents pour l'évaluation du risque (i.e. individuel, populationnel ou communautaire) (Figure 1.6).

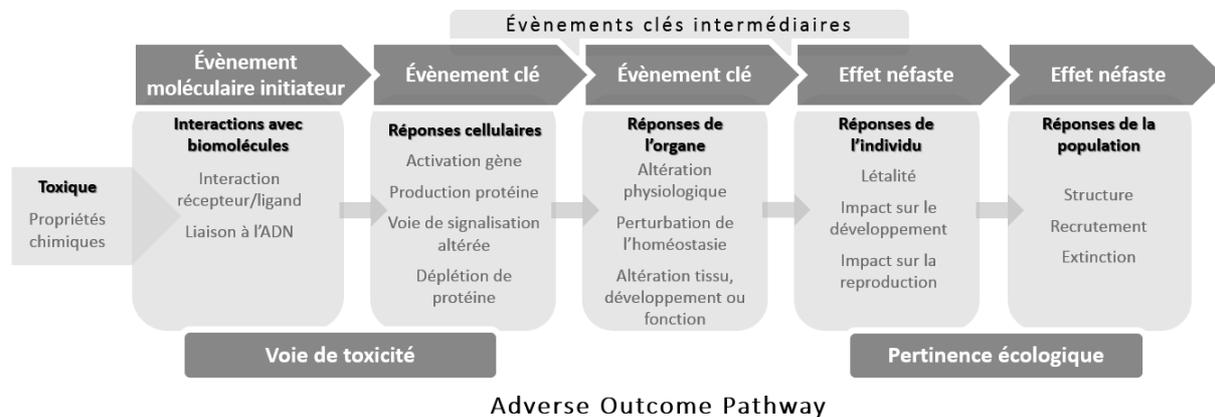
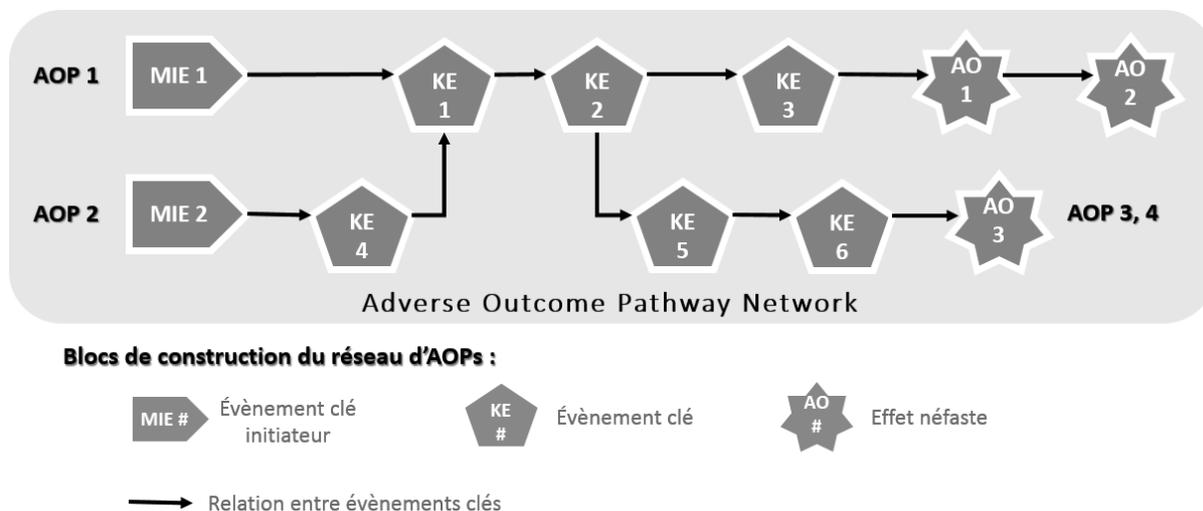


Figure 1.6 : Cadre conceptuel de l'« Adverse Outcome Pathway » (adapté d' Ankley et al., 2010)

A travers ce concept d'AOP, traduisible par le « cheminement vers des effets néfastes », les évènements connectant un niveau d'organisation biologique à un autre sont liés entre eux par des relations causales, mécanistiques, inférentielles ou fondées sur la corrélation. Ces relations se basent sur des informations provenant de systèmes, *in vitro*, *in vivo* ou informatiques. En outre, l'AOP permettrait de joindre des preuves provenant à la fois des tests de toxicité traditionnels et de nouveaux flux de données, y compris des données provenant des approches –omiques (Brockmeier et al., 2017). Les évènements clés intermédiaires peuvent être considérés comme des biomarqueurs permettant de surveiller la progression d'une perturbation biologique et de prédire les effets néfastes à travers l'AOP, correspondants aux critères de l'analyse des risques et de la réglementation des polluants environnementaux. En plus d'une application et d'une intégration plus efficaces d'informations diverses, l'AOP aide à l'identification des incertitudes et des besoins en matière de recherche. A terme, l'objectif ultime du développement de l'AOP est de soutenir l'inférence ou

l'extrapolation d'informations d'un évènement clé à un autre (Villeneuve et al., 2014). Le lien entre ces informations permettrait la création d'un réseau d'AOPs basé sur de multiples AOPs en interaction, partageant des évènements clés communs ou des relations communes entre des évènements clés (Figure 1.7) (Knapen et al., 2018; Villeneuve et al., 2014).



**Figure 1.7 :** Réseau d'AOP composé de quatre AOPs individuels, chacun représentant une séquence unique d'évènements clés (KEs) reliant un évènement moléculaire initiateur (MIE) à un effet néfaste (AO) : AOP 1 [MIE1, KE1, KE2, KE3, AO1, AO2]; AOP 2 [MIE2, KE4, KE1, KE2, KE3, AO1, AO2]; AOP 3 [MIE1, KE1, KE2, KE5, KE6, AO3]; AOP 4 [MIE2, KE4, KE1, KE2, KE5, KE6, AO3] (modifié de Villeneuve et al., 2014).

De cette manière, les réseaux d'AOPs intégreront davantage la complexité des systèmes biologiques et les conséquences de l'exposition aux facteurs stress auxquels ils sont confrontés. En effet, un produit chimique pourrait induire des effets toxiques par plus d'un mécanisme (i.e. évènement moléculaire initiateur), *via* l'interaction de ce produit avec de multiples cibles biologiques ou *via* l'interaction avec une seule cible présente dans plusieurs compartiments (ex. types de cellule, tissus, organes, etc.) au sein d'un organisme complexe. De plus, les scénarios rencontrés dans l'environnement font intervenir de multiples contaminants capables de générer de multiples évènements moléculaires initiateurs, et donc susceptibles d'interagir entre eux. Par conséquent, le concept de l'AOP, incluant les réseaux d'AOPs, améliorera l'extrapolation des informations entre différents produits chimiques, initiateurs d'évènement moléculaire commun ou partageant des évènements clés communs, et supportera également la prédiction des effets de mixture (i.e. mélange de plusieurs molécules chimiques).

## 2.2. Mélanges générés en laboratoire

Évaluer les effets des PP individuellement est indispensable pour comprendre leurs mécanismes et modes d'action sur les organismes non-cibles. En revanche, cette approche pourrait sous-estimer l'impact environnemental des PP présents en réalité sous forme de mélanges. Deux caractéristiques, en particulier, font de l'effet toxique conjoint d'un mélange de PP une problématique majeure dans le cadre de l'évaluation du danger et du risque : (i) l'écotoxicité d'un mélange de PP peut être plus grande que les effets de chaque composé individuel, et, par conséquent, (ii) un tel mélange peut avoir une écotoxicité considérable, même si tous les PP individuellement sont présents seulement à de faibles concentrations qui ne provoquent pas d'effet toxique significatif (NOEC) quand ils agissent seuls sur les organismes exposés (Backhaus, 2014). Le paradigme général pour l'évaluation des effets de mélanges provient initialement de la recherche pharmacologique, mais a trouvé de nombreuses applications en écotoxicologie (Eggen et al., 2004). Ce paradigme est présenté en Figure 1.8. Si les substances chimiques d'un mélange ont des sites moléculaires cibles différents, n'interagissent pas et ont des mécanismes d'action différents, alors elles agissent indépendamment. Si les substances chimiques n'interagissent pas, mais agissent sur le même site cible et ont des mécanismes similaires, alors les effets sont généralement concentration-additifs. Si les substances chimiques interagissent au cours de leur cheminement vers leur site cible, alors leur effet de mélange peut être difficilement prédit. Cette dernière situation nécessite des investigations au cas par cas pour identifier de possibles effets antagonistes ou synergiques. L'applicabilité de ces concepts en écotoxicologie a été démontrée de façon convaincante à travers les modèles de prédiction, nommés Concentration-Addition et Action Indépendante, et montre que l'attribution correcte des mécanismes d'action est une condition préalable à l'évaluation des effets de mélanges (Altenburger et al., 2000; Backhaus et al., 2000).

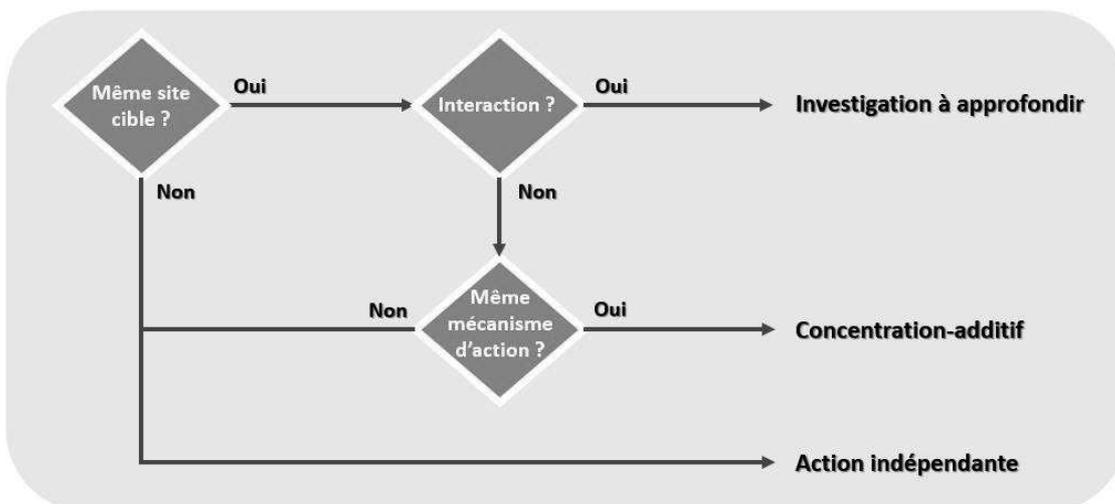
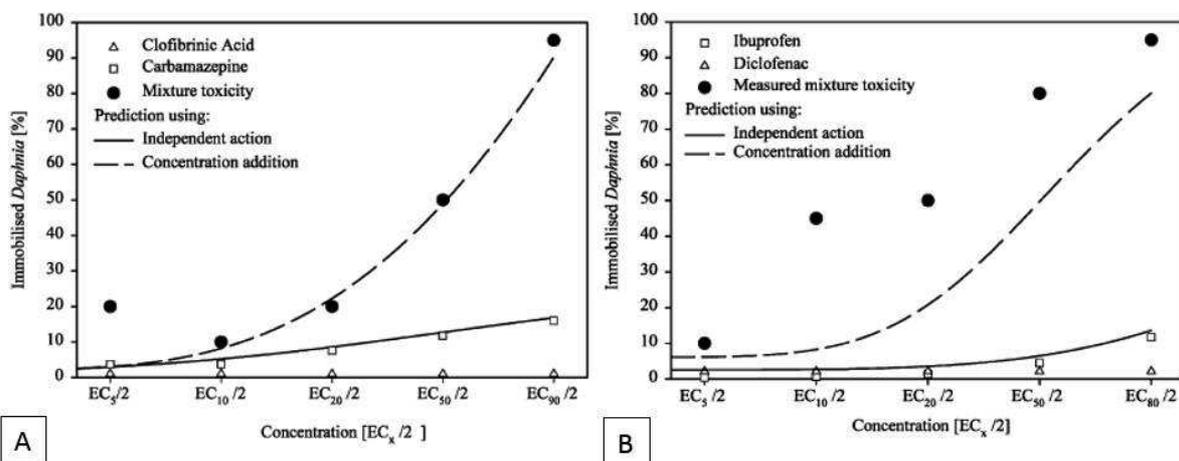


Figure 1.8 : Paradigme général pour l'évaluation des effets de mélanges (adaptée d'Eggen et al., 2004).

D'après la revue de littérature de Godoy and Kummrow (2017) portant sur 65 articles publiés entre 2000 et 2017, la toxicité de 194 mixtures de PP a été évaluée, incluant des produits de soin. La majorité de ces mixtures (74 %) générées en laboratoire est binaire (composées de deux molécules) tandis que les mixtures impliquant 10 composés ou plus ne représentent qu'environ 5 %. L'étude des mixtures binaires offre l'avantage de pouvoir élucider les interactions entre deux molécules, c'est-à-dire l'effet d'une molécule spécifique sur l'action biologique d'une autre, alors qu'il est plus difficile de tirer des conclusions des mixtures à plus de composés (Cedergreen et al., 2007). Parmi les 65 articles passés en revue, 29 % ont été dirigés sur les producteurs primaires (ex. algues vertes), 28 % sur les invertébrés, 26 % sur les bactéries et champignons et 12 % sur les poissons. En ce qui concerne les invertébrés, Flaherty & Dodson (2005) ont démontré qu'une exposition de *D. magna* pendant 6 jours à une mixture de 36 µg/L de fluoxétine (psychotrope) et 100 µg/L d'acide clofibrrique (hypolipémiant), concentrations auxquelles aucun effet apparent n'a été observé quand testées individuellement, a causé une mortalité significative de 63 % de la population testée. Dans cette même étude, une autre mixture de trois antibiotiques (érythromycine, triclosan et triméthoprime) à 10 µg/L chacun, a induit après 6 jours d'exposition une diminution du sexe ratio avec 20 % de mâles en moins à la naissance. A cette même concentration, ces trois antibiotiques ne présentaient aucun effet quand testés individuellement. Des combinaisons binaires d'acide clofibrrique et de CBZ ainsi que de diclofénac et d'ibuprofène (deux anti-inflammatoire non stéroïdiens) montrent des effets de mixture négatifs sur l'immobilisation de *D. magna*, bien que chaque PP individuel ait été présent à une concentration inférieure à sa NOEC (Cleuvers, 2003). La combinaison des effets des molécules acide clofibrrique et CBZ a suivi le concept de Concentration-Addition (Figure 1.9A), tandis que pour la mixture diclofénac et ibuprofène les effets joints ont été supérieurs à ceux prédits par le modèle Concentration-Addition (Figure 1.9B). Cette déviation au modèle suggère un effet synergique potentiel de ces deux PP.



**Figure 1.9 :** Evaluation de la toxicité aiguë de la mixture acide clofibrrique + carbamazépine (A) et de la mixture ibuprofène + diclofénac (B) sur l'immobilisation de *Daphnia magna* prédite par les modèles de Concentration-Addition et d'Action Indépendante, en comparaison avec les toxicités individuelles de chaque composé (Cleuvers, 2003).

En se basant sur les mécanismes d'action connus de la fluoxétine et du propranolol chez les mammifères, Franzellitti et al. (2013) ont étudié les effets interactifs de ces deux molécules chez la moule marine *M. galloprovincialis*. D'un côté, la fluoxétine a pour mécanisme d'augmenter les niveaux de sérotonine (5-HT) dans la fente synaptique en inhibant la recapture de celle-ci. Les fonctions physiologiques de la 5-HT sont médiées par de multiples récepteurs membranaires couplés soit à la stimulation de la phospholipase C, soit à l'induction/inhibition de l'adénylyl cyclase chez les mammifères. De l'autre côté, le propranolol est un antagoniste efficace des récepteurs de type 5-HT<sub>1</sub>, couplés à l'inhibition de l'adénylyl cyclase, l'enzyme formant l'AMPc. De cette manière, ces deux PP peuvent affecter la même cible moléculaire, indirectement (fluoxétine) en augmentant la disponibilité de la molécule agoniste (5-HT) ou directement (propranolol) en se liant au récepteur (5-HT<sub>1</sub>) et en empêchant son occupation par l'agoniste, affectant ainsi différemment la signalisation cellulaire médiée par l'AMPc. Lors de l'exposition de *M. galloprovincialis* à la fluoxétine (0,3 ng/L) et au propranolol (0,3 ng/L) seul ou en mixture pendant 7 jours, les auteurs ont observé des effets antagonistes des deux molécules en cohérence avec leur mécanisme d'action connu chez les mammifères. Seule, la fluoxétine a induit la surexpression d'un produit du gène 5-HT<sub>1</sub> tandis qu'en mixture cette augmentation est contrecarrée par l'effet antagoniste du propranolol.

L'ensemble de ces études met en lumière l'importance de considérer les effets des mixtures de PP, notamment lors de l'évaluation des risques. Malgré la présence des PP à faibles doses dans l'environnement, les effets de mixture peuvent être significatifs quand les effets des PP testés individuellement ne le sont pas systématiquement. Les effets de mixture peuvent être additifs quand les PP agissent de manière indépendante, ou bien synergique ou antagoniste quand ils interfèrent entre eux. Néanmoins, les PP ne sont pas les seules classes de contaminants présentes dans l'environnement. Davantage d'interactions sont donc envisageables avec d'autres contaminants comme cela a été montré par exemple entre des PP et des métaux (Almeida et al., 2018a), des nanoplastiques (Brandts et al., 2018), des pesticides (Juhel et al., 2017), ou encore le tensioactif acide perfluorooctanesulfonique (Wagner et al., 2018).

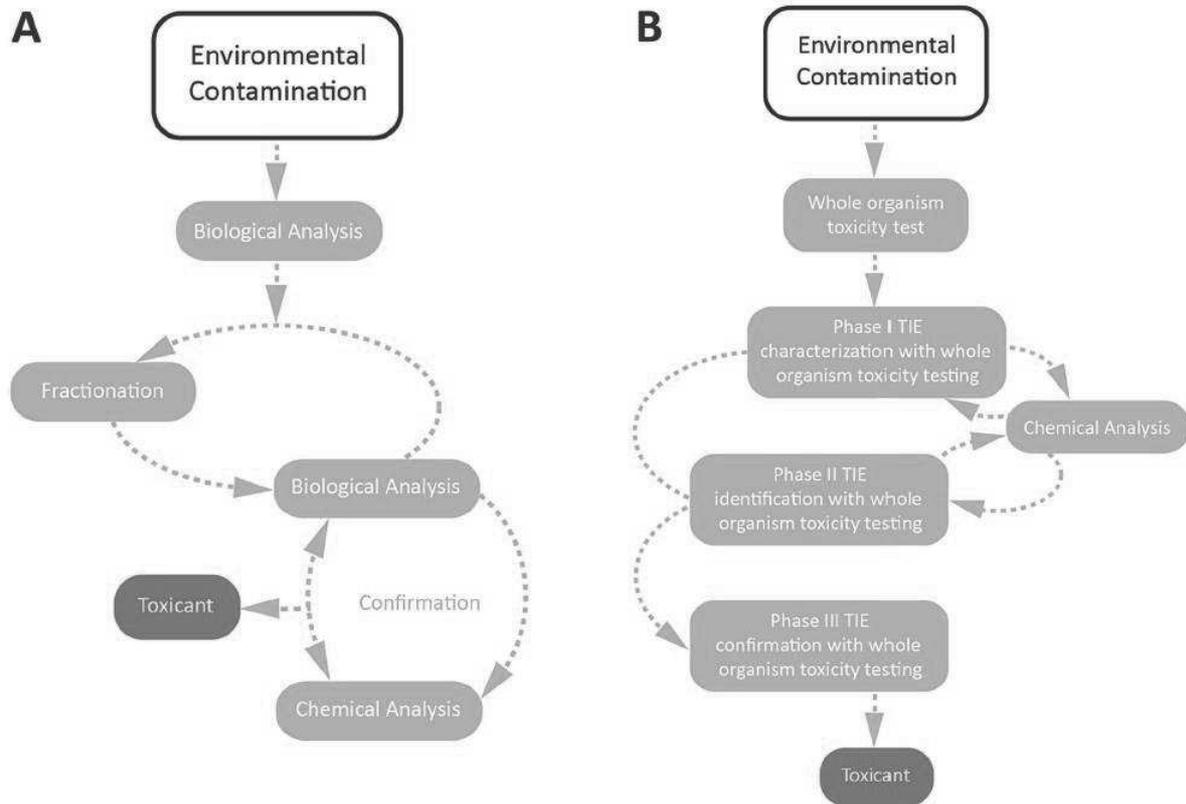
## 2.3. Mélange complexe : contamination représentative du milieu

### 2.3.1. Mise en évidence des liens de causalité dans le cas d'échantillons environnementaux complexes

Les différents compartiments de l'environnement peuvent être contaminés par des centaines, voire des milliers de molécules anthropogéniques capables, dans leur ensemble, de causer des effets toxiques. Etudier les effets d'échantillons prélevés directement dans l'environnement, comme des effluents de STEP municipales ou industrielles, des eaux ou des sédiments contaminés, permet de se rapprocher d'une contamination représentative du milieu et ainsi d'augmenter la pertinence environnementale des tests écotoxicologiques. Cependant, le défi majeur de ce niveau de complexité est de pouvoir identifier le lien de causalité entre les effets observés sur le système biologique étudié et les contaminants présents dans l'échantillon. Au vu d'une caractérisation exhaustive impossible des contaminants présents dans l'échantillon (i.e. limites analytiques), et d'efforts considérables pour balayer l'ensemble des effets toxiques de ce dernier, il est indispensable de procéder méthodiquement. Actuellement, deux approches ont fait leur preuve : l'évaluation et l'identification de la toxicité (TIE ; *Toxicity Identification Evaluation*) et, l'analyse orientée vers les effets (EDA ; *Effect-Directed Analysis*) (Brack et al., 2016; Burgess et al., 2013). L'EDA et le TIE ont le même objectif, identifier les contaminants causant les effets toxiques observés, mais utilisent des hypothèses de départ, des stratégies, des méthodologies et des points finaux d'évaluation (*endpoints*) différents (Figure 1.10). Ces deux approches commencent par la collecte d'un échantillon environnemental contaminé. Dans l'EDA, l'échantillon est très souvent extrait avec des solvants organiques pour isoler les composés toxiques suspectés, tandis que dans le TIE l'intégrité de l'échantillon est conservée (conservation de la biodisponibilité). Ces deux approches testent une première fois la toxicité de l'échantillon en mesurant la réponse (sub)cellulaire (ex. cytotoxicité, génotoxicité, perturbation endocrinienne, etc.) dans le cas de l'EDA, et la réponse de l'organisme entier pour le TIE (ex. mortalité, reproduction, croissance). Après cette étape, les deux approches divergent.

Dans l'EDA, si des effets toxiques significatifs sont détectés, la complexité du mélange de contaminants est séquentiellement réduite par fractionnement *via* une colonne chromatographique, selon les caractéristiques physico-chimiques des contaminants (ex. hydrophobicité, polarité). Par la suite, des tests biologiques supplémentaires sont effectués pour tester la toxicité des différentes sous-fractions. Les sous-fractions présentant une faible ou aucune toxicité sont éliminées, tandis que celles plus toxiques peuvent à leur tour être fractionnées puis testées biologiquement, et ainsi de suite jusqu'à n'isoler que la ou les fractions représentatives de la toxicité. Ces dernières fractions sont ensuite chimiquement caractérisées afin d'identifier les contaminants responsables des effets observés, et ce, à travers des techniques analytiques de pointes (ex. couplage spectrométrie de masse

– chromatographie liquide ou gazeuse ; cf. Section 3.2.2.4) et des méthodes d'élucidation structurale avancées (cf. Section 3.2.2.7). L'approche EDA se complète par une étape de confirmation afin de fournir de solides preuves que les composés identifiés expliquent en réalité une part significative des effets observés et qu'ils soient pertinents vis-à-vis de l'échantillon environnemental. Cela implique une confirmation analytique et une confirmation de la toxicité avec les tests biologiques appropriés.



**Figure 1.10 :** Illustration des deux approches (A) Effect-Directed Analysis (EDA ; Analyse Orientée vers les Effets) et (B) Toxicity Identification Evaluation (TIE ; Évaluation et Identification de la Toxicité), pour l'étude du lien de causalité entre des échantillons environnementaux complexes (i.e. mélange de contaminants) et des effets observés sur un système biologique (Burgess et al., 2013).

En revanche, dans le TIE, après avoir démontré une toxicité significative lors du test initial, s'ensuit la phase I dont le but est de caractériser quelles sont les classes de contaminants responsables de cette toxicité (ex. substances organiques non ioniques, métaux, ammoniac) à travers différentes expérimentations (ex. tests de toxicité pH-dépendant, après filtration, après aération, analyses chimiques, etc.). En se basant sur les résultats de la phase I, la phase II est conçue pour identifier les contaminants spécifiques de la toxicité observée. Pour certaines classes de contaminants comme celle des métaux par exemple, la sélection des toxiques possibles lors de la phase II est limitée (ex. cadmium, cuivre, nickel, plomb, et zinc), et quand la phase I est combinée avec des analyses chimiques, une forte relation entre la présence de métaux et les effets observés est souvent démontrée. A l'inverse, lorsque la phase I indique que la classe de contaminants la plus toxique pour un échantillon donné est celle

des substances organiques non ioniques ou ioniques, l'existence de milliers de substances possibles nécessite davantage de développements méthodologiques lors de la phase II afin d'établir un lien de causalité plus précis. Enfin, le TIE se termine par une dernière étape, la phase III, dans laquelle les découvertes des phases I et II sont confirmées par des expérimentations indépendantes. Par exemple, un échantillon environnemental de même type mais non contaminé peut être dopé avec la même concentration que le ou les toxiques identifiés comme responsables des effets observés. Si l'échantillon dopé démontre une toxicité de magnitude similaire à l'échantillon réel, cela représenterait une preuve indépendante supportant les découvertes des phases I et II.

Ainsi, les deux approches EDA et TIE sont très complémentaires dans la mise en évidence des liens de cause à effet pour des échantillons environnementaux complexes, dont les principales spécificités sont résumées en Tableau 1.3.

**Tableau 1.3 :** Spécificité des deux approches Effect-Directed Analysis (EDA ; Analyse Orientée vers les Effets) et Toxicity Identification Evaluation (TIE ; Évaluation et Identification de la Toxicité) (Burgess et al., 2013).

Parameter	EDA	TIE
Typical toxicological endpoints	In vitro: endocrine disruption, mutagenicity, genotoxicity	Whole organism: survival, growth, reproduction
Target toxicant classes	Emphasis on organic contaminants	All potentially toxic chemicals
Importance of bioavailability	No specific consideration of bioavailability	Major consideration
Form of sample	Organic solvent extracts of water, sediment, interstitial water, technical mixtures, consumer products, biota	Whole samples (e.g., water, sediment, interstitial water)
Importance of chemical analysis	Critical, typically nontarget analysis and structure elucidation	Supportive to critical, typically target analysis of expected toxicants based on type of sample
Degree of toxicant identification	Very high specificity	High for classes of toxicants; moderate for specific toxicants
Role of ecological relevance	Secondary goal	Primary goal

### 2.3.2. Effets des rejets de station d'épuration sur les invertébrés marins

Les STEP ont été démontrées comme la voie d'entrée principale de nombreux contaminants, tels que les PP, dans les milieux aquatiques y compris les écosystèmes marins. Les effluents de STEP constituent ainsi des mélanges complexes représentatifs de la contamination susceptible d'être rencontrée dans le milieu récepteur (ex. colonne d'eau, sédiment). La pertinence environnementale de ces échantillons en font un objet d'étude intéressant afin de déterminer les effets d'une telle exposition sur les organismes aquatiques, et notamment pour les espèces sessiles qui enregistrent les effets de la contamination à un site donné (ex. à l'embouchure d'un exutoire de STEP). Pour étudier les effets de rejets de STEP, deux cas d'exposition sont rencontrés dans la littérature : (i) les expositions *in situ*, où des organismes sont prélevés soit directement soit après encagement sur le site contaminé et, (ii) les expositions en conditions contrôlées de laboratoire. De telles études ont principalement été menées sur des organismes d'eaux douces, au détriment des organismes marins dont les

connaissances sont peu renseignées. Chez les organismes d'eaux douces, les rejets de STEP entraînent des perturbations endocriniennes, impactent le système reproductif et le système immunitaire, réduisent la croissance et la survie des organismes, induisent un stress oxydant ainsi que des effets neurotoxiques (Bouchard et al., 2009; Gagné et al., 2007, 2004; Gillis et al., 2014; Nobles and Zhang, 2015). Ces effets mesurés à l'échelle (sub)cellulaire ou individuelle peuvent avoir de graves conséquences sur les populations et les communautés, comme cela a été observé dans une rivière par l'absence de moules vivantes, sur 7 km en aval d'un effluent de STEP municipale (Gillis et al., 2017). La dangerosité de ces rejets étant démontrée sur les organismes d'eaux douces, de tels risques sont susceptibles de menacer les organismes marins.

En conditions contrôlées de laboratoire, peu d'études ont été menées chez des invertébrés marins. Certaines d'entre elles ont mesuré des effets non significatifs d'effluents de STEP, comme par exemple une absence d'augmentation de la sévérité de l'imposex (i.e. bioindicateur d'une perturbation endocrinienne) chez le gastéropode *Nucella lapillus* exposé 3 mois à deux concentrations différentes d'un effluent de STEP (12,5 % et 50 %), malgré la détection des perturbateurs endocriniens bisphénol A, octylphénol, nonylphénol et 17- $\beta$ -estradiol (Santos et al., 2008). Toutefois, un effet perturbateur endocrinien a été mesuré chez *N. lapillus* après exposition à deux concentrations environnementales pertinentes (0,25 et 1 %) d'un effluent de STEP, où la présence des contaminants précédemment cités a été confirmée (Castro et al., 2007). Les résultats ont montré une augmentation dose-dépendante du pourcentage de femelles matures par rapport au groupe contrôle (+21 % à 0,25 % et +36 % à 1 %), ainsi qu'une induction des niveaux d'expression des récepteurs estrogènes. Par ailleurs, chez la moule *M. galloprovincialis*, l'étude de la stabilité membranaire lysosomale des hémocytes ainsi que de la peroxydation lipidique de ces cellules n'a révélé aucune altération après exposition à un effluent de STEP à des concentrations environnementales pertinentes (2,5 à 10 %), tandis que cette stabilité membranaire devient significativement impactée à des concentrations plus élevées, comprises entre 10 et 60 % (Harbi et al., 2017). Des données existent également sur les effets d'un effluent de STEP d'une industrie pharmaceutique (antibiotique) se déversant dans le milieu marin (Zouiten et al., 2016). La moule *M. galloprovincialis*, prise comme organisme d'étude, présente des dommages histologiques avec l'apparition de difformité au niveau des branchies, accompagnée d'une dégénérescence des cellules épithéliales après 24 h d'exposition au rejet industriel à des concentrations comprises entre 30 et 70 %. Dans cette même étude, le test des comètes a également révélé des dommages à l'ADN significatifs d'une manière dose-dépendante. Après avoir traité ce rejet industriel avec la bactérie *Bacillus atrophaeus*, les auteurs ont mesuré une dégradation des antibiotiques suivie de la disparition des effets histologiques et génotoxiques. Ces auteurs ont ainsi pu établir un lien de causalité entre ces effets et la présence d'antibiotiques. Partout dans le monde, les

eaux usées ne sont pas systématiquement traitées en STEP avant d'être rejetées dans le milieu. Moles & Hale (2003) ont ainsi étudié les effets d'un rejet non traité et d'un rejet traité, échantillonnés sur deux sites différents en Alaska. L'étude a révélé une baisse significative de la tolérance des moules *Mytilus trossulus* à une exposition aérienne après exposition aux deux rejets, tandis que chez les moules exposées au rejet non traité, une diminution de la production de byssus a en plus été observée, filament indispensable pour se fixer à un substrat et pour leur survie. Toujours en conditions contrôlées de laboratoire, une autre étude s'est plutôt intéressée aux effets de sédiments contaminés à proximité d'un rejet de STEP, sur la palourde marine *Ruditapes philippinarum* (Maranho et al., 2015). Après 14 jours d'exposition, la mesure de paramètres biochimiques indique un impact sur la reproduction de ces organismes suite à l'altération du processus énergétique, inflammatoire et neuroendocrinien, ainsi que par l'induction en continu de la gamétogénèse et un retard du relargage des gamètes. L'altération de certains de ces paramètres biochimiques a pu être statistiquement corrélée avec la présence de métaux, de PP ainsi qu'un surfactant.

D'autres études ont procédé à l'encagement de bivalves sur des sites contaminés afin d'investiguer les effets des rejets d'eaux usées traitées ou non avant relargage dans le milieu marin. Dans ces conditions réelles, la variation spatio-temporelle de la contamination ainsi que la présence de nombreux facteurs environnementaux rendent l'étude de la relation de cause à effet plus difficile. Pour faire face à ces difficultés, la mesure de biomarqueurs d'exposition au sein d'un organisme permet d'alerter sur la biodisponibilité de certaines classes de contaminants qui interagiraient avec l'organisme et donc susceptible d'expliquer les effets observés sur celui-ci. Appliquant cette stratégie, de los Ríos et al. (2013) ont mesuré des biomarqueurs d'exposition et d'effets chez la moule *M. galloprovincialis* encagée sur différents sites contaminés soit par des effluents de STEP soit par des rejets non traités dans la péninsule Ibérique. Les biomarqueurs d'exposition sélectionnés sont spécifiques (i) d'une contamination métallique telle que par la détection autométallographique de métaux accumulés dans les lysosomes et par la mesure des niveaux de transcription du gène métallothionéine 20 (*MT20*), (ii) d'une contamination de xénobiotiques organiques à travers la mesure de l'activité de l'enzyme acyl-Co A comme indicateur de la prolifération des peroxisomes, et (iii) d'une contamination en perturbateurs endocriniens qui se traduit par l'induction de la transcription du gène relatif à la vitellogénine. La réponse positive de chacun de ces biomarqueurs a révélé la présence de métaux, de contaminants organiques et de perturbateurs endocriniens dans les deux types de sites contaminés par des rejets traités ou non. Les biomarqueurs d'effets ont quant à eux révélé un stress général chez ces organismes, notamment par l'altération de la stabilité membranaire des lysosomes, bien que cela ne soit imputable à une classe de contaminants en particulier. D'autres stratégies, pour la mise en relation de cause à effet, privilégient l'installation d'échantillonneurs passifs (ex. POCIS) sur

le même site que les organismes encagés, afin d'enregistrer la contamination locale sur toute la durée d'exposition, ou encore l'analyse directe de contaminants présents dans les tissus de ces organismes. Dans le golfe de Finlande, Turja et al. (2015) ont étudié les effets d'un rejet de STEP à travers la mesure d'une batterie de biomarqueurs après transplantation des moules *M. trossulus* pendant 31 jours à 800, 1000 et 4000 m de l'émissaire en mer. L'étude des effets est en plus complétée par la caractérisation de l'exposition à chaque site, grâce à l'échantillonnage passif des PP par les POCIS ainsi que la quantification d'ETM, d'HAP, de PCB et de pesticides organochlorés bioaccumulés dans les tissus de moules. Turja et al. (2015) ont ainsi observé un stress oxydant (induction des enzymes CAT, SOD, GSH et GR) chez les organismes transplantés à 800 et 1000 m, accompagné de dommages à l'ADN et d'une altération de la stabilité membranaire lysosomale plus marquée à 1000 m. Ces deux sites sont associés aux plus fortes concentrations en PCB et HAP détectées dans les tissus ainsi qu'aux concentrations en PP les plus élevées enregistrées par les POCIS, susceptibles d'avoir causés ces effets. A plus long terme, la capacité des moules à survivre face à cette exposition est mise en doute selon cette étude.

Les données disponibles pour comprendre l'impact de la contamination *via* les rejets de STEP sur les organismes marins, et plus particulièrement les invertébrés, restent encore insuffisantes malgré leurs risques écotoxicologiques démontrés à travers ces différentes études. Cela peut s'expliquer par la difficulté à mettre en évidence les liens de causalité entre les contaminants présents dans le milieu et les effets générés sur les organismes vivants dans ce milieu. De plus, un compromis dans le choix des biomarqueurs et *endpoints* (i.e. points finaux d'évaluation) à étudier est inévitable (moyens limités), empêchant une vision intégrative de l'ensemble des effets générés à chaque exposition.

#### 2.4. Conclusion & perspectives de recherche

La réflexion sur ces trois niveaux de complexité, en termes d'exposition (molécule seule, mixture générée en laboratoire et mélange environnemental complexe), met en lumière l'intérêt de ces différents niveaux pour, à partir d'une compréhension plus mécanistique (ex. molécule seule, mixture binaire), se diriger vers une complexité représentative des conditions d'exposition environnementales. En ce sens, comprendre les différents mécanismes et modes d'action d'un contaminant est une étape cruciale avant d'étudier (ou de prédire) son activité biologique en présence d'autres contaminants et/ou sous l'action de différents facteurs environnementaux. De nombreux contaminants, tels que la CBZ, ont été démontrés comme préoccupant pour l'environnement, sans que leurs mécanismes d'action et leurs gammes d'effets soient encore bien connus sur de nombreux groupes taxonomiques et notamment ceux présents dans les écosystèmes marins. Un besoin se fait donc ressentir sur l'application d'approches capables d'investiguer sans *a priori* les différents mécanismes et modes

d'action de ces contaminants en vue d'émettre des hypothèses d'effets potentiels à l'échelle de l'individu, qui pourront par la suite être confirmées. Ces types d'approches plus intégratives, considérées comme des techniques « haut-débit », font référence aux approches -omiques.

### 3. Des approches innovantes pour l'étude de la relation de cause à effet

#### 3.1. L'entrée des -omiques en écotoxicologie

A ses débuts, l'écotoxicologie a emprunté de nombreux concepts et méthodes à la toxicologie. Les travaux réalisés au cours des années 70 étaient à l'origine principalement orientés vers la compréhension et la prédiction du comportement des composés chimiques dans leur environnement et leur capacité à interagir avec les membranes biologiques. Au cours des années 80s, de nombreux chercheurs ont tenté d'évaluer les effets toxiques des contaminants sur les organismes vivants. En se basant sur les préceptes de la toxicologie, ils ont mis au point des tests de toxicité aiguë basés sur la relation de dose à effet. Dans les années 90s, de nombreux écotoxicologues ont dénoncé le manque de représentativité et de pertinence écologique de ces approches. De cette critique, sont nés de nouveaux outils appelés bioindicateurs et biomarqueurs (Clements and Rohr, 2009; Moore et al., 2004). Il est maintenant bien établi que la caractérisation chimique d'une exposition à des contaminants n'est pas suffisante et que des approches couplant la chimie et la biologie doivent être développées pour permettre de relier la présence de contaminants à des effets toxiques présumés (van der Oost et al., 2003). Dans ce but, l'utilisation d'indicateurs d'alerte précoce, représentatifs des effets biologiques des contaminants sur les organismes appelés biomarqueurs, s'est considérablement développée au cours des dernières décennies. En effet, des modifications à des niveaux hiérarchiques plus élevés sont toujours précédées par des changements précoces, et ce au niveau du génome (van der Oost et al., 2003). Parallèlement à l'amélioration des méthodes de biologie moléculaire, la révolution technologique et bioinformatique a boosté le développement des approches -omiques, en plein essor dans tous les domaines de la biologie depuis le début des années 90s. L'application de ces approches en écotoxicologie ouvre de nouvelles perspectives pour l'analyse des impacts des contaminants en termes de mécanismes moléculaires déclenchés par les substances toxiques. Dans ce contexte, le terme « écotoxicogénomique » a été proposé pour décrire les études analysant la réponse d'un système biologique à une exposition toxique aux niveaux transcriptomique, protéomique et métabolomique. L'écotoxicogénomique vise à discerner les liens de cause à effet entre l'exposition d'un organisme à un contaminant et l'altération de l'expression de ses biomolécules. Un autre objectif est d'identifier des biomarqueurs d'exposition, ou d'effets, à des contaminants. Enfin, elle vise également à décrypter les mécanismes moléculaires déclenchés par l'exposition à un ou plusieurs

contaminants, à la source de perturbations physiologiques observées à l'aide de méthodes travaillant à l'échelle de l'individu. La superposition de l'ensemble de ces niveaux offre ainsi une compréhension intégrative des processus mécanistiques lors de l'interaction entre contaminant et vivant.

La transcriptomique vise à décrire l'ensemble des ARN messagers d'une cellule, d'un organe ou d'un organisme entier, produits lors du processus de transcription d'un génome (i.e. le transcriptome), dans des conditions données. La technique de séquençage de l'ARN (*RNA-Seq*) et celle des puces à ADN (*microarray*) fournissent toutes deux des valeurs d'expression relative de milliers de gènes par échantillon qui peuvent être analysés à l'aide de modèles linéaires généralisés afin d'identifier les gènes exprimés de manière différentielle dans différentes conditions d'exposition. Tandis que les plateformes *microarray* sont limitées aux organismes modèles (ex. *Daphnia magna*, *Danio rerio*) (Giraud et al., 2015), la technique *RNA-Seq* donne accès en revanche aux données transcriptomiques de tous les organismes d'intérêt écologique (Trapp et al., 2016). A un niveau biologique supérieur, la protéomique étudie le profil global de l'expression des protéines dans une cellule, un organe, un biofluide (ex. urine, plasma), ou l'organisme entier, dans des conditions données. Les avancées en spectrométrie de masse ont augmenté la sensibilité de détection des peptides dans de nombreuses matrices biologiques (Nesatyy and Suter, 2008). Le couplage des techniques *RNA-Seq* et *Shotgun proteomics* a rendu possible l'étude du protéome même chez les organismes dont les génomes ne sont pas annotés, ouvrant la voie à des études mécanistiques écotoxicoprotéomiques en laboratoire et dans l'environnement (Gouveia et al., 2017; Trapp et al., 2014). De plus, la protéomique permet l'étude des modifications post-transcriptionnelles, telles que la phosphorylation, augmentant potentiellement la compréhension de l'activation ou de l'inhibition des protéines induite par des contaminants (Caruso et al. 2014, Lee 2013). Néanmoins, les niveaux de transcription d'un gène ne sont pas toujours corrélés à l'expression des protéines, et les protéines traduites ne sont pas toujours actives sur le plan enzymatique. La métabolomique, en revanche, vise à étudier les produits finaux de ces processus de régulation, les métabolites, et est donc plus étroitement liée à la condition biologique de l'organisme (Miracle and Ankley, 2005). En ce sens, la métabolomique se positionne comme une approche pertinente pour évaluer l'impact des contaminants tels que les PP sur les organismes. Cette approche gagne toutefois à être complétée par la transcriptomique et/ou la protéomique pour une meilleure interprétation mécanistique de l'action des contaminants sur l'organisme.

### 3.2. La métabolomique au service de l'environnement

La métabolomique environnementale est un domaine en plein essor qui vise à établir un lien entre les modifications du métabolome d'un organisme et des stress environnementaux d'ordre

biotiques (ex. prédation, parasitisme, compétition, etc...) ou abiotiques (ex. température, salinité, xénobiotiques, etc...) (Bundy et al., 2009; Lankadurai et al., 2013; Lin et al., 2006; Viant, 2008). Parmi de nombreux domaines en sciences environnementales, celui de l'écotoxicologie bénéficie grandement des avantages qu'apporte cette approche.

### 3.2.1. Définition, principe & objectifs

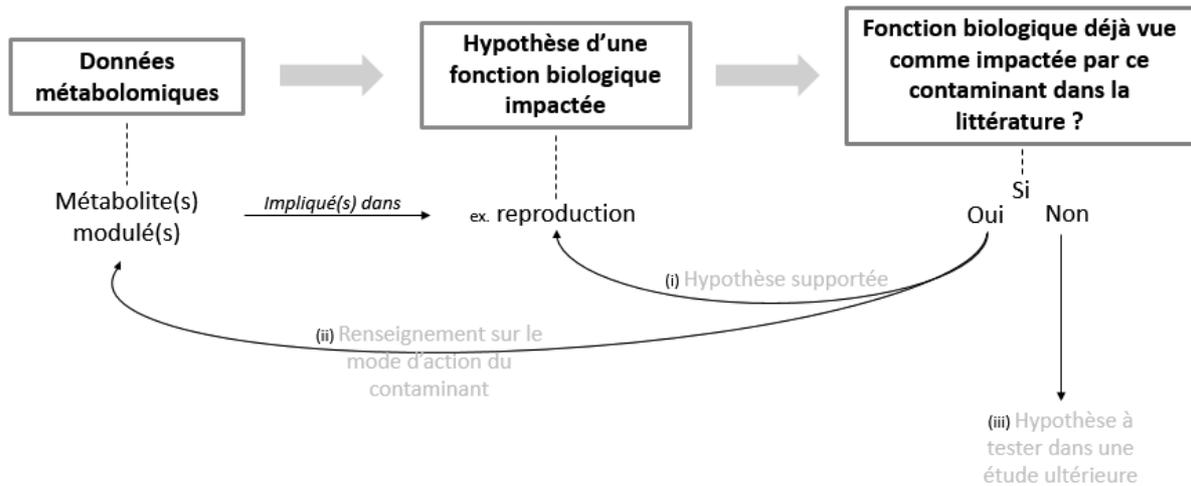
La métabolomique se définit comme l'étude de l'ensemble des métabolites (i.e. le métabolome) présents au sein d'une cellule, d'un tissu, d'un organe, d'un biofluide ou de l'organisme entier, dans des conditions données et s'ils sont accessibles à l'analyse. Le métabolome est constitué de métabolites de faible poids moléculaire, inférieur à 1500 Dalton (Da), et se réfère essentiellement (i) aux métabolites endogènes, produits naturels du métabolisme, appelés « endo-métabolome », (ii) ainsi qu'aux xénobiotiques, substances chimiques exogènes retrouvées et parfois biotransformées dans l'organisme, appelées « xéno-métabolome » (ou exposome). L'endo-métabolome est constitué de métabolites appartenant à deux grandes classes : les métabolites issus du métabolisme primaire, bien connus car essentiels au développement de l'organisme et communs à différentes espèces, et les métabolites issus du métabolisme secondaire, plus complexes et spécifiques aux espèces étudiées et à certaines fonctions secondaires. L'ensemble de ces métabolites peut être classé en différentes familles selon leur structure moléculaire, entre autre les acides aminés, les glucides et les lipides. Cette grande diversité de métabolites présente ainsi des propriétés physico-chimiques extrêmement variées en termes de volatilité, solubilité, polarité et poids moléculaire (Courant et al., 2014). Pour une même matrice, ces différents métabolites couvrent une gamme de concentration très étendue, variant de la picomole à la milimole (Dunn and Ellis, 2005). La complexité du métabolome se démontre donc par cette grande hétérogénéité de métabolites, présentant des propriétés physico-chimiques, un poids moléculaire et une concentration extrêmement diversifiés. Par ailleurs, la taille du métabolome est très variable d'un organisme à un autre : le métabolome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est estimé à 600 métabolites (Förster et al., 2003) contre environ 200 000 métabolites, primaires et secondaires, référencés dans le règne végétale (Fiehn, 2002). Quant à l'être humain, son métabolome comprendrait jusqu'à 40 000 métabolites (Wishart et al., 2013). Bien que le métabolome présente des métabolites communs entre espèces, un grand nombre reste spécifique à un taxon. De plus, pour des métabolites communs, leur(s) voie(s) de métabolisation ainsi que leur(s) rôle(s) biochimique(s) peuvent différer d'une espèce à l'autre. Ainsi, l'accès à la connaissance du métabolome d'une espèce et de son métabolisme est un cheminement long et complexe, surtout quand l'organisme d'étude est une espèce sauvage non-modèle (peu de connaissance existante au sujet de leur métabolome).

Le principe de la métabolomique repose sur une approche non ciblée<sup>2</sup> générant des empreintes métaboliques les plus informatives possible (i.e. regroupant le plus de métabolites accessibles à l'analyse), issues de différents groupes d'échantillons par une technique analytique adaptée à la question de recherche, telle que par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou Spectrométrie de Masse (MS) pour les plus répandues. La comparaison des empreintes obtenues permet alors de révéler les éventuelles similarités et/ou différences entre les groupes d'échantillons étudiés et de mettre en évidence d'éventuelles modifications du métabolome entre une population d'échantillons « témoins » et une ou plusieurs populations d'échantillons « tests » (Nicholson et al., 1999). La stratégie d'une analyse non ciblée, dite sans *a priori*, n'implique pas d'hypothèse de départ concernant des modifications attendues sur le métabolome d'un organisme soumis à un stress. Cette approche offre ainsi un large éventail des changements métaboliques observables, capable de générer de solides hypothèses quant à l'interprétation de ces données.

En écotoxicologie, les objectifs visés par l'approche métabolomique peuvent être classés selon deux stratégies d'analyses, descriptive ou de diagnostic (Courant et al., 2014). Une analyse descriptive vise à décrire et expliquer l'ensemble des changements métaboliques causés par une exposition à un ou plusieurs contaminants. L'observation de ces événements moléculaires peut conduire à des hypothèses concernant les effets néfastes sur l'organisme (ex. altération de la reproduction, du système immunitaire, de la croissance, etc...) et ainsi déterminer le mode d'action des contaminants. Ces hypothèses générées au cours de l'interprétation peuvent être appuyées par des résultats issus de la littérature, avec différentes méthodes expérimentales et à des niveaux d'organisation biologique différents, ou confirmées par des études complémentaires. Ainsi, cette stratégie d'analyse permet d'apporter d'importantes connaissances relatives aux effets des contaminants sur les organismes, comme schématisé en Figure 1.11. Quant à la stratégie de diagnostic, elle a pour objectif d'identifier des biomarqueurs spécifiques à un facteur stress ou un état physiologique ou pathologique donné, pouvant être utilisés dans des modèles prédictifs. Cette stratégie est davantage développée en toxicologie ou dans la recherche clinique pour la mise en évidence de biomarqueurs d'effets (van Ravenzwaay et al., 2007) ou le diagnostic de maladie (Mamas et al., 2011). Cependant, l'approche métabolomique se révèle prometteuse dans l'identification de biomarqueurs d'exposition ou d'effets spécifiques à un contaminant, ou une classe de contaminants, pouvant servir comme outils de surveillance de la qualité des milieux et de l'état de santé des organismes (Bundy et al., 2009; Taylor et al., 2018).

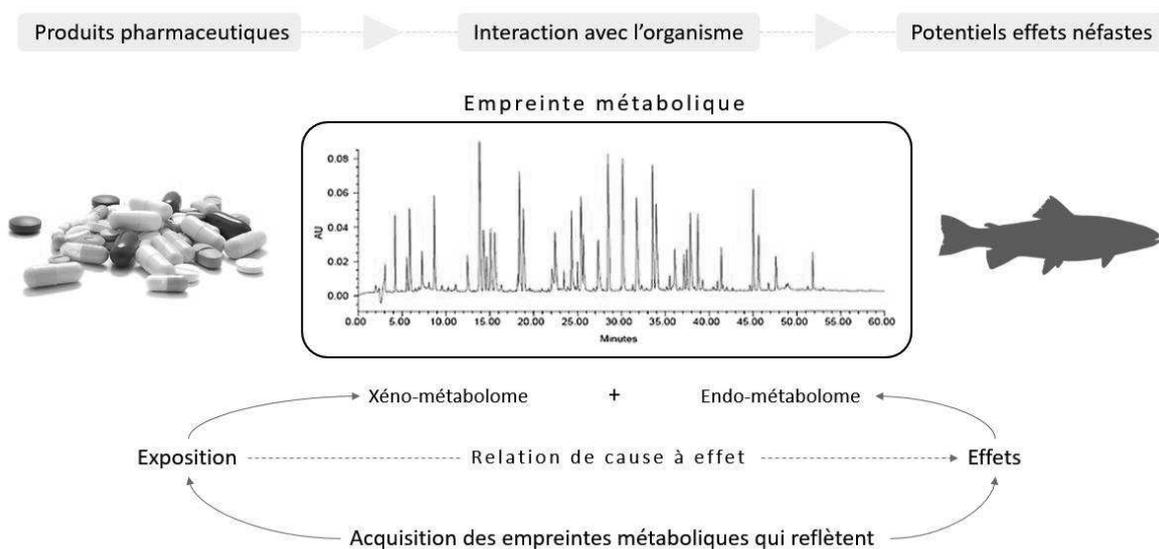
---

<sup>2</sup> La métabolomique se décline également sous d'autres approches non abordées ici, telles que l'analyse de profils métaboliques ou l'analyse de métabolites ciblés (Courant et al., 2014).



**Figure 1.11** : Vue schématique de la stratégie descriptive de l'approche métabolomique pour apporter des connaissances en écotoxicologie.

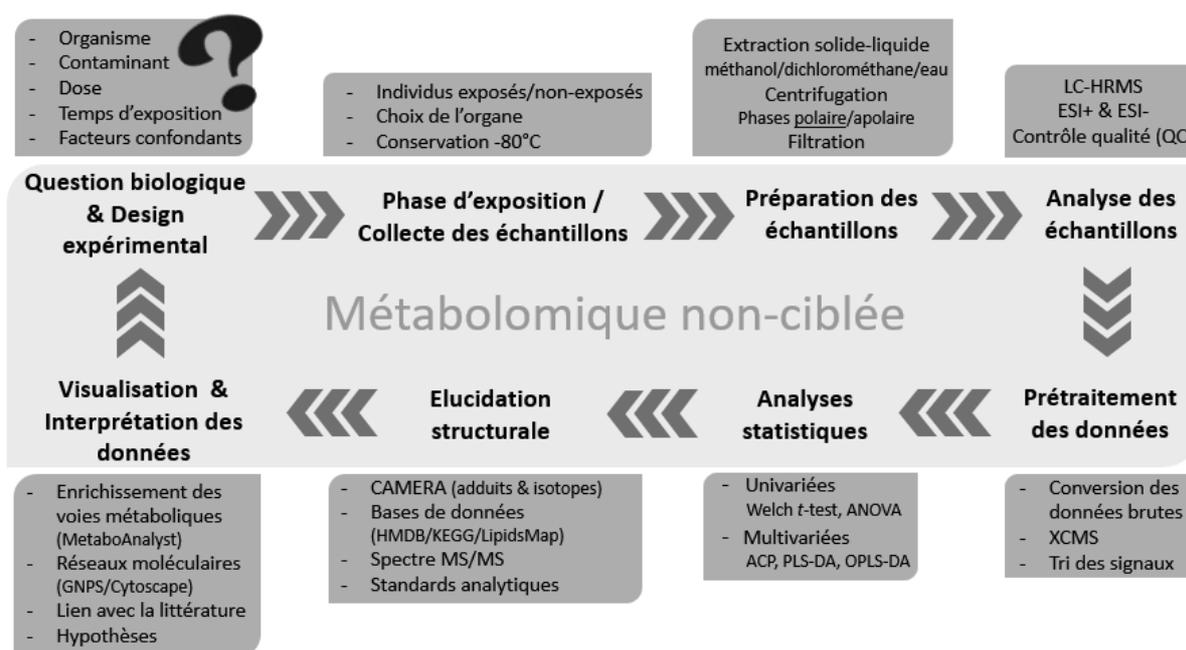
L'approche métabolique permet également d'aborder la relation de cause à effet chez des organismes exposés à une molécule seule, une mixture, ou encore à des échantillons environnementaux complexes (ex. rejet de STEP) au même titre que les approches EDA et TIE détaillées en Section 2.3.1. Comme expliqué précédemment, la génération puis la comparaison d'empreintes métaboliques entre des organismes exposés à un ou plusieurs contaminants et des organismes non exposés, donnent accès à deux types d'informations. L'une concerne le xéno-métabolome (ou exposome), soit le reflet de l'exposition, et l'autre concerne l'endo-métabolome, c'est-à-dire le statut métabolique de l'organisme (Figure 1.12). Ainsi, l'accès à la fois aux xéno- et endo-métabolome permet d'établir une relation de cause à effet entre les contaminants présents dans l'organisme et les modifications métaboliques observées.



**Figure 1.12** : Capacité de l'approche métabolomique à établir une relation de cause à effet à travers l'analyse de l'endo- et du xéno-métabolome.

### 3.2.2. Etapes de l'approche métabolomique non ciblée

Pour parvenir à ces objectifs, la métabolomique nécessite la coordination de plusieurs disciplines telles que la biologie, les statistiques, la bioinformatique et la chimie analytique. Cette approche se déroule en différentes étapes, du design expérimental à l'élucidation structurale, jusqu'à l'interprétation biologique des données métabolomiques (Figure 1.13). Chacune de ces étapes demande une attention particulière de la part des expérimentateurs, ces dernières influençant la qualité et la quantité des informations collectées (Courant et al., 2014).



**Figure 1.13 :** Déroulement de l'ensemble des étapes constituant l'approche métabolomique non-ciblée. Les informations et abréviations accompagnant chacune des étapes seront détaillées dans les sous-parties qui suivent.

#### 3.2.2.1. Design expérimental

En amont de toute étude, la question de recherche est ce qui détermine le design de l'expérience. Il est donc essentiel d'identifier la question de recherche, biologique en ce qui concerne l'approche métabolomique (ex. description des effets d'un contaminant, en association ou non avec un facteur d'étude supplémentaire, ou de ses voies de biotransformation dans un système biologique donné, ou encore identification de biomarqueurs d'effets ou d'exposition), afin de définir le cadre de l'étude et tous les aspects techniques qui en découlent. En ce sens, le design expérimental doit être élaboré en concertation avec l'ensemble des acteurs des différentes disciplines précédemment citées. Après avoir défini la question biologique, incluant l'organisme d'étude et le(s) facteur(s) étudié(s), cette étape a pour objectif d'identifier et de limiter les facteurs de variations biologiques et techniques, susceptibles (i) de masquer les variations liées au(x) facteur(s) d'étude ou (ii) d'être confondus avec

ce(s) dernier(s) et ainsi amener à des conclusions erronées (i.e. facteurs confondants). Cela nécessite (i) de maîtriser, ou *a minima* connaître, la variabilité biologique des échantillons, (ii) d'avoir un nombre de réplicats biologiques suffisant, et (iii) de s'assurer des bonnes pratiques de collecte et de mesure des échantillons. De plus, le choix de l'échantillon à collecter, au même titre que le choix de la technique analytique, doit être adapté à la question biologique définie, c'est-à-dire à ce que l'on cherche à observer ou démontrer.

La variabilité biologique, inter- et intra-individu, est un facteur clé qui doit être maîtrisée au cours d'une expérience afin de ne pas biaiser les résultats (Courant et al., 2014). En effet, différents facteurs biotiques et abiotiques peuvent influencer le métabolisme d'un organisme et masquer la réponse au facteur stress étudié ou se confondre avec celle-ci. Ainsi, il convient de les identifier en amont de toute expérimentation. Dans un premier temps, la variabilité intra-individuelle peut être limitée en appliquant des conditions d'expérimentations similaires à l'ensemble des individus telles que la température, le pH ou la salinité du milieu, le cycle circadien (alternance jour/nuit) ou le régime alimentaire. Dans un second temps, la variabilité inter-individuelle doit être considérée en constituant des groupes d'individus équilibrés et suffisants selon leur genre, leur âge, leur taille ou leur stade de développement par exemple, autant de facteurs pouvant influencer la réponse métabolique de l'organisme face au stress étudié.

En métabolomique, les réplicats biologiques (i.e. analyse de différents échantillons issus de différents individus ayant subi le même traitement) sont préférables aux réplicats analytiques (i.e. analyse répétitive d'un même échantillon obtenu chez un même individu) étant donné que le biais biologique excède souvent le biais analytique (Cheng et al., 2018). Il est du rôle du statisticien de s'assurer de la puissance statistique d'une étude avec un nombre suffisant d'échantillons collectés par condition et ainsi réduire l'influence de la variabilité biologique inter-individuelle. N'existant pas de règle généralisée pour définir le nombre de réplicats, celui-ci doit dépendre de la variabilité biologique associée au système étudié comparée avec la variabilité de l'instrument analytique (Barnes et al., 2016). Par exemple, une étude conduite sur des animaux en conditions contrôlées de laboratoire nécessiterait une dizaine d'individus par groupe tandis que pour une expérience menée sur des cultures cellulaires, dont la variabilité biologique est moindre, la taille d'échantillon serait de trois à cinq par groupe.

Tout comme le nombre suffisant d'individus à inclure dans une étude métabolomique, le choix de l'échantillon et la manière dont il est collecté ont toute leur importance. Le choix de l'échantillon dépend de la richesse et de la pertinence des informations qu'il peut fournir vis-à-vis de la question biologique définie, ainsi que de la faisabilité et facilité à être collecté (Courant et al., 2014). Les échantillons biologiques les plus pertinents chez les mammifères peuvent être des cellules, des tissus,

des organes ou des biofluides selon la question de recherche. Par exemple, chaque biofluide est unique dans le type d'information qu'il offre : l'urine contient le plus grand nombre de métabolites hydrosolubles et constitue une riche source d'informations métaboliques, tandis que la composition du sang est bien maintenue par le contrôle homéostatique, ce qui le rend moins variable que l'urine (Kim et al., 2014).

#### 3.2.2.2. Collecte des échantillons

La manière dont l'échantillon est collecté peut être une source de variabilité non contrôlée apportée par l'expérimentateur. Il est donc nécessaire de définir au préalable, lors de l'élaboration du design expérimental, une procédure d'échantillonnage unique et reproductible afin d'obtenir des échantillons homogènes et représentatifs (ex. même technique de prélèvement effectuée par un même expérimentateur, au même moment de la journée si répétée sur plusieurs jours, avec un matériel identique pour chaque échantillon, le tout en maintenant la chaîne du froid) (Courant et al., 2014). En particulier, les échantillons des groupes témoins et tests doivent être traités de manière identique, car certains métabolites peuvent être très sensibles à de légers écarts par rapport au protocole standard. Par ailleurs, les dispositifs dans lesquels les échantillons sont prélevés doivent être choisis de manière à minimiser les variations indésirables (utiliser les mêmes tubes pour tous les échantillons prélevés) et à éviter l'introduction de contaminants externes tels que les tensioactifs et les plastifiants qui peuvent provoquer de graves interférences pendant l'analyse.

L'incorporation d'une étape d'arrêt du métabolisme est primordiale pour obtenir une composition du métabolome représentative du moment d'échantillonnage. Lors du prélèvement de l'échantillon, les réactions métaboliques sont généralement stoppées sous l'effet de basses températures (addition de solvant froid ou congélation dans l'azote liquide), par l'addition d'acide ou encore par chauffage rapide (Krastanov, 2010). Dans l'attente de la préparation des échantillons, ces derniers peuvent ensuite être stockés tel quel à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou bien sous forme lyophilisée (Álvarez-Sánchez et al., 2010).

#### 3.2.2.3. Préparation des échantillons

En raison de la grande diversité de métabolites en termes de propriétés physico-chimiques et de concentrations, aucune méthode d'échantillonnage et de préparation ne permet un recouvrement total du métabolome. Un protocole favorisera systématiquement la sélection de certaines classes de métabolites au détriment d'autres. Par ailleurs, des interférences (ex. effets matrices, suppression d'ions) peuvent survenir quelle que soit la méthode utilisée, du fait de la grande complexité des échantillons biologiques. De plus, le métabolisme étant en constante évolution, la concentration et la

composition en métabolites peuvent rapidement être modifiées et dénaturées si des mesures appropriées ne sont pas prises. Considérant ces challenges, une préparation d'échantillons idéale en métabolomique devrait (i) être la moins sélective possible pour assurer un recouvrement adéquate du métabolome ; (ii) être simple et rapide pour éviter la perte et/ou la dégradation des métabolites durant la préparation ; et (iii) être reproductible (Vuckovic, 2012). Des mesures particulières sont également à intégrer dans la préparation des échantillons afin que ces derniers soient compatibles avec la technique analytique employée par la suite.

En ce qui concerne les matrices solides, une étape d'extraction est nécessaire pour transférer les métabolites dans une phase liquide. Les échantillons peuvent être lyophilisés avant l'extraction pour permettre une meilleure homogénéité et répétabilité, ainsi que de meilleurs rendements d'extraction (Courant et al., 2014; Vuckovic, 2020). Différents mélanges de solvants avec des polarités variées peuvent être utilisés (ex. eau, méthanol, acétonitrile, éther, dichlorométhane), ce qui conduit, après centrifugation, au fractionnement du métabolome étudié en différentes phases (ex. une phase polaire, une phase apolaire et une phase de débris cellulaires). En métabolomique, l'une des méthodes d'extraction de référence est celle de Bligh & Dyer (1959), avec un mélange biphasique eau/méthanol/chloroforme permettant l'extraction simultanée des espèces hydrophiles et hydrophobes. Depuis, plusieurs variantes ont été développées rendant cette méthode plus performante, notamment en la décomposant en plusieurs étapes, et en optimisant les proportions du mélange de solvants selon la composition des tissus (Want et al., 2013; Wu et al., 2008). Afin de favoriser l'extraction de composés encore présents dans la matrice et solubiliser les composés déjà extraits, plusieurs études ont recours à l'utilisation des ultrasons (Vuckovic, 2012). Une étape finale de filtration peut permettre l'élimination d'interférents résiduels comme les protéines. Enfin, si l'analyse des échantillons s'effectue avec une méthode de séparation par chromatographie gazeuse, l'addition d'une procédure de dérivation avant l'injection (par alkylation, acylation, ou silylation) doit être considérée pour les composés faiblement volatils afin de réduire leur polarité et augmenter leur volatilité (Courant et al., 2014).

Les échantillons liquides, généralement moins complexes, ne nécessitent pas obligatoirement une extraction des métabolites, mais une étape est nécessaire pour s'affranchir des composés avec lesquels des interférences pourraient avoir lieu, masquant les informations associées aux métabolites, tels que les protéines ou certaines classes de lipides. Selon les types de biofluides (ex. urine, sang, plasma, hémolymphe), différentes méthodes peuvent être privilégiées (Vuckovic, 2020). Concernant les urines, la méthode de dilution (« *dilute-and-shoot* ») est la plus répandue. Elle nécessite principalement une dilution dans de l'eau purifiée. De l'azote de sodium (0,1 %) est parfois ajouté pour éviter une croissance bactérienne pendant le stockage (Want et al., 2010), mais une filtration à

0,20 µm a récemment montré une meilleure efficacité pour s'affranchir des bactéries (Bernini et al., 2011). Il est également recommandé de centrifuger après prélèvement pour éliminer les débris cellulaires. Enfin, une précaution propre à la RMN consiste à contrôler le pH et la force ionique de l'urine, pouvant provoquer des décalages chimiques lors de l'analyse. De récentes comparaisons entre la méthode de dilution et l'extraction liquide-liquide (LLE) ont montré une meilleure intensité et un meilleur recouvrement du nombre de métabolites pour la méthode LLE, qui s'avèrerait prometteuse dans la préparation des échantillons d'urines (Legido-Quigley et al., 2010). Étant donné la forte variabilité des concentrations de métabolites dans les urines d'un organisme à un autre (dépendantes de l'hydratation et du statut physiologique de l'organisme), différentes stratégies de normalisation peuvent être appliquées. Ces dernières se basent sur l'estimation de la concentration des urines selon différents principes dont les plus populaires sont : la concentration relative par rapport à un composé de référence (créatinine) ou un sous-groupe de molécules, la mesure de la concentration totale de soluté (osmolalité), rapport de densité urine/eau pure (densité spécifique) ou le volume d'urine sur 24 heures (Gagnebin et al., 2017). D'autres biofluides tels que le plasma ou le sérum sont communément traités par précipitation des protéines avec l'utilisation de solvants organiques (ex. méthanol, acétonitrile, éthanol, acétone). Cette méthode très peu sélective permet un bon recouvrement des métabolites. Cependant, la précipitation par solvant fait subsister le phénomène de suppression d'ions. Pour y remédier, Tulipani et al. (2015, 2013) ont proposé d'inclure une étape d'élimination des phospholipides responsables de la suppression d'ions, avec une précipitation par acétonitrile acide. D'autres méthodes sont également appliquées pour la préparation des biofluides telles que l'ultrafiltration, séparant les molécules selon leur masse moléculaire, utilisée notamment en RMN, ou encore l'extraction sur phase solide (SPE) qui présente l'avantage de s'affranchir d'interférents comme les phospholipides et lysophospholipides (Vuckovic, 2020).

### 3.2.2.4. Analyse des échantillons

La métabolomique requiert des méthodes analytiques capables de générer des empreintes métaboliques les plus informatives possibles. D'après la littérature, deux méthodes se sont principalement développées durant ces dernières décennies, impliquant la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la Spectrométrie de Masse (MS). Historiquement, la RMN est la technique la plus utilisée en métabolomique. Elle offre principalement l'avantage d'être plus robuste et plus reproductible que la MS, et constitue une technique non-destructive nécessitant peu de préparation d'échantillons (Barnes et al., 2016). Toutefois, le développement de la MS depuis ces quinze dernières années a démontré son potentiel dans ce domaine : la MS est une technique beaucoup plus sensible

comparée à la RMN, détectant des composés minoritaires à l'état de traces (pM-nM) susceptibles de représenter de l'information pertinente dans le cadre d'une approche non ciblée (Lankadurai et al., 2013; Lin et al., 2006). Par ailleurs, la précision en masse peut être améliorée grâce à des MS à haute résolution (HRMS) en utilisant des systèmes comme le temps de vol (TOF ; *Time Of Flight*) ou la trappe orbitale (Orbitrap™), et ainsi différencier des composés isobares (de même masse nominale). Afin de rendre la MS plus performante et distinguer des composés isomères, cette dernière est couplée à des techniques séparatives telles que la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou la chromatographie en phase liquide (LC). Par conséquent, les couplages GC-(HR)MS ou LC-(HR)MS permettent la séparation des métabolites selon leurs propriétés physico-chimiques, tout en augmentant la sensibilité et la résolution de la méthode d'analyse (Monteiro et al., 2013).

La GC-MS est l'instrument de préférence pour l'analyse des composés volatiles à semi-volatiles non thermolabiles, et à l'avantage d'être robuste, sensible, reproductible, offrant une excellente capacité de séparation (Beale et al., 2018). La séparation chromatographique dépend principalement des températures de volatilisation des analytes ainsi que de leur affinité avec la phase stationnaire de la colonne, la nature de la phase mobile (généralement de l'hélium) ayant peu d'influence. Les principales formes d'ionisations utilisées en GC-MS sont l'ionisation électronique (EI) et l'ionisation chimique, l'EI étant la plus répandue en métabolomique. Cette dernière, très répétable, a rendu possible l'établissement de bases de données spectrales telles que NIST (*National Institute of Standards and Technology database*), facilitant l'élucidation structurale des composés détectés. Cependant, l'une des limites inhérentes à la GC-MS est son application restreinte à la séparation et la détection de composés à faible poids moléculaire (50-600 Da) et volatils. Pour y remédier, une étape de dérivation chimique est nécessaire (cf. Section 3.2.2.3.) afin d'élargir cette gamme de composés à des métabolites polaires, thermolabiles et non volatils. Cette réaction chimique peut néanmoins altérer la reproductibilité de l'analyse en raison d'une efficacité de dérivation différente pour chaque métabolite. Il convient également de noter que la formation de sous-produits et la transformation structurale lors du processus de dérivation peuvent conduire à une mauvaise interprétation des données générées (Ren et al., 2018). En effet, les sous-produits et les transformations structurales post-dérivation ne doivent pas être considérés comme présents initialement dans les échantillons.

La LC-MS est reconnue comme une technique séparative performante, sensible et robuste, devenant une bonne alternative à l'utilisation de la GC-MS pour l'analyse des molécules peu volatiles, thermolabiles, polaires et/ou de plus haut poids moléculaire, justifiant ainsi son application dans le cadre d'analyses métabolomiques (Lin et al., 2006). Le pouvoir séparatif de cette technique, déterminé selon le temps de rétention de l'analyte dans la colonne chromatographique, repose sur la rétention

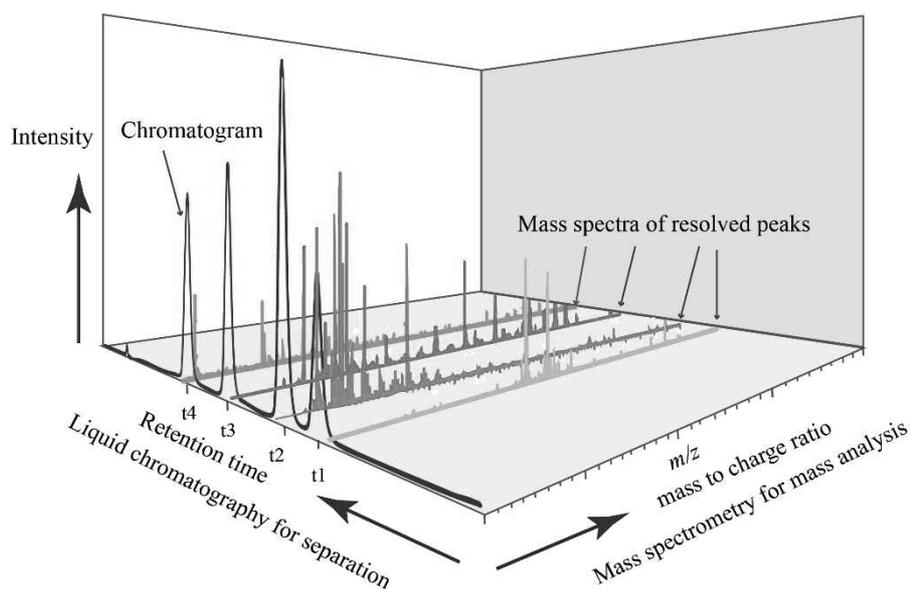
de l'analyte par la phase stationnaire et sur sa capacité à être élué selon son affinité avec la phase mobile. Selon la nature de la phase stationnaire, deux types de chromatographie sont principalement rencontrés en métabolomique: (i) la chromatographie de type phase inverse (RPLC), implique généralement une phase stationnaire en silice liée à du C18 ou C8 et permet la rétention de métabolites de faible à moyenne polarité, et à l'opposé, (ii) la chromatographie à interaction hydrophile, impliquant des phases stationnaires plus polaires ou chargées, offre la possibilité d'analyser des métabolites très polaires habituellement non retenus par RPLC (ex. acides aminés, sucres, acides carboxyliques et nucléotides) (Ren et al., 2018; Theodoridis et al., 2020). D'autres techniques séparatives comme la chromatographie liquide ultra performante (UPLC) permettent l'utilisation de phases stationnaires composées de particules de granulométrie inférieure à 2  $\mu\text{m}$  améliorant ainsi la résolution chromatographique, la vitesse d'analyse et la sensibilité (de Villiers et al., 2006). Complémentaire à ces techniques séparatives, l'électrophorèse capillaire est une bonne approche pour la séparation des molécules très polaires et ioniques (Monton and Soga, 2007). Parmi les sources d'ionisation associées à la LC-MS, plusieurs options sont disponibles incluant l'ionisation par électrobulbion (ESI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). L'ESI est de loin la méthode de choix pour les analyses LC-MS en métabolomique grâce à son ionisation « douce » qui produit un large nombre d'ions moléculaires, sous forme intact pour la plupart, issus de composés très polaires à moyennement polaires. Les autres sources d'ionisation APCI et APPI peuvent être complémentaires pour l'analyse respective de composés polaires de petite masse ou de composés plus apolaires (ex. acides gras, stéroïdes, HAPs, etc.), bien que moins rencontrées dans l'approche métabolomique non ciblée. Cependant, l'ESI est très sensible aux effets matrices, notamment au phénomène de suppression d'ions, ce qui peut générer une variabilité du signal mesuré. En raison de la grande diversité des propriétés physico-chimiques des métabolites, il est souvent préférable d'analyser les échantillons en mode d'ionisation positif et négatif dans une plage de balayage de  $m/z$  comprise entre 50 et 1000 afin de maximiser le recouvrement du métabolome (Zhou et al., 2012).

De la même manière que pour les méthodes de préparation d'échantillon, aucune méthode analytique ne se suffit pour un recouvrement complet du métabolome. Il est parfois nécessaire d'avoir recours à la complémentarité de ces méthodes, comme par exemple le couplage de différentes colonnes chromatographiques (ex. HILIC et RPLC) ou différentes sources d'ionisation (ex. ESI et APCI) dans le cadre d'analyses en LC-MS. Cependant, la combinaison de différentes méthodes a pour conséquence une augmentation du temps et donc du coût d'analyse, une quantité d'échantillons nécessaire parfois plus grande, et présente également des difficultés pour la fusion et le traitement des données générées par les différentes méthodes (Theodoridis et al., 2012). Face à ces limites, un

compromis est souvent inévitable pour sélectionner et optimiser la méthode la plus en adéquation avec les classes de métabolites d'intérêt et la question de recherche.

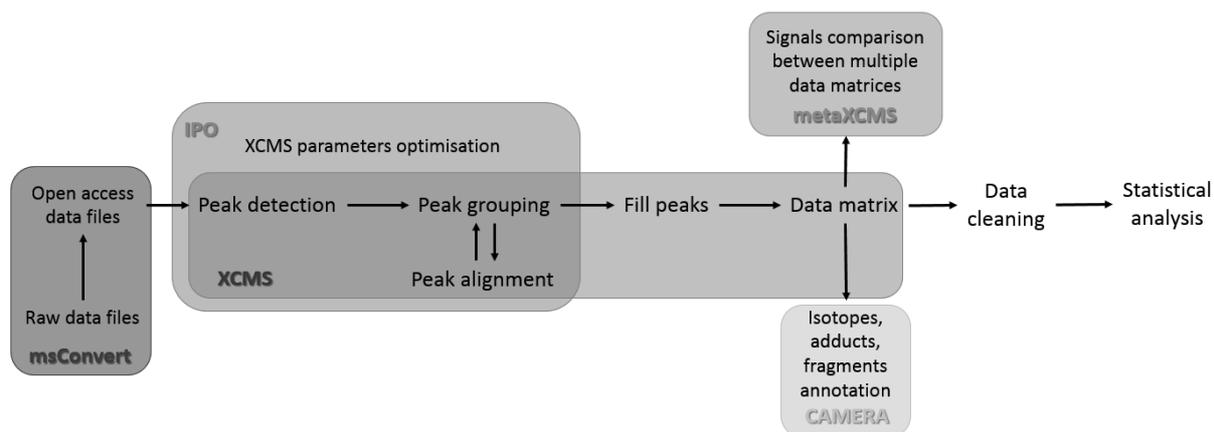
### 3.2.2.5. Prétraitement de données

L'acquisition d'empreintes métaboliques par les techniques précédemment détaillées génère une quantité très importante de données. Dans le cas de la LC-MS ou GC-MS, les données générées sont caractérisées par trois dimensions : le temps de rétention, dépendant de l'élution des composés lors de l'injection dans la colonne chromatographique, le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) du composé détecté et son intensité dépendante de son abondance (Figure 1.14).



**Figure 1.14** : Structure des données tridimensionnelles générées par LC-MS (source : Daniel Norena-Caro, Wikipédia)

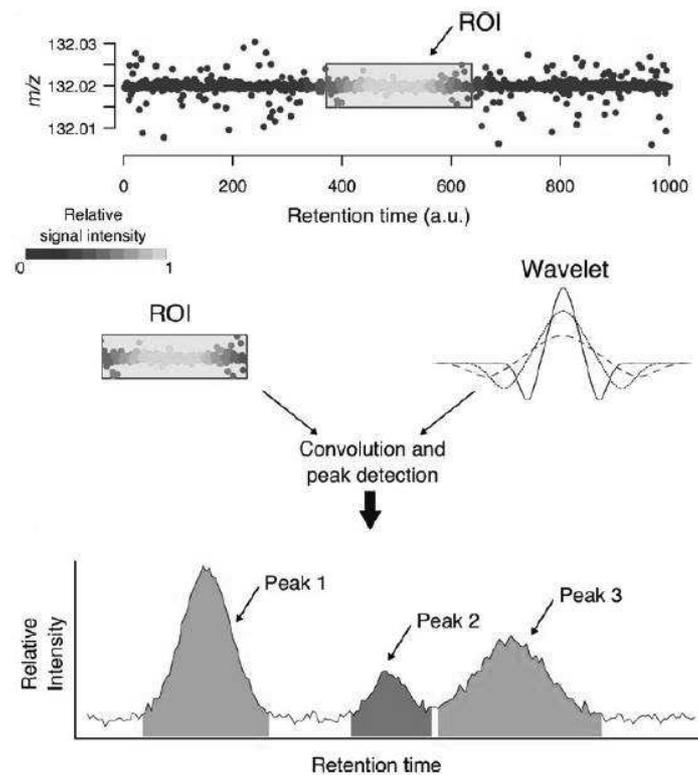
Le traitement de données aussi complexes ne peut s'effectuer qu'à l'aide de logiciels et d'algorithmes spécifiques. L'objectif de cette étape est de convertir ces données instrumentales, dites brutes, en données extraites (ex. matrice contenant la liste des pics observés avec leur intensité pour chaque échantillon) qui pourront par la suite être facilement manipulées, et traitées par des outils d'analyses statistiques. Un exemple des différentes étapes de traitement de données est schématisé en Figure 1.15 et détaillé ci-après.



**Figure 1.15** : Différentes étapes du traitement de données en métabolomique non ciblée, utilisant plusieurs outils fonctionnant sous environnement R

Les données brutes sont stockées dans des fichiers sous un format propriétaire accessible avec un logiciel spécifique du constructeur. Par conséquent, le traitement des données commence souvent par la conversion des fichiers bruts en un format accessible à un ensemble d'outils de traitement et d'analyse, notamment disponibles en libre accès. La librairie ProteoWizard (Kessner et al., 2008) inclut l'outil msConvert capable de lire des fichiers de données issus de différentes MS et de les convertir en un format plus accessible et souvent plus compacté (i.e. en ne conservant que le centroïde de chaque profil chromatographique). Par la suite, la conversion de ces données en données extraites peut être effectuée par de multiples programmes disponibles en libre accès tels que XCMS (Smith et al., 2006) ou MZmine (Pluskal et al., 2010) pour les plus utilisés. Les principales étapes de traitement intègrent généralement la détection des pics (*peak detection* ou *peak picking*) suivie d'un groupement (*peak grouping*) et d'un alignement des pics (*peak alignment*) selon le  $m/z$  et le temps de rétention pour un pic donné à travers l'ensemble des échantillons.

Dans XCMS, l'étape *peak detection* peut être effectuée via deux algorithmes : Matched filter et centWave. L'algorithme centWave a plus récemment été développé pour s'adapter aux données générées en haute résolution. Ce dernier se décompose en deux étapes. La première consiste à trouver des zones potentielles contenant des pics, appelé région d'intérêt (ROI). La deuxième étape cherche à détecter les pics dans ces ROI à l'aide d'un filtre à ondelette très sensible. Les ROI sont constituées d'un ensemble de points qui montre de faible déviation en masse sur une échelle de temps, dont l'intensité augmente puis diminue (Figure 1.16). Si la déviation en masse de chaque point et la fenêtre de temps de la ROI (i.e. la largeur de la base du pic chromatographique) n'excèdent pas les valeurs seuils fixées au préalable dans l'algorithme, alors la ROI est analysée par le filtre à ondelette. Ce filtre à ondelette en forme de « chapeau Mexicain » va modéliser la forme du pic et permettre la sélection (ou non) d'un ou plusieurs pics étroitement élués au sein de la ROI.



**Figure 1.16** : Illustration de l'algorithme centWave appliquée à l'étape de peak detection effectuée par XCMS (Domingo-Almenara and Siuzdak, 2020)

L'étape suivante, le *peak alignment*, peut être effectuée dans XCMS selon deux méthodes nommées *obiwarp* et *peakGroups*. Pour un meilleur contrôle de l'alignement des pics, la méthode *peakGroups* est recommandée, bien que l'affinage des paramètres peut s'avérer plus difficile (Forsberg et al., 2018). Cette méthode nécessite dans un premier temps une étape de *peak grouping*, c'est-à-dire de grouper sous une seule identité les pics ayant les mêmes caractéristiques de *m/z* et de RT à travers tous les échantillons. Pour y parvenir, l'algorithme *peakDensity* utilise une fine tranche de *m/z* (défini par l'utilisateur selon la résolution de la MS) dans laquelle il groupe les pics trouvés autour d'un certain RT à travers tous les échantillons. L'algorithme sélectionne par la suite les groupes de pics les mieux formés (faible déviation du *m/z* et du RT par rapport la moyenne), répartis sur le temps de rétention, pour permettre une bonne correction non linéaire (car les variations de RT pour un même pic à travers les différents échantillons ne sont pas forcément linéaires). En utilisant le RT médian de chaque groupe de pics sélectionné, l'alignement des profils chromatographiques peut être réalisé par une technique de régression appelée *LOESS* (*Locally Estimated Scatter-plot Smoother*). C'est une technique non-paramétrique qui ajuste une ligne lissée à travers chaque chromatogramme et compare ces lignes lissées à travers tous les chromatogrammes des échantillons pour finalement corriger le RT de chaque pic dans chaque échantillon. Pour finir, une étape de *peak grouping* est répétée afin d'affiner le groupement des pics en se basant sur leur RT après correction.

A l'issue de ces étapes, l'existence de données manquantes est un scénario très fréquent. Cela peut s'expliquer par deux raisons, (i) soit, le pic est inférieur à la limite de détection de l'instrument pour un groupe d'échantillons donné, (ii) soit le pic est supérieur à la limite de détection mais les algorithmes n'ont pas réussi à le détecter en raison de la faible intensité de ce pic et/ou parce que ce dernier est masqué par le bruit ou d'autres pics coélus. Cependant, avoir des données manquantes risque de réduire la puissance des tests statistiques et de l'analyse des données, jusqu'à amener à des résultats biaisés. Pour pallier les données manquantes, XCMS propose la méthode *fill peak*, communément reconnue pour « remplir » les pics manquants. Quand l'absence de pic est due aux algorithmes, ces derniers vont à nouveau chercher ce pic en utilisant les informations ( $m/z$  et temps de rétention) provenant d'autres échantillons où le pic a été détecté. Dans le cas où le pic est inférieur à la limite de détection, la méthode *fill peak* utilise le bruit de fond dans la zone où le pic devrait être attendu afin de déterminer la valeur de l'intensité du pic manquant.

Enfin, XCMS génère un fichier de sortie constituant une matrice de données listant l'ensemble des signaux, caractérisés par leur  $m/z$  et temps de rétention, ainsi que leur intensité dans chaque échantillon. XCMS offre également la possibilité de générer pour chaque signal le chromatogramme de l'ion extrait (EIC) permettant d'évaluer la qualité de la sélection et de l'alignement des pics, auquel cas les paramètres gouvernant les différents algorithmes peuvent être ajustés manuellement et le traitement des données relancé. En effet, l'affinage des réglages XCMS aura un rôle déterminant sur la qualité et la quantité de l'information extraite. Cependant cette compétence requiert une très bonne compréhension des différents paramètres, ce qui n'est pas toujours évident pour des néo-utilisateurs. Une équipe de chercheurs a pour cela développé le package IPO, fonctionnant sous l'environnement R, afin d'optimiser de manière automatique les paramètres XCMS de *peak detection*, *peak alignment* et *peak grouping* (Libiseller et al., 2015). Après comparaison de ce dernier avec un affinage manuel des paramètres XCMS, les auteurs Albóniga et al. (2020) concluent que le package IPO s'avère efficace lorsque les données sont issues d'une analyse LC-MS performante (i.e. bonne répétabilité analytique), néanmoins l'absence de telles données peut entraîner un paramétrage irréaliste, qui pourrait nécessiter finalement un réglage manuel plus fin.

De nombreux outils répertoriés dans plusieurs revues (Gardinassi et al., 2017; Misra, 2018) gravitent autour du traitement et de l'analyse des données. Certains d'entre eux sont compatibles avec XCMS (Mahieu et al., 2016) et peuvent se greffer au traitement de données, sous environnement R, comme le package IPO mentionné plus haut, mais également le package MetaXCMS (Patti et al., 2012) qui permet une comparaison des signaux communs et uniques entre plusieurs matrices de données générées par différents traitements XCMS, ou encore le package CAMERA (Kuhl et al., 2012). Ce dernier a pour but de réduire la redondance d'informations en regroupant et en annotant les ions isotopiques,

les ions fragments, les clusters d'ions (ex. dimère, trimère, etc.) et les adduits apparentés à une même molécule. En effet, quand un métabolite est analysé par LC-ESI-MS, il est courant de détecter plus d'une espèce d'ions dans un même spectre de masse en raison de la présence d'isotopologues, d'adduits, de cluster et de fragments produits dans la source d'ionisation. Bien que ces différentes espèces d'ions présentent un temps de rétention identique<sup>3</sup>, les valeurs de m/z sont toutefois différentes. Par conséquent, XCMS les reporte comme des signaux uniques, complexifiant la matrice de sortie. Cela pourrait perturber les analyses statistiques et ralentir l'étape d'identification en augmentant le nombre de signaux à investiguer. Afin de regrouper ces signaux apparentés, CAMERA se base sur la corrélation entre les formes de pics chromatographiques de chaque signal détecté à un même temps de rétention. De plus, CAMERA tente également d'annoter les espèces d'ions en appliquant un tableau de règles. La table de règles permet d'identifier les isotopes, les adduits fréquents tels que le sodium et le chlorure, ainsi que les espèces de fragments les plus communs ou les clusters d'ions.

L'ensemble de ces fonctions et algorithmes servant au prétraitement des données métabolomiques a intelligemment été regroupé en libre accès sur la plateforme en ligne W4M (*Workflow for Metabolomic*, interface Galaxy, Giacomoni et al., 2015). L'utilisation intuitive de W4M permet ainsi la construction, l'archivage et le partage de son « workflow » pour le traitement de ses données, incluant l'analyse statistique et l'annotation des métabolites.

Avant d'aller plus loin dans l'analyse des données, il est nécessaire de s'assurer de la qualité de ces dernières en évaluant la répétabilité analytique pour chacun des signaux détectés et extraits dans la matrice de données. Pour cela, un échantillon appelé contrôle qualité (QC) est préparé en mélangeant un volume identique et homogène de chaque échantillon. Le QC, représentatif de l'ensemble des échantillons, est ensuite injecté à intervalle régulier tout le long de la séquence d'analyse et dans les mêmes conditions que les échantillons. Ainsi, les variations d'intensité pour l'ensemble des signaux d'une injection à l'autre d'un QC reflètent la répétabilité analytique. Un coefficient de variation (CV) se calcule donc pour chacun des signaux présents dans la matrice de données, en se basant sur leur intensité reportée dans chaque QC régulièrement injecté. En métabolomique, la variabilité analytique est considérée comme acceptable lorsque plus de 70 % des signaux détectés présentent un CV inférieur à 30 % (Want et al., 2010). Une fois les critères analytiques approuvés, un nettoyage de la matrice de données est généralement effectué en supprimant les signaux peu répétables, dont leur coefficient de variation est supérieur à 20 ou 30 % selon les études (Want et al., 2010).

---

<sup>3</sup> Etant généralement formés dans la source d'ionisation, les adduits, cluster d'ion et fragments partagent le même temps de rétention. De plus, les isotopes n'influencent pas le temps de rétention.

### 3.2.2.6. Analyses statistiques

En raison de la complexité de la matrice précédemment générée, l'information d'intérêt biologique portée par ces données analytiques peut être révélée uniquement par des méthodes statistiques appropriées, souvent réparties entre des approches univariées et multivariées.

Les approches univariées permettent d'analyser une à une les variables explicatives (ex. un ion) en fonction d'une métadonnée (ex. dose, temps, genre), et sont donc facilement interprétables. En métabolomique, cela permet de savoir si la différence d'abondance d'un ion (une variable) entre un groupe « témoin » et un groupe « test » est significative, avec une probabilité d'erreur généralement fixée à 5 % (i.e.  $p < 0,05$ ). Plusieurs tests univariés sont disponibles pour l'analyse de données métabolomiques. Le choix d'une méthode repose sur certains critères mathématiques qu'il est nécessaire de considérer comme la distribution des variables et leur indépendance ainsi que l'homogénéité des variances (Vinaixa et al., 2012). Par exemple, pour évaluer des différences entre deux groupes ou plus, des tests paramétriques tels que le test-*t* de Student et l'ANOVA (*analysis of variance*) sont communément appliqués, à condition que les hypothèses de normalité soient convenablement vérifiées. Dans les cas où la normalité des données n'est pas supposée, des tests non-paramétriques sont préférables comme le test de Wilcoxon-Mann-Whitney et le test de Kruskal-Wallis. Cependant, un test univarié sera répété autant de fois qu'il y aura de variables, c'est-à-dire des centaines voire des milliers de fois. Par conséquent, la multiplication du nombre de tests menés en parallèle à travers l'ensemble des variables augmente la probabilité d'obtenir par chance une valeur de statistique significative associée à une variable (i.e. faux positif). Afin de contrôler le problème des tests multiples, plusieurs méthodes de correction sont disponibles. Chacune de ces méthodes est caractérisée par un certain équilibre entre le fait d'éviter les fausses associations de variables (i.e. les faux positifs) et le fait d'éviter de rejeter de vraies associations (i.e. les faux négatifs). Selon le design de l'étude, les chercheurs devront décider d'utiliser des méthodes plus ou moins conservatrices dont la correction de Bonferroni ou la correction du FDR (*False Discovery Rate* ; Benjamini and Hochberg, 1995). Une des limites de l'approche univariée est l'absence de considération des corrélations entre les variables, susceptibles d'être autant voire plus informatives que les variables considérées séparément. En effet, les niveaux des métabolites ne sont pas indépendants comme le présument les analyses univariées, mais sont directement connectés *via* des myriades de réactions enzymatiques. Par conséquent, les statistiques multivariées sont capables d'étudier simultanément plusieurs variables et exploitent donc explicitement les corrélations entre les métabolites.

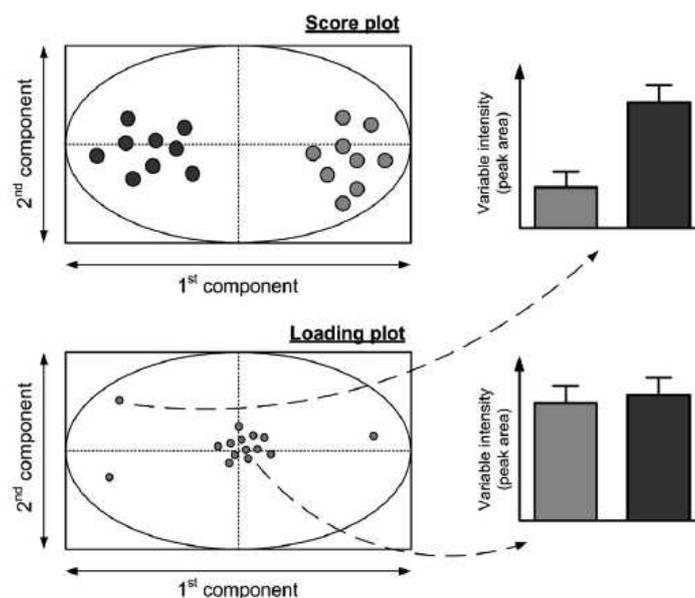
Les approches multivariées, réparties entre méthodes supervisées et non-supervisées, ont pour objectif de réduire la dimensionnalité des données afin de résumer et visualiser dans un espace

réduit la variabilité contenue dans la matrice de données. En raison de la disparité en intensité, des variations inter-échantillons entre les variables étudiées et des fluctuations analytiques incontrôlées, les données extraites ne peuvent être directement utilisées pour ce type d'analyse et requièrent au préalable un prétraitement tel qu'une normalisation (ex. par la moyenne, la médiane, la somme), une mise à l'échelle (ex. Pareto, *Unit Variance*) et/ou une transformation des données (ex. logarithmique) (Beisken et al., 2015; Karaman, 2017).

Les méthodes non-supervisées sont considérées comme des analyses statistiques descriptives, dont l'objectif est d'obtenir une vision globale des données sans *a priori*, afin de révéler la structure latente. L'analyse en composante principale (ACP) est la méthode non-supervisée la plus utilisée en métabolomique. L'ACP est basée sur la transformation linéaire des données métaboliques en un ensemble de variables linéairement non-corrélées (i.e. orthogonales) appelées composantes principales. Cette méthode de décomposition maximise la variance expliquée par la première composante tandis que les composantes suivantes expliquent des quantités de variance de plus en plus réduites. Un paramètre important, le  $R^2$ , correspond au coefficient explicatif de la composante principale (aussi appelé coefficient de corrélation). En pratique, les deux ou trois premières composantes permettent souvent d'expliquer plus de 40 % de la variance totale. Après l'application de cette méthode, les échantillons peuvent être présentés sous forme de cartes factorielles des individus (i.e. *score plot*) selon leurs coordonnées dans l'espace réduit (Figure 1.17). Les individus appartenant à un même groupe sont susceptibles d'être proches les uns des autres. Il est ainsi possible de visualiser la structuration de la matrice de données selon un facteur confondant analytique tel que l'ordre d'analyse des échantillons ou un facteur biologique étudié. Cette visualisation offre également la possibilité d'identifier des échantillons aberrants (i.e. *outliers*). Parallèlement, une carte factorielle du poids des variables (i.e. *loading plot*) est établie. Elle représente la projection des variables explicatives sur les composantes latentes. Les variables responsables de la séparation des groupes se répartissent de part et d'autre du graphique par analogie aux échantillons qui les sur-expriment ou sous-expriment, mettant ainsi en exergue des variables discriminantes. Une autre approche non supervisée utilisée en métabolomique est la classification ascendante hiérarchique (CAH). Cette dernière se base sur une matrice de distance (ex. distance euclidienne) : en début d'analyse, il y a autant de groupes que d'observations, puis les groupes les plus proches fusionnent, jusqu'à ce qu'il n'en reste plus qu'un. La CAH est ainsi représentée sous forme d'arbre ou dendrogramme. Ces analyses non-supervisées sont généralement suivies d'analyses supervisées, qui facilitent la mise en évidence des signaux d'intérêt.

Parmi les méthodes supervisées, dites explicatives et prédictives, la PLS (*Partial Least Squares* ou régression aux moindres carrés partiels) vise à expliquer une ou plusieurs réponses (Y) à partir des

variables explicatives (X) contenues dans les matrices de données. Y peut être constituée de variables quantitatives ou qualitatives. Lorsqu'il s'agit de variables qualitatives, cela fait référence à la PLS-DA (*Discriminant Analysis*), Y est alors une matrice numérique binaire contenant seulement des 0 et des 1. Ce modèle vise à trouver une direction multidimensionnelle dans l'espace X qui explique la direction du maximum de la variance multidimensionnelle dans l'espace Y. Dans ce modèle, deux paramètres sont importants :  $R^2Y$  et  $Q^2$  ( $R^2X$  correspondant à la définition du  $R^2$  de l'ACP). Les valeurs de ces deux paramètres doivent être proches de 1,  $Q^2$  étant toujours plus petit que  $R^2Y$ .  $Q^2$  représente l'erreur de prédiction alors que  $R^2Y$  explique l'appartenance aux différentes classes (valeurs de Y). Un modèle est considéré comme bon quand  $R^2Y$  et  $Q^2$  sont supérieurs à 0,5. Le calcul de  $Q^2$  est réalisé par le biais de validations croisées. Pour cela, le jeu de données original est divisé en  $k$  jeu de données (ou « blocs »). Un des  $k$  jeux de données est sélectionné comme ensemble de validation tandis que les  $k-1$  autres jeux de données servent au départ de jeu d'apprentissage. L'opération est ensuite répétée en sélectionnant un autre échantillon de validation parmi les blocs prédéfinis. Un test de permutation doit aussi être mis en œuvre afin de valider le modèle. Les échantillons étant réaffectés à des classes au hasard, il est attendu que le  $R^2Y$  et  $Q^2$  diminuent fortement après un grand nombre de permutation car les classes ne sont plus dépendantes du facteur étudié. Dans le cas où le  $R^2Y$  et  $Q^2$  sont inchangés après permutation, ou très peu, cela signifie que le modèle précédent est obtenu par chance et n'est donc pas valide. Quand le modèle est validé, les variables contribuant le plus à la discrimination des groupes au sein du modèle peuvent être sélectionnées et priorisées pour l'élucidation structurale. Dans le cas de la PLS-DA, la contribution des variables dans le modèle est exprimée par la valeur de leur VIP (*Variable Importance in Projection*). Plus la VIP est élevée, plus la variable contribue à la discrimination des groupes. Généralement, les VIP avec une valeur supérieure à 1 sont considérés comme ayant une contribution significative, bien qu'il n'y ait pas de consensus sur ce seuil.



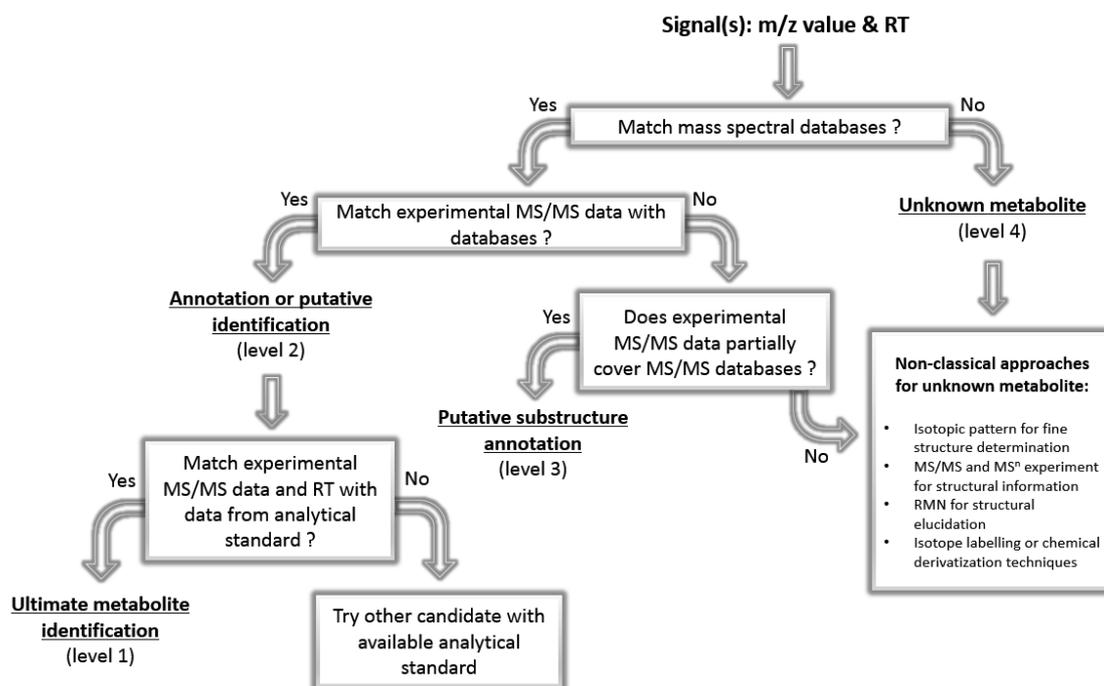
**Figure 1.17 :** Représentation graphique d'une ACP ou d'une PLS-DA. Score plot : carte factorielle du poids des individus ; Loading plot : carte factorielle du poids des variables (Roux et al., 2011).

La combinaison d'approches multivariées et univariées est fortement recommandée afin d'augmenter l'extraction d'informations pertinentes à partir de données métabolomiques (Vinaixa et al., 2012). Une fois les signaux d'intérêt biologique mis en évidence par les analyses statistiques, l'étape suivante consiste à élucider la structure chimique de ces signaux afin d'identifier les métabolites correspondants.

### 3.2.2.7. Elucidation structurale

En métabolomique non ciblée, l'un des grands challenges est l'identification des métabolites par LC-MS, étape indispensable pour fournir une interprétation biologique. La difficulté de cette étape se révèle par sa capacité à devoir associer une structure chimique bien définies, et donc le métabolite correspondant, à un rapport m/z détecté lors de l'analyse. En effet, même pour un m/z acquis en haute résolution (i.e. une précision à la 5<sup>ème</sup> ou 6<sup>ème</sup> décimale), plusieurs formules brutes peuvent correspondre et pour chacune d'entre elles, plusieurs formules développées sont possibles (ex. isomères de position, isomères de structure, etc.). Cette difficulté est d'autant plus marquée par la présence d'une redondance d'informations (i.e. un composé parent peut générer plusieurs signaux analytiques ; cf. Section 3.2.2.5.) qui ne peut pas être écartée de manière exhaustive malgré l'existence d'outils précédemment cités. Pour rendre compte de cette difficulté, différents niveaux d'annotations ont été définis, selon le nombre et la qualité des indices collectés, afin d'évaluer le degré de confiance de l'identification d'un métabolite (Sumner et al., 2007). La stratégie mise en œuvre pour parvenir au

plus haut degré de confiance dans l'identification d'un métabolite est illustrée en Figure 1.18, et détaillée ci-dessous.



**Figure 1.18** : Stratégie pour parvenir à l'identification d'un métabolite selon les 4 niveaux d'annotation décrits par Sumner et al. (2007) (modifiée de Rathahao-Paris et al., 2015)

La première étape consiste à comparer les valeurs de  $m/z$  mesurées avec celles de composés référencés dans des bases de données internes au laboratoire ou publiques telles que HMDB (Wishart et al., 2013), KEGG (Kanehisa and Goto, 2000), PubChem (Bolton et al., 2008), LipidMaps (Fahy et al., 2009), parmi d'autres référencées dans Go (2010). L'utilisation de bases de données permet ainsi d'associer aux signaux d'intérêt une formule brute correspondant à une structure chimique et donc à un métabolite. En revanche, une valeur de  $m/z$  (même obtenue en spectrométrie de masse haute résolution) pouvant être associée à plusieurs formules brutes et une formule brute pouvant correspondre à plusieurs structures chimiques, le nombre de métabolites candidats pour un seul signal est multiple (i.e. une dizaine voire une centaine de candidats). Afin de réduire le nombre de candidats potentiels, d'autres éléments peuvent renseigner la structure chimique du signal observé, notamment en se basant sur les 7 règles d'or (Kind and Fiehn, 2007) dont font parties les règles de valence des atomes ou encore les massifs isotopiques. Certains paramètres physico-chimiques d'un métabolite peuvent également être déduits selon la chimie de la colonne chromatographique et son RT, comme par exemple sa polarité, et ainsi permettre de réduire la liste de candidats. D'autres informations structurales peuvent également être fournies par des techniques de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) capables de fragmenter, selon une énergie de collision plus ou moins forte par

exemple, un ion parent en plusieurs ions fils. Ces spectres de fragmentation ainsi générés sont très informatifs sur la structure du signal d'intérêt et peuvent être comparés à d'autres spectres MS/MS de métabolites référencés dans des bases de données (Vinaixa et al., 2016). Il existe des bases de données spectrales référençant des spectres MS/MS expérimentaux tels que METLIN (Guijas et al., 2018), GNPS (Wang et al., 2016), MassBank (Horai et al., 2010) ou encore des spectres de fragmentation générés *in silico* comme MetFrag (Ruttkies et al., 2016). Si la correspondance entre les spectres MS/MS observés et ceux d'un métabolite référencé est totale, alors l'annotation du composé a atteint un degré de confiance de niveau 2. Dans le cas où cette correspondance est seulement partielle, cela pourrait éventuellement renseigner la classe du métabolite ou une sous-structure de ce dernier, ce qui correspondrait à une annotation de niveau 3. Enfin, l'unique manière de passer d'une annotation (putative, de niveau 2) à une identification formelle (niveau 1), est d'injecter, dans les mêmes conditions analytiques que l'échantillon et sur le même appareil, le standard analytique correspondant, à condition que ce dernier soit disponible dans le commerce. L'injection du standard analytique fournit deux informations orthogonales qui sont le spectre MS (ou MS/MS) et le RT, indispensables à l'identification formelle du métabolite. Cependant, l'identification de niveau 1 renseigne seulement sur la structure en 2 dimensions de la molécule mais n'intègre pas la stéréoisométrie (3 dimensions) de cette dernière. Pour cela, la *Metabolomics Society* a récemment rajouté un niveau 0 pour une identification sans ambiguïté de la stéréoisométrie de la molécule (Blaženović et al., 2018). A l'opposé, le degré de confiance de niveau 4 est réservé aux métabolites inconnus qui ne sont référencés dans aucune base de données.

Lors de la génération d'empreintes métaboliques, moins de 20 % des signaux d'intérêt sont généralement annotés (Blaženović et al., 2018). Par conséquent, l'élucidation structurale du reste des métabolites non-annotés, soit inconnus, est un enjeu majeur pour une meilleure connaissance du métabolome de l'organisme étudié. Des études plus approfondies sont donc essentielles pour identifier de nouveaux métabolites ce qui nécessite l'utilisation, voire la combinaison, de méthodes analytiques plus adaptées (ex. RMN, marquage isotopique, techniques de dérivation chimique, MS/MS ou MS<sup>n</sup>) et d'outils de calcul et de prédiction pour interpréter les données spectrales expérimentales d'ions fragmentés (Rathahao-Paris et al., 2015). L'une des approches pour l'élucidation structurale de métabolites inconnus est la construction de réseaux moléculaires basés sur les similarités spectrales (spectres de fragmentation issus d'analyses MS/MS). La plateforme en ligne *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu/>) a été développée pour l'analyse et le partage de données spectrales et ainsi permettre la construction de tels réseaux moléculaires (Wang et al., 2016). Le principe de base sur lequel repose GNPS est l'hypothèse selon laquelle les molécules de structure similaire se fragmenteront de la même manière lors de l'acquisition de données MS/MS.

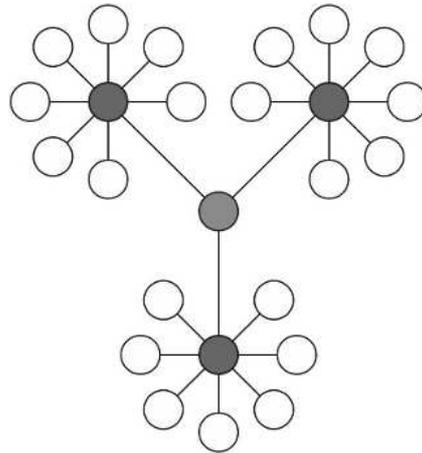
Par conséquent, deux molécules structurellement apparentées auront probablement des spectres d'ions fragmentés similaires. L'algorithme de GNPS compare automatiquement tous les spectres MS/MS en les alignant un par un et leur assigne grâce à une fonction cosinus un score, le *cosine score*, compris entre 0 (aucune similitude entre les spectres) et 1 (spectres identiques) pour chaque alignement. Un filtre peut ensuite être appliqué pour ne conserver uniquement les molécules ayant un *cosine score* élevé (généralement > 0,6) et un nombre suffisant de fragments partagés (généralement > 5). Le réseau moléculaire peut ensuite être exporté vers le logiciel Cytoscape pour en améliorer sa visualisation et son exploitation. Ainsi, chaque nœud (*node*) du réseau correspond à un spectre de fragmentation, soit une molécule, relié entre eux par des lignes (*edge*) plus ou moins épaisses selon leur degré de similarité. La visualisation du réseau moléculaire permet de cette manière d'observer des groupes de spectres MS/MS correspondant à des familles moléculaires de métabolites structurellement liées. Lorsqu'au sein d'un groupe un ou plusieurs spectres ont été au préalable identifiés, il est possible d'annoter les autres spectres analogues plus rapidement obtenant ainsi une annotation putative de leur structure (annotation de niveau 3), en attendant leur confirmation.

Une fois les métabolites d'intérêt identifiés, il est nécessaire de les replacer dans leur contexte biologique afin de fournir une interprétation en lien avec la question de recherche posée. L'interprétation biologique des données métabolomiques doit si possible intégrer les causes biochimiques des changements métaboliques ainsi que leurs conséquences physiologiques sur le système biologique étudié.

#### 3.2.2.8. Visualisation & Interprétation des données métabolomiques

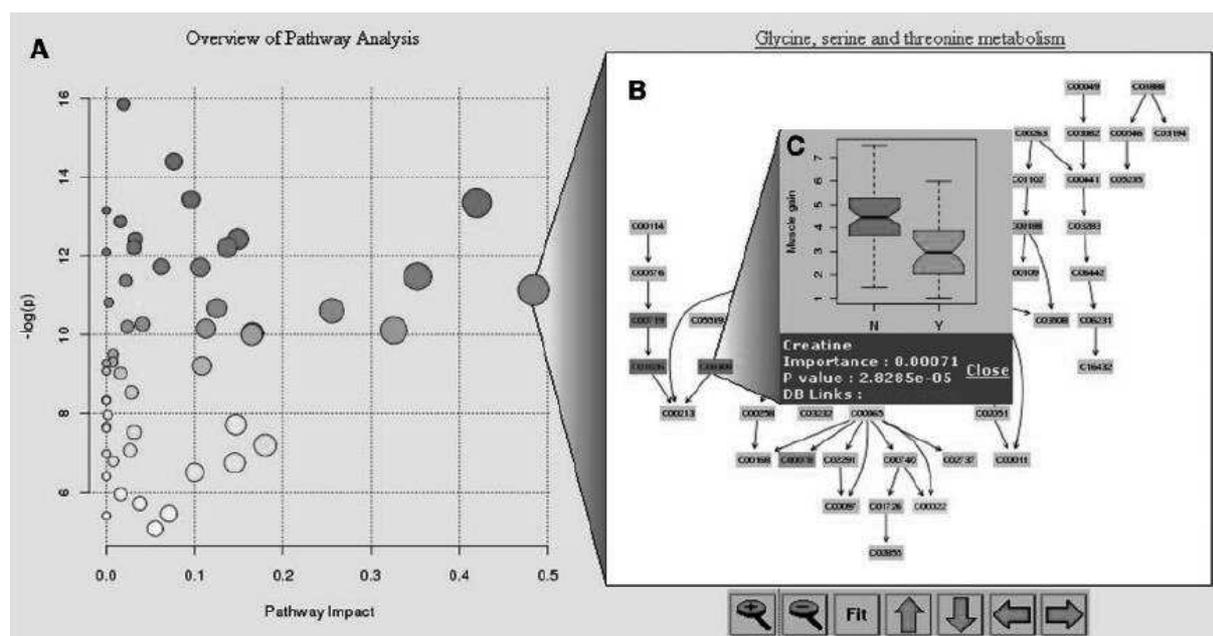
Le contexte biologique d'un métabolite se situe au sein d'un ensemble de réactions chimiques, catalysées par des enzymes, ayant pour objectif de synthétiser (i.e. anabolisme) ou dégrader (i.e. catabolisme) un métabolite, en passant par plusieurs métabolites intermédiaires servant eux-mêmes de substrat pour les réactions suivantes, cela s'appelle une voie métabolique. La régulation d'une voie métabolique s'inscrit dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, et dans un besoin fonctionnel du système biologique étudié. En effet, certaines voies métaboliques, ou groupe de métabolites, sont connues pour être impliquées dans certaines fonctions biologiques, comme par exemple les catécholamines (ex. dopamine, norépinephrine ; voie métabolique de la tyrosine) reconnues pour avoir un rôle dans les fonctions reproductives des mollusques bivalves (Fong et al., 1993; Lafont and Mathieu, 2007). Ainsi, replacer les métabolites d'intérêt dans leur contexte biochimique permettrait d'orienter la ou les fonctions biologiques susceptibles d'être perturbées par ces modifications métaboliques. La communauté scientifique a donc porté un grand intérêt à l'analyse

des voies métaboliques donnant naissance à plusieurs outils dédiés, tels que le propose la plateforme en ligne MetaboAnalyst 4.0 (Chong et al., 2019). Parmi de nombreux outils destinés au traitement et à l'analyse des données métabolomiques, MetaboAnalyst met à disposition l'outil MetPA (*Metabolomics Pathway Analysis*) pour l'analyse des voies métaboliques (Xia and Wishart, 2010). A partir d'une liste de métabolites d'intérêt, MetPA permet d'identifier les voies métaboliques les plus pertinentes impliquées dans une étude métabolomique donnée, et ce à l'aide d'une analyse de surreprésentation (*over-representation analysis*) ou bien d'une analyse d'enrichissement des voies (*pathway enrichment analysis*) qui peut être combinée à une analyse des caractéristiques topologiques des voies (*pathway topological analysis*). L'analyse de surreprésentation consiste à vérifier à partir de la liste des métabolites d'intérêt si le nombre de métabolite associé à une voie métabolique est dû au hasard ou non. Pour cette analyse, deux méthodes sont au choix : le test exact de Fisher ou le test hypergéométrique. Toutefois cette analyse considère seulement le nombre de métabolites par voie métabolique et n'intègre pas l'amplitude du changement de leur abondance entre deux conditions testées. Ainsi les métabolites dont l'amplitude est plus significative auront le même poids que des métabolites moins significatifs. Quand les concentrations des métabolites sont disponibles, il est donc préférable de se baser sur l'analyse d'enrichissement des voies. Cependant, utilisée seule, ni l'analyse de surreprésentation ni l'analyse d'enrichissement des voies ne prennent en compte la structure de la voie métabolique afin de déterminer quelles voies seraient les plus impliquées selon les conditions d'étude. En effet, une voie métabolique pouvant être considérée comme un réseau métabolique avec des métabolites (i.e. les nœuds) connectés les uns aux autres, combiner les analyses précédentes avec une analyse topologique des voies permet d'intégrer cette structure et donne davantage de poids à des métabolites centraux de ce réseau qu'à des métabolites plus marginaux. L'analyse topologique des voies propose deux mesures de la centralité d'un métabolite pour estimer son importance : la centralité intermédiaire (*betweenness centrality*, i.e. localisation d'un métabolite par rapport à la structure globale du réseau) ou le degré de centralité (*degree centrality*, i.e. connectivité locale directe entre un métabolite et ses voisins) (Figure 1.19).



**Figure 1.19 :** Réseau métabolique représenté par des nœuds (i.e. métabolites) reliés par des traits (i.e. connexion entre les métabolites). En rouge sont représentés les métabolites ayant un fort degré de centralité et en bleu le métabolite ayant une forte centralité intermédiaire.

L'analyse des voies métaboliques génère finalement différents graphiques représentés en Figure 1.20. La visualisation globale de l'analyse (Figure 1.20A) offre une hiérarchisation des voies métaboliques en fonction de leur significativité (axe des ordonnées ; la valeur de p est donnée par l'analyse de surreprésentation ou d'enrichissement des voies) et de leur impact (axe des abscisses ; calculé selon l'importance des métabolites mesurée lors de l'analyse topologique des voies). Ce graphique étant interactif, il est ensuite possible de découvrir la voie métabolique associée à chaque cercle, représentée en Figure 1.20B avec en couleur les différents métabolites présents dans la liste d'intérêt qui ont été associés à cette voie. Si des données quantitatives ont été jointes à l'analyse, il est également possible de visualiser les différences d'abondances entre deux conditions testées pour un métabolite sélectionné (Figure 1.20C). L'analyse des voies métaboliques semble être une bonne approche pour replacer les métabolites dans leur contexte biologique et ainsi déterminer qu'elles peuvent être les voies métaboliques les plus impactées vis-à-vis d'un stress donné.



**Figure 1.20** : Illustration des résultats issus de l'outil MetPA pour l'analyse des voies métaboliques. (A) Visualisation de l'analyse globale, (B) visualisation des voies métaboliques, (C) visualisation des métabolites (Xia and Wishart, 2010).

Cependant, le concept de voie métabolique présente actuellement trois limites majeures (Barupal et al., 2018). Premièrement, les bases de données renseignant sur les voies métaboliques sont incomplètes et se limitent à un nombre réduit d'espèces. Généralement, la moitié des métabolites détectés lors d'une analyse métabolomique ne possède pas de voie métabolique associée dans les bases de données existantes. Deuxièmement, les voies métaboliques sont définies manuellement et de cette manière varient à travers les différentes bases de données. En effet, certains outils d'interprétation utilisent par exemple des voies métaboliques référencées dans KEGG et incluent le chevauchement et le croisement de celles-ci, mais ne tiennent pas compte de la compartimentation cellulaire. D'autres bases de données telles que MetaCyc définissent quant à elles des voies métaboliques comme des séquences linéaires ininterrompues de réactions enzymatiques. Troisièmement, de nombreux métabolites sont souvent membres de plusieurs voies métaboliques, menant à des difficultés dans l'interprétation des données et également des biais dans les analyses statistiques d'enrichissement de voies métaboliques. Une alternative aux voies métaboliques pourrait être l'organisation des métabolites en classe chimique selon leur similarité structurale (i.e. *Chemical Ontology*) (Barupal et al., 2018; Moreno et al., 2015; Tsuyuzaki et al., 2015). La relation entre la similarité chimique des métabolites suppose que peu d'enzymes contrôlent ou interconvertissent ces composés, même si la nature exacte de ces enzymes n'est pas connue. Ainsi, la structuration des métabolites sous forme de classes chimiques présente deux avantages majeurs par rapport à la définition des voies métaboliques et des statistiques d'enrichissement des voies (Barupal et al., 2018). Premièrement, presque tous les métabolites peuvent être annotés dans une classe chimique même si

un métabolite n'est pas associé à une réaction enzymatique et donc à une voie métabolique. Deuxièmement, les classes peuvent être définies de telle sorte que chaque métabolite n'appartienne qu'à une seule classe, évitant de cette manière les chevauchements et les biais lors de l'analyse d'enrichissement. Récemment, des progrès ont été réalisés en combinant les ontologies des classes chimiques et la cartographie des similarités chimiques afin d'associer chaque métabolite à une classe chimique et ainsi révéler les classes de métabolites les plus impactées sous l'effet du stress étudié. Cette approche a été publiée sous le nom de ChemRICH (*Chemical Similarity Enrichment Analysis* ; Barupal and Fiehn, 2017).

Enfin, pour aider à l'interprétation biologique, les bases de données biochimiques (ex. KEGG, HMDB, etc.) fournissent un large éventail d'informations sur les métabolites qui inclut les réactions, les enzymes et les gènes impliqués, les sources pour les métabolites exogènes, leur propriété de signalisation, leur(s) voie(s) métabolique(s), leur classe chimique ainsi que leurs rôles biologiques connus. La littérature regorge également d'informations pertinentes sur les métabolites et est parfois plus adaptée lorsque l'organisme d'étude est une espèce non-modèle très peu référencée dans les bases de données. Le recours à des outils de *text mining* (i.e. exploration de textes) peut parfois être efficace pour extraire les informations recherchées dans la littérature et faire le lien entre des métabolites et des connaissances biologiques. Par exemple, un des outils de *text mining* existant dans le domaine médical est PolySearch2 (Liu et al., 2015) qui, en se basant sur différentes ressources scientifiques (ex. MEDLINE, PubMed, etc.) permet d'identifier les relations entre plusieurs entités biomédicales (ex. maladies, gènes, protéines, métabolites, voies métaboliques, organes, mode d'action d'un composé, etc.) et un terme associé (ex. Bisphénol A). Toutefois, ces outils, parfois trop spécifiques à un domaine, sont encore à développer et pourront à l'avenir apporter une aide précieuse dans l'interprétation des résultats métabolomiques (Barupal et al., 2018).

### 3.2.3. *Application de l'approche métabolomique à la problématique des produits pharmaceutiques dans l'environnement*

Au cours des dernières années, le nombre croissant d'études conduites sur les PP à travers la métabolomique révèle l'intérêt croissant pour cette approche. A condition que les techniques MS soient suffisamment sensibles, l'atout majeur de la métabolomique non-ciblée relève de sa capacité à (i) identifier les contaminants et leurs métabolites (i.e. xéno-métabolome ou exposome) dans les biofluides ou tissus d'organismes afin de caractériser leur exposition, et (ii) investiguer les effets par la mesure de composés endogènes (i.e. endo-métabolome) qui pourraient être impactés suite à une exposition chimique. Quand la métabolomique s'intéresse à la fois au xéno-métabolome (ou exposome) et à l'endo-métabolome, cette approche offre l'opportunité d'aborder la problématique

de la multi-contamination à travers des conditions d'exposition environnementales complexes et réalistes. C'est le cas notamment de l'étude réalisée par David et al. (2017), en identifiant par une approche non-ciblée des changements au niveau du xéno- et de l'endo-métabolome du poisson d'eau douce *Rutilus rutilus* (le gardon) exposé à un effluent de STEP durant 15 jours. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence l'accumulation de 54 contaminants et métabolites dans le plasma et différents tissus, tels que des pesticides (ex. fipronil), des antibactériens (ex. triclosan), des perturbateurs endocriniens (ex. bisphénol A), ainsi qu'une majorité de PP (n = 31). Parmi les PP, deux classes thérapeutiques sont principalement représentées avec les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, tels que la venlafaxine ou la fluoxétine, et les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le diclofénac, l'ibuprofène ou le naproxène. D'autres PP ont également été détectés comme la carbamazépine ou encore le nordazépam de la famille des benzodiazépines. Concernant l'étude de l'endo-métabolome, les auteurs ont mis en évidence une altération du métabolisme du tryptophane, de la sérotonine, des acides biliaires et des lipides, ainsi qu'une réduction des prostaglandines. En se basant sur les mécanismes d'action connus de certaines classes thérapeutiques, des liens pourraient être établis avec les effets observés. Par exemple, le principal mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens repose sur l'inhibition de l'activité enzymatique des cyclooxygénases, responsables de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, dont les abondances sont réduites dans cette étude. Au regard de l'implication de ces métabolites dans diverses fonctions physiologiques chez les poissons, les auteurs ont conclu sur la préoccupation environnementale que représentent les rejets de STEP ainsi que sur la pertinence de l'approche métabolomique pour traiter cette problématique.

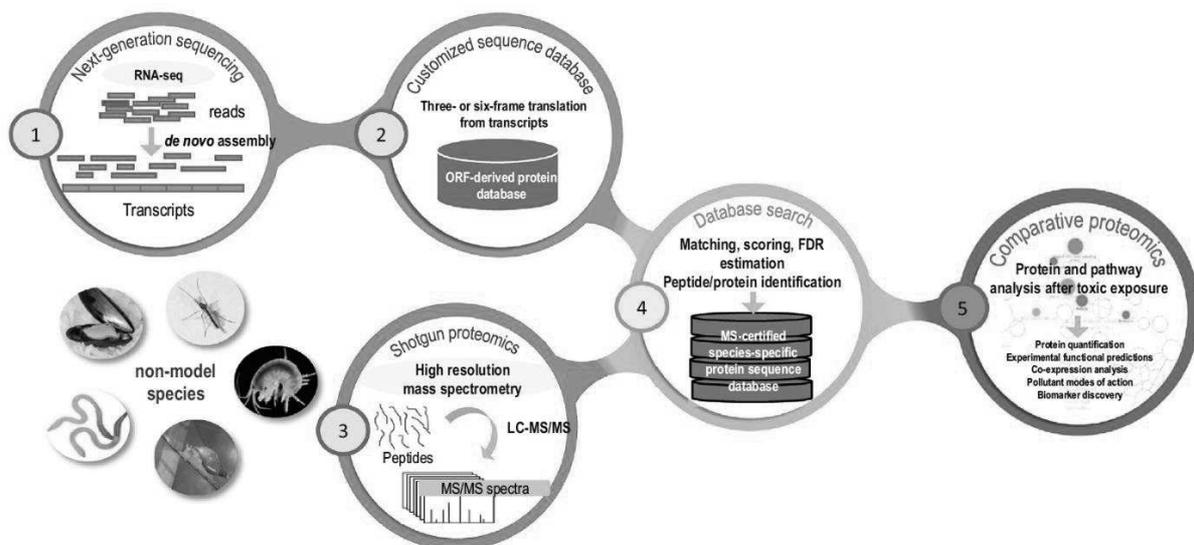
Afin de caractériser de manière plus approfondie l'exposition des organismes aux PP et ainsi mieux comprendre la relation de cause à effet, certaines études ont appliqué l'approche métabolomique pour élucider les métabolites issus des différentes voies de biotransformation des PP dans l'organisme. Bonnefille et al. (2017) ont par exemple investigué les produits de biotransformation du diclofénac dans les tissus de la moule *M. galloprovincialis*. En se basant sur une stratégie non-ciblée, ils ont ainsi pu mettre en évidence 13 métabolites du diclofénac dont 3 issus du métabolisme de phase I et 10 du métabolisme de phase II. Parmi ces métabolites, 5 d'entre eux ont été rapportés pour la première fois chez des organismes aquatiques.

### 3.3. Les bases de l'approche protéomique

Pour rappel, les écotoxicologues ont principalement pour objectif d'intégrer plusieurs niveaux d'information afin de (i) documenter les effets toxiques des contaminants, (ii) comprendre leurs mécanismes d'action, (iii) prédire l'impact d'une exposition à des contaminants, et (iv) développer des méthodes ou approches capables de fournir de telles informations. Comme la métabolomique, l'approche protéomique, ou plutôt écotoxicoprotéomique, est également capable, au niveau des protéines, d'apporter de précieuses informations pour répondre à ces objectifs. En effet, de nombreuses études ont démontré le potentiel de l'écotoxicoprotéomique pour décrypter les mécanismes et modes d'action variés des contaminants et découvrir de nouveaux biomarqueurs de toxicité chez des espèces représentatives d'un écosystème (Gouveia et al., 2019). La puissance de cette approche s'explique par l'évolution des techniques d'acquisition de données protéomiques plus performantes, dont la technique *Shotgun* est la plus répandue. Cette technique, permet l'analyse directe de l'ensemble du protéome *via* le couplage LC-MS/MS. Pour ce faire, les protéines sont au préalable extraites des échantillons d'intérêt (ex. biofluide, organe, tissu, etc.), suivi d'une étape de digestion par une enzyme spécifique de l'ensemble des protéines (ex. la trypsine) afin de libérer des peptides. Les peptides sont séparés par chromatographie liquide unidimensionnelle (1D) ou 2D, couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). Les peptides, une fois ionisés en sortie de chromatographie, sont injectés pour mesurer leur masse par un analyseur. La première mesure (MS1) consiste à évaluer la masse des ions parents, ou précurseurs des ions fragmentés, générant les ions fils dont la masse est ensuite mesurée (MS2). Ce mode d'acquisition, *data* dépendant (DDA), qui consiste en la mesure des ions fragmentés à partir d'un ion précurseur sélectionné, est très adapté à l'analyse des protéomes en *Shotgun*. L'interprétation des spectres MS et MS/MS générés est assurée par un moteur de recherche (ex. MASCOT search engine) qui explore la base de données de protéines digérées *in silico* par la trypsine pour trouver le peptide dont la masse est la plus proche de celle indiquée par le spectre. Une fois les peptides identifiés, ils sont utilisés pour identifier la protéine. Les bases de données sont déterminantes de la capacité d'interprétation des spectres. En effet, c'est la quantité et la qualité du contenu de ces bases de données qui seront déterminantes du taux d'attribution des spectres à un peptide. Il existe deux types de base de données (universelle et spécifique). Les bases de données protéiques du type NCBI, UniprotKB, SwissProt, neXtProt, qui regroupent l'ensemble des séquences des protéines obtenues à partir de toutes les données de la littérature. Swissprot est la base de données de référence car elle regroupe toutes les protéines non redondantes dont les informations et la qualité sont consolidées par l'ensemble des données produites par la communauté scientifique. Cette base de données contient les séquences des protéines mais aussi les informations sur leurs séquences, isoformes et variants associés, leur fonction, les processus

biologiques dans lesquels elles sont impliquées et leur localisation. Pour interpréter les spectres par des séquences peptidiques, et s'affranchir de toute erreur d'interprétation, l'utilisation d'un taux d'erreur à 1% est tolérée. Le taux d'erreur ou FDR 1% est calculé à partir de la recherche de peptides dans une base de données « leurre ou DECOY » qui indique le taux de faux positifs réels pour un échantillon donné et une base de données précise. La base de données DECOY correspond à la base de données de l'étude lue à l'envers, produisant des peptides aléatoires.

Le deuxième type de base de données n'est plus une base de données universelle de référence mais plutôt une base de données spécifique d'une espèce non modèle par exemple. Un organisme non modèle est un organisme pour lequel aucune information moléculaire liée au génome ou transcriptome n'est disponible pour une analyse par spectrométrie de masse. Pour ces organismes, les bases de données protéiques sont généralement enrichies par des séquences peptidiques homologues provenant d'organismes apparentés. Bien que cela permette l'identification des séquences peptidiques hautement conservées entre les espèces, les protéines spécifiques de l'organisme d'étude en revanche ne peuvent être identifiées. Pour y remédier, la protéogénomique a été proposée comme une alternative rapide et efficace au séquençage génomique, combinant les techniques de séquençage ARN (*RNAseq*; transcriptomique) et de protéomique *Shotgun* afin de découvrir les séquences protéiques spécifiques à l'espèce (Armengaud et al., 2014). Ainsi, la protéogénomique est appliquée en écotoxicoprotéomique, faisant appel à la transcriptomique pour la construction d'une base de données protéique propre à l'organisme étudié. Comme le montre la Figure 1.21, la traduction systématique de trois ou six cadres de lecture de l'ensemble des séquences du transcriptome de l'organisme étudié peut être utilisée pour créer une base de données protéique spécifique de l'espèce, pouvant ensuite être interrogée pour l'interprétation des spectres MS/MS.



**Figure 1.21** : Stratégie de l'approche protéogénomique en relation avec des organismes d'étude non-séquencés (Gouveia et al., 2019).

Concernant la dimension quantitative, la protéomique *Shotgun* est une approche dite *label-free*, c'est-à-dire qu'elle ne nécessite pas de marquage isotopique ou fluorescent. Deux stratégies *label-free* de quantification sont communément appliquées, celle des *spectral count* (i.e. comptage de spectre) et celle des chromatogrammes d'ions extraits (EIC ou XIC). La stratégie des *spectral count* part du principe que la concentration en protéine est corrélée au nombre de spectres MS/MS acquis pour l'ensemble des peptides associés à la protéine, tandis que la stratégie de l'EIC consiste à extraire et intégrer directement l'aire sous la courbe des ions précurseurs des peptides d'intérêt à partir du scan MS1. Une fois les protéines identifiées et leur abondance associée, la protéomique différentielle compare les empreintes protéiques d'un groupe d'individus exposés à une molécule avec un groupe non-exposé par exemple. Ainsi, les protéines sur- ou sous-régulées suite à l'exposition sont identifiées. Avec cette méthode, il devient possible de proposer de potentiels biomarqueurs qui seront par la suite validés par protéomique ciblée pour leur quantification absolue. Les outils d'analyses statistiques univariées et multivariées sont globalement similaires à ceux utilisés en métabolomique.

Pour donner un sens biologique à toutes ces données moléculaires, il est nécessaire d'identifier la fonction moléculaire des protéines, définir les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées et déterminer leur localisation. L'annotation fonctionnelle de ces protéines se fait par alignement de leur séquence protéique avec celles des bases de données précédemment citées (ex. NCBI, UniprotKB, etc.). L'annotation fonctionnelle d'une protéine est ainsi attribuée selon son taux d'homologie avec la séquence d'une protéine renseignée dans la base de données. Une fois la fonction de la protéine identifiée, il devient possible de structurer les protéines dans la nomenclature de *Gene Ontology* (GO). GO est une initiative bioinformatique développée pour unifier la représentation des gènes et produits géniques (ex. protéines) de toutes les espèces, avec pour but de générer un réseau de relation entre eux. Le projet GO décrit le rôle des protéines selon trois catégories fonctionnelles : composants cellulaires (i.e. emplacement subcellulaire et complexes macromoléculaires où se trouve le produit génique), fonctions moléculaires (i.e. action ou tâche spécifique et élémentaire exécutée par un produit génique ou des complexes assemblés de produits géniques) et processus biologiques (i.e. ensemble de transformations biochimiques accomplies par un ou plusieurs ensembles ordonnés de fonctions moléculaires). Comme en métabolomique, les données protéomiques peuvent être visualisées au sein de voies ou réseaux moléculaires.

### 3.4. Approches combinées : métabolomique et protéomique

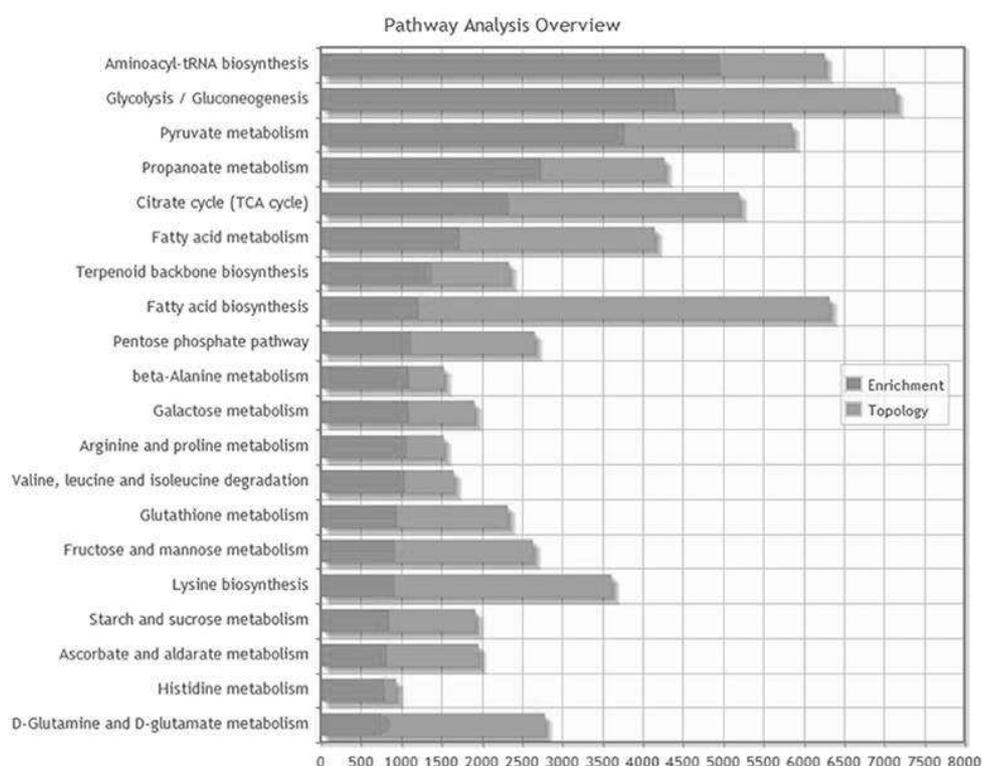
La combinaison de différentes approches –omiques est une manière pertinente d'examiner les interactions complexes entre les différents niveaux biologiques (ex. ADN, ARN, protéines, métabolites). En effet, la motivation majeure pour l'intégration de données issues de différents niveaux est d'améliorer la compréhension de la biologie sous-jacente d'un système afin de mieux prédire la réponse d'une variable, et de gagner en connaissances mécanistiques qui ne sont pas accessibles en ne mesurant qu'un seul niveau du système biologique (ex. métabolomique seule). Par exemple, les changements d'abondance d'un métabolite donné, mesurés par l'approche métabolomique, peuvent résulter de la régulation soit de ses voies de biosynthèse, soit de celles de dégradation, ce qui n'est pas toujours évident à déterminer. Les abondances des métabolites étant régulées par les activités enzymatiques, la mesure des abondances de ces dernières par l'approche protéomique peut ainsi révéler quel mécanisme de régulation est activé. La combinaison des deux approches métabolomique et protéomique est donc nécessaire afin de mieux comprendre les causes biochimiques des changements métaboliques observés et ainsi de mieux interpréter ces résultats. Cependant, l'analyse intégrative de différents types de données –omiques est challengée par des problématiques d'ordres biologiques et techniques, incluant notamment la complexité et l'hétérogénéité intrinsèque des données biologiques, qui nécessitent des méthodes d'analyses statistiques et informatiques appropriées. De nombreux outils ont ainsi été développés afin d'intégrer les données issues de différentes approches –omiques (Misra et al., 2019; Pinu et al., 2019). Parmi ces outils, deux approches générales émergent, (i) l'une utilisant les connaissances préalables des voies et réseaux métaboliques (i.e. intégration conceptuelle), et (ii) l'autre basée uniquement sur les données, sans utilisation de connaissances préalables (i.e. intégration statistique) (Wanichthanarak et al., 2015; Zhou et al., 2020).

#### 3.4.1. *Intégration conceptuelle*

##### 3.4.1.1. Intégration basée sur les voies métaboliques ou les ontologies

En se basant sur la connaissance des voies métaboliques, incluant les protéines impliquées dans les voies de synthèse ou de dégradation des métabolites, il est possible d'effectuer des analyses d'enrichissement et des analyses topologiques comme appliquées en métabolomique (cf. Section 3.2.2.8). Par exemple, Feng et al. (2018) ont réalisé une analyse d'enrichissement des voies conjointe à une analyse topologique en combinant les données protéomiques et métabolomiques, afin de faire ressortir les voies modifiées par leur facteur d'étude (Figure 1.22). L'analyse d'enrichissement montre les voies métaboliques qui ont été significativement enrichies par les protéines et métabolites identifiés au sein de ces voies. L'analyse topologique met en évidence quant à elle les voies

métaboliques dont les métabolites et protéines identifiés ont probablement un rôle important au vu de leur position plus ou moins centrale au sein de ces voies. Il est également possible d’obtenir le détail de chacune de ces voies métaboliques avec les protéines et métabolites impliqués. De la même manière, l’analyse d’enrichissement peut également s’appliquer avec les termes GO. En effet, les mêmes termes GO sont utilisés pour les métabolites, protéines et gènes, et servent donc à établir des liens entre les différentes données –omiques.



**Figure 1.22** : Vue d’ensemble de l’analyse conjointe d’enrichissement des voies avec l’analyse topologique combinant à la fois les protéines et métabolites identifiés (Feng et al., 2018).

Bien que le regroupement des données sur la base des voies métaboliques et des connaissances fonctionnelles disponibles est une étape d’analyse précieuse, les relations ou interactions entre les différentes molécules, souvent nécessaires à l’exécution des processus biologiques, ne sont pas considérées (Blum et al., 2018). Pour faire face à cette limite, l’analyse des données *via* les réseaux biologiques est capable, en revanche, d’intégrer ces interactions.

### 3.4.1.2. Intégration basée sur les réseaux biologiques

Cette approche considère le système biologique comme un réseau complexe d’entités moléculaires interconnectées les unes aux autres, telles que des gènes, des protéines et des métabolites. En ce sens, différentes couches –omiques peuvent être intégrées et visualisées au sein

d'un réseau biologique. La construction d'un tel réseau se base sur nos connaissances actuelles (ex. génétiques, interactions biochimiques), obtenues à partir de bases de données ou de précédentes études. Les réseaux biologiques les plus couramment utilisés sont les réseaux d'interaction protéine-protéine et les réseaux métaboliques dont de nombreuses bases de données publiques référencent les connaissances nécessaires à leur construction (ex. KEGG, Reactome, WikiPathways, MetaCyc, BIGG et Recon3D pour les réseaux métaboliques ; IntAct, BioGRID, MINT et InnateDB pour les réseaux d'interaction protéine-protéine) (Zhou et al., 2020). Une fois les connaissances en lien avec son système biologique rassemblées, il est donc possible de résumer ses données -omiques sous forme de réseaux. Quand ces derniers sont relativement petits, les chercheurs peuvent directement visualiser les relations afin d'avoir une vision globale et identifier facilement des sous-réseaux altérés par le stress étudié. En revanche, pour faire ressortir l'information pertinente au sein de grands réseaux, il est souvent nécessaire d'appliquer des algorithmes afin d'extraire les sous-réseaux les plus pertinents ou bien d'effectuer une analyse d'enrichissement pour identifier les fonctions impactées de manière significative (Zhou et al., 2020). Plusieurs applications sont ensuite disponibles pour la visualisation interactive des réseaux de données multi-omiques. Cytoscape (Shannon et al., 2003) est sans doute l'outil le plus utilisé pour l'analyse et la visualisation des réseaux biologiques, où les nœuds représentent les entités biologiques comme les métabolites, les protéines et les gènes, et les arrêtes représentent les interactions connues partagées entre des paires de nœuds (Zhou et al., 2020).

Néanmoins, les réseaux biologiques peuvent à eux seuls donner un aperçu limité en cas de connaissances insuffisantes des interactions entre gènes, protéines et métabolites, étant souvent étendues par l'extrapolation de relations ou corrélations empiriques entre différentes espèces (Wanichthanarak et al., 2015).

### *3.4.2. Intégration statistique*

L'intégration statistique vise à identifier des schémas globaux ou des signatures partagées dans de multiples ensembles de données -omiques en tirant des conclusions à partir des données elles-mêmes, sans nécessairement utiliser des connaissances biologiques préalables. Quelques-unes des méthodes d'intégration les plus courantes comprennent la corrélation univariée, la corrélation matricielle ou encore l'analyse en multibloc. Ces analyses basées sur la corrélation sont très utiles notamment pour l'intégration des données -omiques pour lesquelles des connaissances biochimiques sont manquantes (Wanichthanarak et al., 2015).

Les méthodes de corrélation univariée ont pour but d'identifier des relations entre des molécules individuelles d'un niveau -omique (ex. métabolomique) et celles d'un autre niveau

– omique (ex. protéomique). Ces méthodes univariées incluent par exemple la corrélation de Pearson (relations linéaires) ou la corrélation de Spearman (relations monotones) (Chong and Xia, 2017).

Les méthodes de corrélation matricielle cherchent à identifier les relations linéaires qui expliquent le mieux la corrélation et la variabilité à la fois au sein et entre les différents niveaux – omiques. Par exemple, le package *mixOmics* (Rohart et al., 2017) sur l’environnement R prend en charge ce type d’analyse à travers l’analyse de corrélation canonique (et ses dérivées), l’analyse en composante principale *sparse*, ou encore la *sparse* PLS-DA.

Enfin, il existe des méthodes multivariées telles que les analyses multibloc (ex. *multiblock* PLS, *consensus* OPLS-DA) où les niveaux – omiques sont traités comme des blocs différents dans le modèle, dont les données sont ensuite combinées (Boccard and Rutledge, 2013; Cavill et al., 2016).

Bien que très puissantes, ces méthodes ont tendance à produire des résultats très complexes, dont les processus biologiques sous-jacents sont parfois difficiles à expliquer (Zhou et al., 2020).

### 3.4.3. Le point en écotoxicologie

En écotoxicologie, comprendre le lien direct entre métabolites et protéines est indispensable afin de comprendre les causes biochimiques des métabolites sur- ou sous-modulés et déterminer le mécanisme d’action d’un contaminant sur le système biologique étudié. Actuellement, très peu d’études dans ce domaine combinent les approches métabolomiques et protéomiques. Concernant les études existantes, une majorité d’entre elles intègre à la fois les protéines et les métabolites différentiels au sein de voies métaboliques interconnectées les unes aux autres (i.e. intégration conceptuelle), tandis que les études restantes traitent séparément les deux approches sans proposer une intégration que ce soit conceptuelle ou statistique. Dans une étude multi-omiques, Sun et al. (2019) ont entre autre combiné les approches métabolomique et protéomique pour comprendre la réponse moléculaire du cerveau du poisson *Danio rerio* suite à une exposition à l’oxyde de graphène (nanomatériau). Afin d’étudier le lien entre protéines et métabolites, les auteurs ont replacé ces deux entités biologiques au sein de voies métaboliques interconnectées, grâce à l’outil d’analyse des voies de KEGG (Figure 1.23). Cette vue du métabolisme permet rapidement d’observer des modifications conjointes des niveaux de protéines et métabolites en relation avec le cycle de Krebs, le métabolisme des acides aminés et la biosynthèse des acides gras, reflétant une perturbation du métabolisme énergétique chez le poisson. De plus, l’observation de protéines sur- ou sous-régulées permet d’avancer de solides interprétations quant à la modulation des produits finaux du métabolisme, c’est-à-dire des métabolites. Par exemple, seul l’acide malique a été détecté parmi les métabolites intermédiaires du cycle de Krebs et est ainsi le seul métabolite modulé observé. Peu d’éléments appuieraient la perturbation du cycle de Krebs si la métabolomique se suffisait à elle-même. En

revanche, la protéomique vient renforcer l'interprétation de la sous-modulation de l'acide malique en révélant une sous-régulation de l'ensemble des enzymes catalysant les réactions du cycle de Krebs. Cet exemple témoigne bien de la complémentarité de ces deux approches.

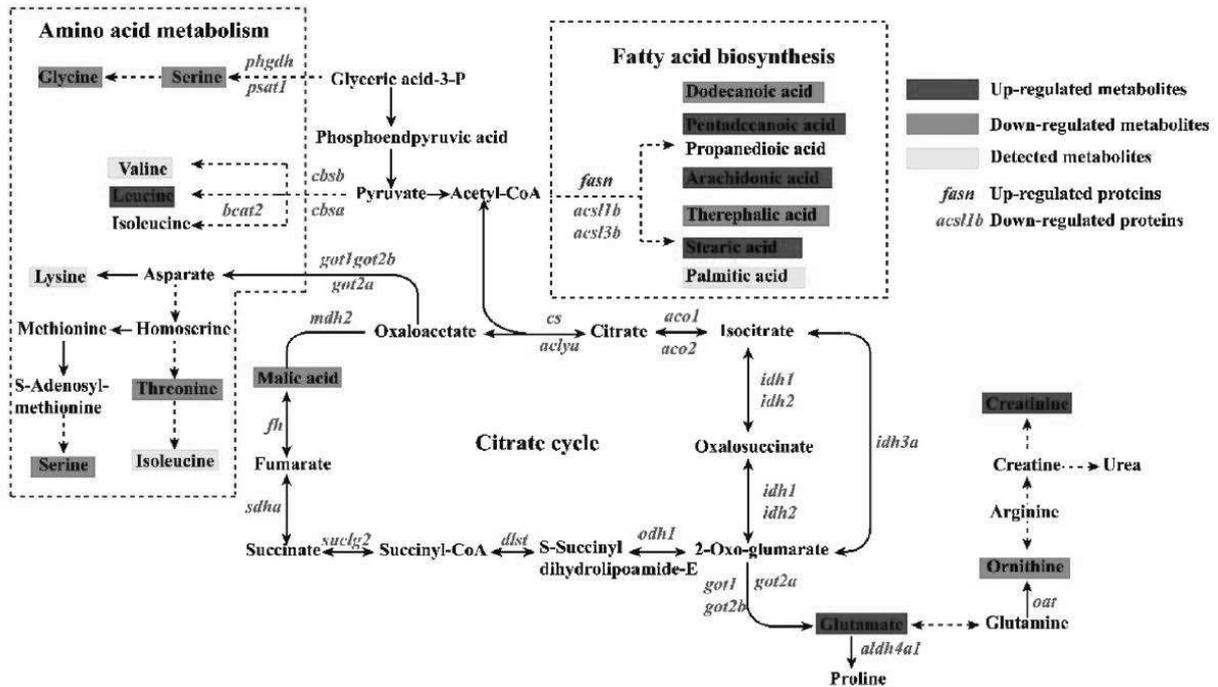


Figure 1.23 : Carte métabolique des protéines et métabolites impactés par l'exposition du poisson *Danio rerio* à l'oxyde de graphène (Sun et al., 2019).

Cependant, ces études se limitent à la seule utilisation des voies métaboliques et annotations fonctionnelles. Comme expliqué précédemment, ces dernières ne prennent pas en compte l'ensemble des interactions entre protéines et métabolites ainsi que les corrélations entre ces différentes entités. L'intégration de ces données *via* des réseaux moléculaires ou encore *via* des analyses statistiques pourrait pallier ces limites et ainsi apporter des informations supplémentaires dans les études écotoxicologiques.

#### 4. Organisme d'étude : *Mytilus galloprovincialis*, la moule méditerranéenne

##### 4.1. Ecologie & répartition

Le genre *Mytilus* (Règne : Animal, Embranchement : Mollusques, Classe : Bivalves, Sous-classe : Ptériomorphes, Ordre : Mytiloïdés, Famille : Mytilidés) regroupe moins de 10 espèces de moules. Elles vivent en milieu marin dans la zone de balancement des marées (zone intertidale) et dans les eaux peu profondes en se fixant solidement à des substrats durs par le biais des filaments du byssus. Ces organismes sessiles s'attachent également aux autres individus en formant des amas pour mieux se protéger des conditions extérieures, comme les vagues par exemple (Gosling, 2015). Grâce à leur grande tolérance à des variations du milieu en termes de salinité, température, dessiccation et d'oxygène, les espèces du genre *Mytilus* sont largement réparties sur l'ensemble du globe (Figure 1.24). Les plus représentées dans l'hémisphère nord sont *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) et *Mytilus trossulus* (Gould, 1850), rassemblées sous le nom générique de « moule bleue », toutes trois capables de se reproduire entre elles et former des hybrides.



**Figure 1.24** : Répartition géographique des espèces de moules du genre *Mytilus* (Gaitán-Espitia et al., 2016)

##### 4.2. Un genre d'intérêt, une espèce sentinelle

Trois grands intérêts peuvent être attribués au genre *Mytilus* : écologique, économique et scientifique. En effet, en plus d'être une ressource économique considérable, cultivées pour la consommation humaine, les moules conservent une place importante dans le réseau trophique puisqu'elles sont une source de nourriture principale pour de nombreux animaux tels que des oiseaux, des poissons, des crustacés et des étoiles de mer (Bennet-Clark, 1976; Gosling, 2015). De plus, les amas

de moules constituent un substrat propice pour de nombreux organismes qui y trouvent refuge, comme les balanes, des crustacés, des algues, certaines larves et des œufs (Bennet-Clark, 1976; Gosling, 2015). Depuis plusieurs décennies, les espèces *M. galloprovincialis* et *M. edulis* sont impliquées dans de nombreux programmes de biosurveillance, en tant qu'espèce sentinelle, comme le programme *Mussel Watch* initié aux Etats-Unis dans les années 70 (Goldberg et al., 1978) ou encore en France avec le Réseau d'Observation National (RNO) de l'IFREMER. Ces programmes ont pour objectif de faire un état des lieux de la pollution environnementale. Une espèce sentinelle doit être un bon candidat afin de collecter deux types d'informations : la présence de contaminants dans les tissus, qui renseigne sur la qualité du milieu et la biodisponibilité des molécules pour les organismes, et la présence de signes de toxicité, mesurés à l'aide de biomarqueurs notamment, qui renseigne sur le danger à être exposé à ce milieu. *M. galloprovincialis*, par exemple, rassemble les caractéristiques d'une bonne espèce sentinelle :

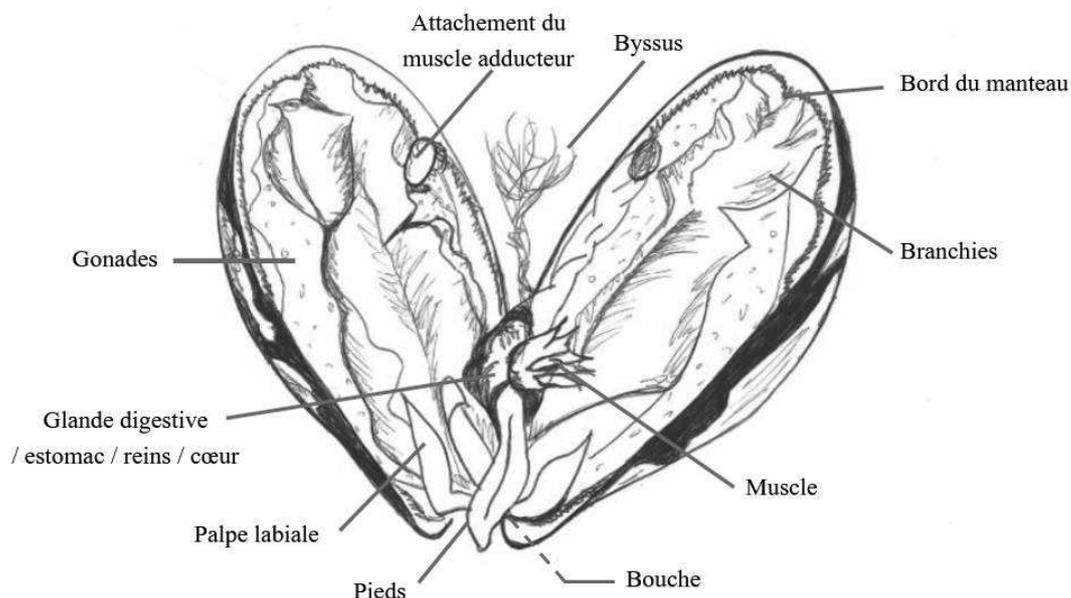
- Elles sont abondantes dans les communautés côtières et ont une large répartition géographique (Gaitán-Espitia et al., 2016).
- Ce sont des espèces sédentaires (sessiles) et renseignent donc sur la pollution d'un site donné. De plus, elles sont résistantes et peuvent être trouvées dans des sites fortement pollués (Boening, 1999; Regoli and Principato, 1995; Viarengo and Canesi, 1991).
- Elles filtrent de grands volumes d'eau pour se nourrir de particules en suspension et ont une grande capacité à bioaccumuler les contaminants dans leurs tissus, à des concentrations parfois bien plus élevées que dans le milieu (Cranford et al., 2011; Widdows et al., 2002).
- Les moules ont un cycle de vie relativement long et leur population est relativement stable, ce qui permet de fournir des données sur les changements temporels à court et à long terme des niveaux de contaminants (Kimbrough et al., 2008; Nakata et al., 2012; Sericano et al., 2014).
- Enfin, elles sont très faciles à collecter et peuvent être transplantées sur un site d'intérêt ou maintenues en conditions de laboratoire (Gorbi et al., 2008).

Pour bon nombre de ces raisons, la moule *M. galloprovincialis* a également été l'organisme d'étude d'un grand nombre d'expériences menées en conditions contrôlées de laboratoire, afin d'investiguer leur réponse à de nombreux facteurs stress, notamment ceux impliquant les contaminants. Des exemples ont pu être fournis tout au long de ce chapitre de synthèse

bibliographique. Pour bien comprendre leur réponse aux stress, il est indispensable au préalable d'en avoir étudié son anatomie et sa physiologie.

#### 4.3. Anatomie de la moule

Une description anatomique très détaillée des moules *Mytilus* spp. peut être visionnée en 3D sur le site *Marine Mammals Science Education* (<https://marine-mammals.com/fr/blog/3d-muscl-mytilus-edulis-anatomy/>). Les moules possèdent une coquille externe recouvrant leurs tissus internes. La coquille externe est composée de deux **valves** symétriques. Chaque valve a une forme allongée en « V », commençant à l'extrémité antérieure ou **umbo** et s'élargissant jusqu'à l'extrémité postérieure. Les valves sont principalement composées de carbonate de calcium, qui se développe à partir de l'umbo, générant plusieurs anneaux concentriques qui représentent l'âge de la moule. Les deux valves sont reliées par une **charnière** qui permet aux valves de se fermer et de se sceller parfaitement. Les valves sont reliées entre elles à l'extérieur par un **ligament**, et sont fermées par l'action de deux muscles (antérieur et postérieur). Les coquilles de moules remplissent diverses fonctions, notamment le soutien des tissus mous, la protection contre les prédateurs et la protection contre la dessiccation (Gosling, 2015). De la partie externe des moules (coquille) à la partie interne, on peut distinguer : le **manteau**, les **gonades**, les **branchies** et la **masse viscérale** (Figure 1.25).



**Figure 1.25 :** Structure anatomique du genre *Mytilus* spp. (modifiée de González Fernández, 2016)

Le manteau est constitué de deux lobes de tissu conjonctif qui enveloppent le reste des tissus mous en les maintenant liés à la coquille. De plus, il contient des **vaisseaux hémolymphatiques**, des **nerfs** et des **muscles** qui sont particulièrement bien développés dans le bord du manteau. Le manteau est le principal site de stockage des réserves énergétiques, mais il contient également la majeure partie

de la structure des gonades (Bayne, 2009; Gosling, 2015). Les gonades sont constituées de **tubules ramifiés** qui envahissent le manteau et se terminent par un **follicule génital** (Lubet, 1959). Près du manteau, les moules possèdent deux branchies, les principaux organes de respiration et de capture de la nourriture (Bayne, 2009). Les branchies sont des structures lamellaires en forme de "W" et sont formées par un feuillet direct qui descend de l'axe branchial et se replie au niveau du sillon marginal pour former le feuillet réfléchi avec son sillon dorsal. Ces feuillets comprennent des longs filaments à fine structure avec une orientation dorsale-ventrale. Ces feuillets ont de longs filaments avec des zones ciliées appelées cténidies, animés de mouvements ondulatoires incessants qui entretiennent la circulation de l'eau dans la cavité palléale. De plus, ces cténidies comportent trois zones ciliées qui diffèrent dans leur fonction biologique : les cils latéraux sont responsables du mouvement de l'eau à travers les ostiums (espace entre les cténidies), les cils frontaux transportent les particules filtrées vers les palpes labiaux puis la bouche, et les cils latéro-frontaux sont responsables de soustraire les particules alimentaires du flux d'eau (Babarro et al., 2000). Les branchies sont responsables de l'échange gazeux en raison de leur grande surface et de leur riche approvisionnement en hémolymphe. En ce sens, de grands volumes d'eau passent par la branchie à la surface de laquelle a lieu l'extraction de l'oxygène qui se diffuse dans l'hémolymphe (Gosling, 2015).

Au sein de la masse viscérale, se distinguent : le **ped**, la **glande byssogène** et les **systèmes digestif** et **circulatoire**, ainsi que les **palpes labiaux**. Le système digestif comprend la **bouche**, l'**œsophage**, l'**estomac**, la **glande digestive** et l'**anus**. La bouche est une structure ciliée qui mène à un œsophage étroit et cilié. L'estomac est de grande taille et est complètement intégré dans la glande digestive. Un bâtonnet gélatineux semi-transparent, appelé **style cristallin**, prend naissance à l'extrémité de l'estomac et participe au mélange du contenu stomacal et à la sécrétion d'enzymes pour faciliter la digestion (Bayne, 2009). En plus du rôle de la digestion des aliments, la glande digestive des moules sert de site de stockage des réserves métaboliques, qui constituent une source d'énergie utilisée pendant la gamétogenèse et pendant les périodes de stress physiologique (Thompson and Bayne, 1974). Les particules rejetées de l'estomac et les déchets de la glande digestive passent dans un long intestin enroulé et sont transformés en boulettes fécales avant d'être rejetées par l'anus (Gosling, 2015). Le pied, permettant à la moule de se déplacer, est une structure musculaire longue et très mobile située à proximité de la glande byssogène. À l'aide de cette glande, les moules sécrètent un ensemble de filaments, appelé le **byssus**, pour se fixer à un substrat, qu'elles peuvent ensuite rompre pour se déplacer (Bayne, 2009).

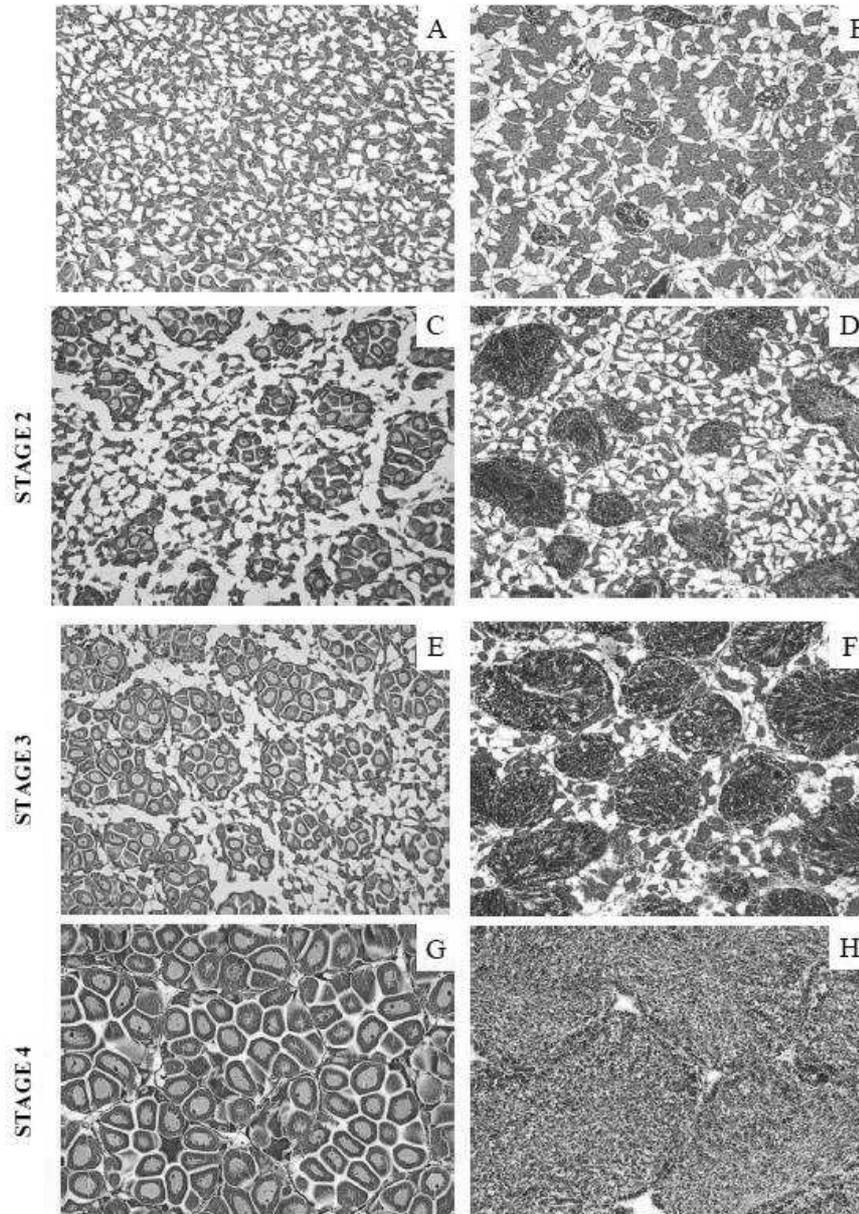
Enfin, le système circulatoire de la moule est constitué de l'**hémolymphe**, qui circule librement à travers les différents tissus, et d'un **cœur** dorsal (Braby and Somero, 2006). Le cœur est constitué

d'un seul **ventricule musculaire** et de deux **oreillettes** latérales. L'hémolymphe s'écoule des oreillettes dans le ventricule, qui se contracte pour conduire l'hémolymphe dans un seul vaisseau, l'**aorte antérieure**. L'aorte antérieure se divise en un réseau artériel qui alimente le manteau, l'estomac, l'intestin, les muscles de la coquille et le pied (Gosling, 2015). Le système artériel, qualifié de diffus, aboutit à des espaces libres sans paroi propre : les **lacunes**. Ainsi l'hémolymphe n'est plus canalisée dans des vaisseaux individualisés et baigne directement les tissus. Elle circule vers les reins pour purification puis gagne les branchies où elle s'enrichit en oxygène avant de retourner aux oreillettes du cœur. L'hémolymphe assure de nombreuses fonctions physiologiques comme les échanges des gaz dissous, l'osmorégulation, la distribution des nutriments, l'élimination des déchets, et le système de défense immunitaire. Elle joue aussi le rôle de fluide squelettique, assurant la rigidité de certains organes comme les palpes labiaux, le pied ou encore le bord de manteau (Gosling, 2015).

#### 4.4. Reproduction & cycle de vie

A l'exception de quelques cas rares d'hermaphrodisme (1 ‰), la moule *M. galloprovincialis* est une espèce gonochorique sans dimorphisme sexuel et la plupart des populations contiennent un nombre égal en mâles et femelles. En général, un cycle de reproduction annuel a été décrit chez *Mytilus* spp., qui comprend une période de gamétogénèse (fin automne jusqu'au début du printemps), suivie d'une seule voire de plusieurs pontes (libération des gamètes), et qui se termine par une période de reconstitution des gonades (Gosling, 2015). Cependant, ce schéma général diffère grandement au sein d'une même population, dépendant de facteurs internes i.e. génétique, endocrinien et métabolique, ou externes i.e. climatique, hydrologique et nutritionnel (Seed, 1969; Suárez et al., 2005).

Selon Kim et al. (2006), il est possible de distinguer 5 stades reproductifs à l'aide de coupes histologiques des gonades (Figure 1.26) : Stade 0, gonade inactive ; Stade 1, la gamétogénèse a commencé bien qu'aucun gamète mûr ne soit encore visible ; Stade 2, des gamètes mûrs sont présents et les gonies occupent environ un tiers de la section ; Stade 3, la gonade a augmenté en superficie pour atteindre environ la moitié de l'état de pleine maturité ; Stade 4, gonade pleinement mûre.



**Figure 1.26** : Section histologique des gonades de moules mâles et femelles, colorées avec hématoxyline/éosine. (A) Stade 0 ; (B) Stade 1 ; (C) Stade 2, femelle ; (D) Stade 2, mâle ; (E) Stade 3, femelle ; (F) Stade 3, mâle ; (G) Stade 4, femelle ; (H) Stade 4, mâle (González-Fernández et al., 2016).

Parallèlement, le cycle reproductif de la moule est accompagné d'un cycle annuel de stockage des réserves énergétiques. Durant le cycle reproductif annuel, des nutriments sont stockés quand la nourriture est abondante et l'activité des gonades est minimale. Par la suite, ces réserves sont utilisées pour satisfaire la demande énergétique de la gamétogénèse. Le manteau est le principal site de stockage des réserves énergétiques notamment en glucides, lipides et protéines (Fearman et al., 2009). La plupart des études sur le stockage des réserves énergétiques montrent un changement au niveau de la masse des tissus principalement causé par des changements des niveaux de glucides, ou de glycogène, la principale source des glucides. Les cycles saisonniers de stockage et d'utilisation des

réserves de glycogène sont étroitement liés au cycle de reproduction et dépendent fortement de l'approvisionnement en nourriture et de la température (Fearman et al., 2009; Gabbott and Bayne, 1973).

A la fin de la gamétogenèse, les gamètes (ovules et spermatozoïdes) sont matures et prêts à être libérés dans la colonne d'eau. Ce relargage nécessite l'intervention d'un stimulus exogène (ex. chimique ou thermique) provoquant ainsi la ponte des femelles ou l'éjaculation des mâles. Les fluctuations de la température (hausse et baisse) ont été rapportées comme stimulant la ponte chez *Mytilus* spp. (Gosling, 2015). Tandis que la gamétogénèse s'effectue dans les gonades, la fécondation en revanche est externe et se produit dans le milieu. Après fécondation, s'ensuit une succession de divisions cellulaires. Le cycle de vie de la moule reprend avec une phase embryonnaire, suivie d'une phase larvaire, d'une métamorphose puis d'une phase juvénile.

#### ***Phase embryonnaire :***

La fécondation est marquée par l'expulsion de deux globules polaires (suite à la méiose), qui initie le début de la division cellulaire (50 à 80 minutes après la fécondation). Chez les moules, la segmentation est de type spirale. Après environ 6 heures, des cils apparaissent et l'embryon commence à se déplacer en tournant doucement.

#### ***Phase larvaire :***

- *Larve trochophore* : Premier stade larvaire, il aboutit environ vingt-quatre heures après la fécondation. La larve trochophore est couverte de cils apicaux et possède un flagellum, lui permettant de se déplacer autour d'elle-même. Une glande coquillière se développe à partir de l'ectoderme dorsal et sécrète une petite coquille transparente.

- *Stade véligère* : Appelée aussi Prodissoconque 1 ou Stade Larve-D (Bayne, 1965) car la larve prend l'aspect d'un « D » bien formé. Ce stade est atteint 48 heures après la fécondation. La larve a augmenté de taille et son flagellum est encore visible. L'intestin commence à fonctionner marquant ainsi le passage de la phase endotrophe (utilisation des réserves vitellines), à la phase exotrophe (capture de nourriture). La formation de la coquille est terminée le troisième jour. La larve-D se déplace grâce à un vélum (organe locomoteur pourvu de cils vibratiles).

- *Stade umbo-veligère* : Une deuxième coquille apparaît (Prodissoconque 2) et l'umbo (ou crochet : la zone de la coquille située près de la charnière) commence à se former généralement vers le dixième jour lorsque la larve atteint environ 240 µm. Elle mène une vie pélagique active grâce à son

vélum qui est bien développé. Une tache oculaire photosensible est formée au bout de 17 - 18 jours après la fécondation.

- *Stade pédivéligère* : Ce stade (Carriker, 1961) est abouti à 22-24 jours après la fécondation. Il est caractérisé par la présence d'un pied bien développé et fonctionnel. La larve devient plus lourde et mesure 270-300  $\mu\text{m}$  ce qui la rend moins active mais elle peut mener une vie pélagique en nageant au-dessus du substrat ou benthique en rampant sur celui-ci.

### ***Métamorphose :***

Le développement larvaire d'une moule peut durer jusqu'à 35 jours en fonction des conditions environnementales, avant de trouver un substrat naturel pour se fixer et passer de la vie pélagique à la vie benthique. La fixation sur le support peut comporter plusieurs tentatives. Une fois le substrat définitif trouvé, la larve se métamorphose et il s'agit d'un phénomène irréversible. La métamorphose est caractérisée par la dégénérescence du vélum, l'apparition des ébauches branchiales, l'allongement du pied. La coquille devient oblique avec un crochet bien visible et commence à s'organiser. Il s'agit du stade de larve plantigrade (Carriker, 1961) qui mesure 480 à 500  $\mu\text{m}$ .

### ***Phase juvénile :***

C'est le stade des naissains qui ressemble à l'adulte avec tous les organes en place à l'exception de la gonade. Lorsqu'elle atteint 1 à 2 mm, la jeune moule se détache de son substrat d'origine (ex : algue). Les moules sont encore capables de se déplacer pour trouver un substrat favorable pour se fixer dans des fissures protégées. Chez les moules, la maturité sexuelle intervient au bout d'un an.

## 4.5. Physiologie de la moule

### 4.5.1. *Alimentation & métabolisme*

*Mytilus* spp. sont des organismes filtreurs et microphages. Ils se servent de leurs branchies pour recueillir le seston (i.e. ensemble des particules organiques et inorganiques en suspension) nécessaire à son alimentation et l'oxygène nécessaire à sa respiration. Vivant dans des eaux littorales et sub-littorales peu profondes caractérisées par une grande variabilité spatio-temporelle en termes de quantité et qualité de la nourriture (Newell, 1989), les moules ont développé plusieurs mécanismes pour sélectionner les particules de haute qualité afin d'optimiser l'apport énergétique (Ward and Shumway, 2004). Comme mentionné plus tôt, les branchies sont les principaux organes responsables de la filtration. Leurs nombreux cils vibratiles entretiennent un flux d'eau permanent conduisant les particules vers les palpes labiaux et finalement vers la bouche, où elles sont ingérées. La sélection de

particules peut prendre place à différents stades du processus d'alimentation : une rétention sélective dans les branchies, un tri pré-ingestion dans les palpes et un tri post-ingestion dans la glande digestive (Ward and Shumway, 2004).

Les particules qui passent par les branchies sont retenues par les surfaces frontales des cténidies agissant comme un tamis. La capture des particules est principalement dépendante de la taille des particules (Defossez and Hawkins, 1997; Lehane and Davenport, 2006), bien que d'autres facteurs qualitatifs ont également été considérés : la forme (Bougrier et al., 1997), la valeur nutritive (Prins et al., 1991), ou la composition chimique de la surface des particules (Yahel et al., 2009). Des observations sur la filtration des moules indiquent qu'elles peuvent filtrer une gamme de particules de 2 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre (Bayne, 2009), avec une meilleure efficacité de rétention pour les particules comprises entre 30 et 35  $\mu\text{m}$  (Strohmeier et al., 2012). Le processus de filtration peut être influencé par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques (Ackerman and Nishizaki, 2004; Filgueira et al., 2009; Iglesias et al., 1996; Velasco and Navarro, 2003). L'un de ces facteurs est la taille de la moule. Une relation inverse a été décrite entre le taux de filtration et la taille ou le poids corporel de la moule (Thompson and Bayne, 1974), qui est relié à une réduction du ratio [aire des branchies]/[poids sec de la moule]. De la même manière, il a été décrit que les bivalves sont capables de réguler leur taux de filtration selon la concentration des particules disponibles dans la colonne afin d'optimiser l'énergie allouée à cette activité (Albentosa et al., 1996; Hawkins et al., 2001; Velasco and Navarro, 2003; Winter, 1978).

Une fois les particules capturées par les branchies, elles sont transportées vers les palpes labiaux où a lieu une sélection pré-ingestion. Le tri des particules conduit à la formation de pseudofeces, rejetés dans la cavité palléale et éliminés par le courant exhalant (Ward and Shumway, 2004). A ce niveau, il a été montré que les palpes peuvent discriminer les particules organiques des particules inorganiques, rejetant ces dernières *via* les pseudofeces (Lucas, 2008) et augmentant la fraction organique de la nourriture ingérée. Ainsi, la production de pseudofeces est un mécanisme qui tend à améliorer l'apport énergétique, en maintenant une ingestion maximale constante et en sélectionnant des particules de haute qualité (Iglesias et al., 1996).

Les particules acceptées par les palpes labiaux passent ensuite par le système digestif. Deux types de digestion peuvent être différenciés : la digestion extracellulaire, qui prend place dans l'estomac grâce à la rotation du style cristallin et les enzymes qu'il libère, et la digestion intracellulaire, qui intervient immédiatement après l'estomac dans la glande digestive. La matière non absorbée par la glande digestive et l'estomac forme des boulettes fécales, directement rejetées par l'anus (Gosling, 2015). Le mécanisme de sélection post-ingestion mentionné ci-dessus se produit dans l'estomac après

l'action des enzymes extracellulaires et l'action mécanique du style cristallin sur les aliments ingérés. À ce stade, les particules les plus nutritives (particules organiques plus légères) sont dirigées vers les canaux de la glande digestive, tandis que la matière inorganique plus dense passe dans l'intestin et est incorporée dans les boulettes fécales (Ward and Shumway, 2004). Plus précisément, chez la moule *M. galloprovincialis*, l'épithélium de la glande digestive comprend de nombreux tubules principalement composés de cellules basophiles et digestives. Le premier type cellulaire possède un réticulum endoplasmique rugueux très développé et de nombreux granules sécrétoires, et joue donc un rôle important dans la production et la sécrétion d'enzymes. En revanche, les cellules digestives sont constituées d'un système vacuolaire lysosomale endocytique bien développé, avec une forte activité phagocytaire et lysosomale, et sont donc responsables des processus de digestion intracellulaire (Dimitriadis et al., 2004).

Dans un contexte écotoxicologique, il est important de noter que les cellules des glandes digestives sont la principale interface environnementale pour l'absorption des contaminants, en particulier ceux associés aux particules en suspension filtrées dans l'eau de mer (Moore and Allen, 2002). Les lysosomes des cellules digestives ne sont pas seulement responsables de la digestion intracellulaire mais sont également considérés comme les organites principaux de séquestration et de détoxification des métaux et des contaminants organiques (Marigómez et al., 2002; Pagano et al., 2017). Cela fait de la glande digestive un organe d'alerte précoce potentiel pour les effets biologiques néfastes des xénobiotiques (Faggio et al., 2018).

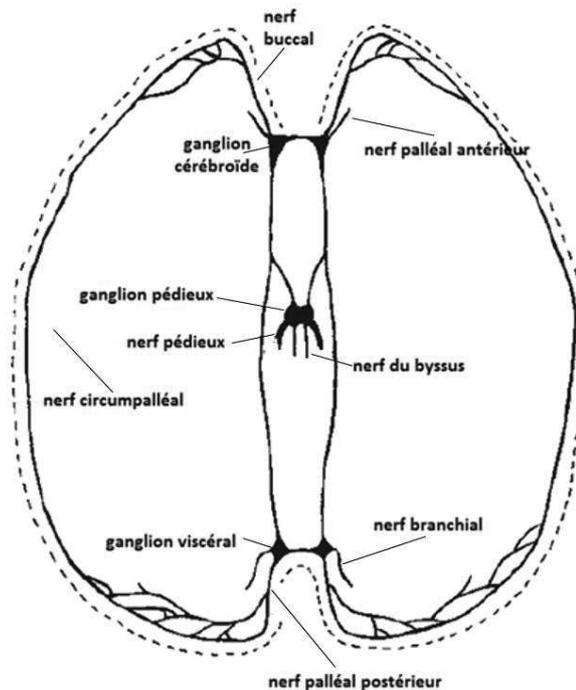
#### 4.5.2. *Système nerveux & récepteurs sensoriels*

Le système nerveux des bivalves est fondamentalement simple : bilatéralement symétrique, il est constitué de trois paires de ganglions, possédant chacun plusieurs nerfs (Figure 1.27). Ainsi, pour chaque ganglion, deux paires de nerfs s'étendent vers la partie postérieure de l'animal (Gosling, 2015). Une paire s'étend directement jusqu'au ganglion viscéral, situé à la surface du muscle adducteur postérieur. La deuxième paire s'étend en arrière et en ventral jusqu'aux ganglions pédieux du pied. Les ganglions cérébroïdes innervent les palpes, le muscle adducteur antérieur et une partie du manteau. Les ganglions pédieux contrôlent le pied, et les ganglions viscéraux, quant à eux, contrôlent une plus grande surface telle que les branchies, le cœur, les reins, le tractus digestif, les gonades, le muscle adducteur postérieur, le manteau et les siphons.

Les ganglions ont également un rôle neurosécrétoire majeur chez les bivalves. Plusieurs types de cellules neurosécrétoires ont été identifiées chez les moules et la plupart d'entre elles sont situées dans les ganglions cérébroïdes (Gosling, 2015). Ces neurones vont alors libérer des peptides ainsi que

des neurohormones dans le système circulatoire. Certaines de ces molécules ont été caractérisées chez *Mytilus* spp., dont leurs rôles seraient associés à la régulation de la croissance, à la reproduction (gamétogénèse et ponte), et au métabolisme du glycogène (Gosling, 2015).

Au cours de l'évolution des bivalves, avec la perte d'une tête distincte, la plupart des organes sensoriels se sont retirés de l'extrémité antérieure et sont venus se placer au bord du manteau. Les récepteurs sensoriels sont situés sur des cellules épithéliales sensibles au toucher. Un léger stimulus tactile provoque une contraction locale de la musculature du manteau. Il s'agit d'une action réflexe qui n'est pas sous le contrôle du système nerveux central. Un stimulus fort produit une rétraction coordonnée de l'ensemble de l'animal dans sa coquille. Ce type de contraction plus général et clairement adaptatif, est sous le contrôle du ganglion viscéral. Des cellules chémoréceptrices sont probablement présentes sur les tentacules. Différents types de récepteurs sensoriels ont été découverts chez les bivalves, mais très peu de ces découvertes concernent le genre *Mytilus*.



**Figure 1.27** : Représentation schématique du système nerveux chez les moules *Mytilus* spp. (modifiée de Zwann and Mathieu, 1992)

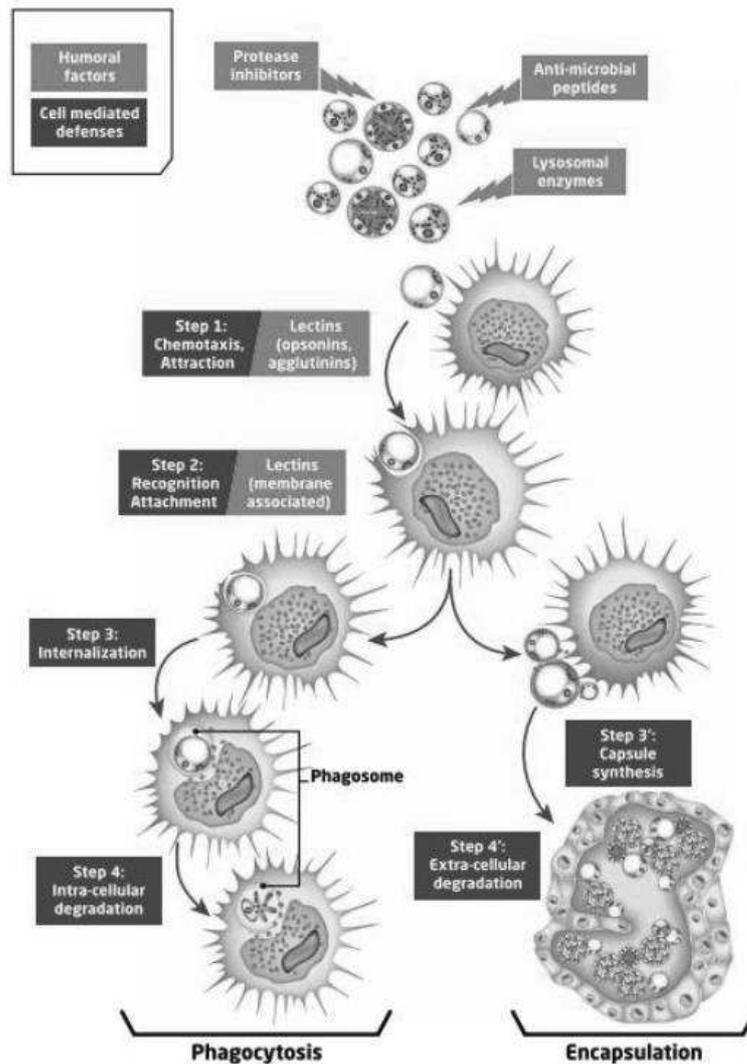
#### 4.5.3. Système immunitaire

Comme tous les invertébrés, la moule méditerranéenne est dotée exclusivement d'un système immunitaire inné (non-spécifique). Ce dernier s'opère à travers l'hémolymphe, véhiculant dans l'ensemble de l'organisme des cellules actives du système immunitaire, appelées hémocytes, ainsi qu'une grande variété d'effecteurs moléculaires. Différents mécanismes cellulaires sont impliqués pour protéger l'organisme contre des entités étrangères (ex. bactéries, levures, protozoaire, algues, contaminants, toxines, etc.) comme la phagocytose, l'encapsulation et les réactions cytotoxiques dont

la libération des enzymes lysosomales, des peptides antimicrobiens et des radicaux libres. L'hémolymphe contient également un faible taux de protéines incluant des lectines solubles, des enzymes lysosomales et une variété de peptides antimicrobiens. Grâce au système circulatoire ouvert des bivalves, les hémocytes peuvent être diffusés dans les tissus afin d'infiltrer le site d'infection. Elles participent également à diverses fonctions biologiques et physiologiques telles que le transport des particules nutritives (Beninger et al., 2003) et la réparation de la coquille (Johnstone et al., 2008 ; Mount et al., 2004). Le Foll et al. (2010) ont distingué trois groupes cellulaires chez *M. edulis* à partir de critères cytochimiques, morphologiques et fonctionnels: des petits basophiles semi-granulés, des hyalinocytes agranulés et des éosinophiles granulocytes plus complexes.

La fonction principale des hémocytes est d'assurer une protection contre les agents infectieux. En effet ces cellules actives du système immunitaire sont capables de reconnaître et d'éliminer les microbes à travers plusieurs activités cellulaires. Elles agissent en coordination avec les facteurs humoraux circulant dans l'hémolymphe, i.e. biomolécules sérologiquement actives (ex. opsonines, lysines, agglutines, facteurs antimicrobiens, lysozymes) et enzymes d'origine lysosomale (ex. aminopeptidases,  $\beta$ -glucuronidases, phosphatase acide, phosphatase alcaline,  $\alpha$ -mannosidase, estérases et peroxydases), pour répondre aux attaques des corps étrangers (Canesi et al., 2002). La phagocytose est le centre de la réponse immunitaire chez les vertébrés comme chez les invertébrés, toutefois d'autres mécanismes cellulaires peuvent intervenir comme l'encapsulation et l'apoptose. Chez *M. galloprovincialis*, les deux types d'hémocytes hyalinocytes et granulocytes peuvent avoir un rôle phagocytaire, cependant beaucoup plus actif pour les granulocytes, également présents en plus grande quantité (Cajaraville and Pal, 1995; Carballal et al., 1997).

La phagocytose consiste à reconnaître et ingérer les entités étrangères pouvant affecter l'organisme afin de les détruire. Ce processus peut être divisé en quatre étapes selon Soudant et al., (2013), comme illustré en Figure 1.28. L'entrée des particules étrangères dans l'organisme stimule une réponse chimiotactique des hémocytes qui a pour effet de les attirer vers la cible. Cette étape est suivie par la reconnaissance et l'adhésion du corps étranger. La reconnaissance s'effectue grâce à des motifs exprimés à la surface des pathogènes, appelés PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), capables d'être reconnus par des récepteurs phagocytaires. Cela permet ensuite leur internalisation ou leur endocytose. Une fois piégée, la cible se retrouve dans le phagosome (fusionné avec le lysosome) où elle subira une phase de digestion par les enzymes hydrolytiques libérées par le lysosome. En plus de ces activités hydrolytiques, les hémocytes ont la capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que de l'oxyde nitrique, très efficace pour détruire les microorganismes.



**Figure 1.28** : Représentation schématique des différentes étapes de la phagocytose et de l'encapsulation (rectangles bleus) ainsi que de l'intervention des facteurs humoraux (rectangles oranges) (Soudant et al., 2013).

L'encapsulation est la deuxième réponse immunitaire majeure des invertébrés contre les microorganismes et plus particulièrement contre les protozoaires. Selon Cheng et Rifkin (1970), ce mécanisme observé chez les bivalves représente une tentative de phagocytose interrompue lorsque la cible est trop grande pour être ingérée. La réponse est initiée par la libération des molécules d'adhésion par les granulocytes suite à la reconnaissance des particules cibles (Johansson et al., 1995). Ceci engendre le regroupement des cellules hémocytaires qui s'organisent en couches concentriques afin de former une capsule fine autour du parasite (Figure 1.28). La structure est mélanisée à travers l'activité de l'enzyme phénoloxydase fixée à la surface des hémocytes (Söderhäll et al., 1994) et le parasite est détruit grâce aux enzymes lysosomales et les ROS générées par les hémocytes (Soudant et al., 2013).

#### 4.6. Qu'en est-il du génome, protéome et métabolome de la moule méditerranéenne ?

Depuis l'apparition des techniques de séquençage haut débit (*high-throughput sequencing* ou *next-generation sequencing*), plusieurs recherches ont bénéficié de l'accessibilité de ces techniques à des coûts plus abordables pour étudier plus en profondeur les bases moléculaires impliquées dans le développement, le système immunitaire ainsi que dans la réponse de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* aux stress environnementaux. Figueras et al. (2019) ont ainsi répertorié l'ensemble de ces travaux, comptabilisant quatre séquençages du génome et une vingtaine de séquençages du transcriptome de cette espèce. Ces ressources permettent actuellement une vision encore partielle du génome et du transcriptome de la moule méditerranéenne du fait des profondeurs de séquençage et des taux d'erreurs plus ou moins variables selon les techniques employées. De plus, Figueras et al. (2019) ont démontré en séquençant le génome de 14 individus une diversité extrêmement importante des séquences entre les individus. Cette complexité du génome montre à quel point il est encore nécessaire d'enrichir les connaissances à ce sujet pour permettre une annotation plus complète du génome et du transcriptome. Ces connaissances permettront par la suite une meilleure identification des protéines spécifiques à cet organisme.

Malgré l'intérêt commercial et scientifique pour les moules marines comme produit alimentaire et organisme d'étude dans les programmes de biosurveillance, par exemple, le nombre de ressources métabolomiques disponibles dans des bases de données publiques pour ces organismes est très limité. Ainsi, la recherche des métabolites au sein de *M. galloprovincialis* s'effectue principalement sur la base des connaissances renseignées pour les organismes les plus étudiés, invertébrés comme vertébrés. Ces extrapolations sont possibles, dans une certaine mesure, par le simple fait que le métabolisme primaire soit en partie assez bien conservé entre les organismes (Peregrín-Alvarez et al., 2009). Par exemple, une des voies métaboliques fondamentales ainsi que ces composés biochimiques comme le cycle de Krebs (la respiration cellulaire) et les acides carboxyliques intermédiaires qu'il comprend, se retrouvent chez tous les êtres vivants (Smith and Morowitz, 2004). En revanche, chaque groupe taxonomique est susceptible de présenter des spécificités au sein de leurs voies métaboliques et métabolites. Ces spécificités sont néanmoins très peu renseignées chez les bivalves marins. N'existant pas de bases de données spécifiques à ces organismes, les connaissances sur leur métabolome sont actuellement très éparpillées dans la littérature. Par exemple, Cappello et al. (2018) ont quantifié une quarantaine de métabolites (relatifs au métabolisme énergétique, aux acides aminés, osmolytes, neurotransmetteurs, nucleotides, alkaloides, etc.) au sein de différents tissus de *M. galloprovincialis* afin de déterminer leur niveau basal. D'autres auteurs se sont plutôt focalisés sur l'identification de lipides, acides gras et

hormones sexuelles chez *M. galloprovincialis* (Dernekbası et al., 2015; Martínez-Pita et al., 2012). Plus largement, l'ensemble des études métabolomiques conduites sur *M. galloprovincialis* favorise une meilleure connaissance de son métabolome dès lors que des métabolites sont identifiés pour la première fois chez cet organisme.

#### 4.7. Conclusion

Les organismes aquatiques modèles (ex. la daphnie, le poisson zèbre) sont des organismes dont la variabilité biologique est relativement maîtrisée. L'étude de leur génome et des processus biologiques sous-jacents est extrêmement approfondie, ce qui permet de limiter la variabilité inter-individuelle lors d'expérimentations et d'accéder plus directement à la variabilité associée au facteur étudié. La moule *M. galloprovincialis* est, quant à elle, une espèce sauvage avec, comme mentionnée dans cette partie, une grande variabilité et diversité biologique intra-spécifique acquise au cours de son évolution. Cet aspect rend l'étude de ces organismes plus difficile, notamment lors de l'étude de leur réponse biologique à une exposition qui peut différer d'un individu à l'autre et ainsi être masquée par cette variabilité. Cependant, la pertinence écologique de cet organisme sauvage, tout comme ses caractéristiques d'espèce sentinelle utiles pour des programmes de biosurveillance (cf. Section 4.2.), ont fait de *M. galloprovincialis* l'organisme de choix pour ces travaux de thèse. Afin d'intégrer la variabilité biologique de cette espèce, certains facteurs biologiques ont été pris en compte dans le design expérimental (ex. taille, sexe) des études présentées.

## 5. Objectifs de thèse & Stratégie de recherche

L'analyse bibliographique a mis en évidence que l'investigation des effets des PP sur les organismes marins s'appuie principalement sur des approches conventionnelles visant à étudier les effets sur la croissance, la reproduction, le comportement, la survie, ou encore à mesurer des réponses biochimiques (ex. biomarqueurs du stress oxydant par la mesure des activités enzymatiques). Bien qu'essentielles pour connaître l'impact d'une molécule à l'échelle de la cellule, de l'individu, voire de la population, ces approches renseignent peu en revanche sur les mécanismes d'action mis en œuvre lors de telles expositions. Comprendre les mécanismes d'action des PP à l'échelle moléculaire et cellulaire sur des organismes non cibles est indispensable pour expliquer dans un premier temps les effets toxiques observés par les approches conventionnelles, et à l'avenir mettre en place de nouveaux marqueurs précoces de ces effets avant qu'ils ne deviennent détectables à des niveaux d'organisation biologique plus élevés, un risque pour les populations ou les communautés.

Par ailleurs, un PP est susceptible de causer un large spectre d'effets sur les organismes impliquant différents mécanismes d'action. Actuellement, les approches classiques, qui se traduisent notamment par la mesure de biomarqueurs conventionnels, ne sont pas suffisamment représentatives de la diversité de mécanismes d'action et d'effets des PP présents dans l'environnement. De plus, de nombreuses études se basent uniquement sur les mécanismes d'action connus des PP chez l'être humain ou les vertébrés afin d'orienter les effets recherchés sur des organismes non cibles. Cependant, chez ces derniers, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces molécules peuvent être différentes et entraîner des effets insoupçonnés. Il convient donc d'appliquer des approches innovantes, capables d'étudier sans hypothèse préalable l'ensemble des mécanismes d'action et des effets potentiels des PP sur les organismes. Comme détaillé dans la synthèse bibliographique, les approches -omiques offrent cette possibilité en ayant une vision intégrative de l'ensemble des modifications moléculaires (information mécanistique) suite à de telles expositions.

L'étude de la bibliographie nous a également montré que certains PP comme la CBZ (carbamazépine) sont préoccupants pour l'environnement en raison de leur persistance dans le milieu marin et leur biodisponibilité pour les organismes. La CBZ a révélé de nombreux effets néfastes chez les organismes marins, allant du stress oxydant à des effets neurotoxiques, cytotoxiques, génotoxiques, embryotoxiques, pouvant même affecter le système endocrinien ou le comportement des individus. Cependant, les mécanismes d'action de la CBZ conduisant à de tels effets sont encore peu connus, notamment chez les invertébrés. Pour comprendre davantage les mécanismes d'action de la CBZ chez les invertébrés, il est également important d'étudier au préalable sa toxicocinétique, comme par exemple sa métabolisation dans l'organisme. Actuellement, seuls les métabolites de la CBZ

connus chez l'être humain sont ciblés chez les invertébrés, sans que des métabolites issus de voies de biotransformation spécifiques de l'organisme soient investigués.

Cette thèse a pour **premier objectif** d'étudier la relation de cause à effet entre une exposition à la CBZ et la modulation du métabolome et du protéome chez *Mytilus galloprovincialis*, à travers une exposition en conditions contrôlées de laboratoire (Chapitre 2). Dans un premier temps, ce travail a consisté à investiguer les voies de biotransformation de la CBZ chez *M. galloprovincialis*. Dans un second temps, les effets de la CBZ sur la moule ont été étudiés en combinant les approches métabolomiques et protéogénomiques. La stratégie statistique développée pour intégrer ces deux approches devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes d'action de la CBZ, susceptibles de faire le lien vers des effets néfastes déjà rapportés dans la littérature ou pas encore observés.

Recontextualiser la problématique des PP dans des conditions d'exposition plus réalistes nécessite de considérer la contamination du milieu dans son intégralité. Les effluents de STEP, voie d'entrée principale des PP et d'autres contaminants dans le milieu marin, constituent des échantillons environnementaux représentatifs de la contamination susceptible d'être présente dans le milieu. Ces échantillons sont donc de bons candidats pour étudier les effets de la contamination dans sa globalité sur les organismes marins.

Le **deuxième objectif** de cette thèse a donc pour ambition d'étudier les liens de causalité entre un mélange complexe de contaminants, représenté par un effluent de STEP, et l'espèce sentinelle *M. galloprovincialis* (Chapitre 3). Pour atteindre cet objectif, une exposition des moules à un extrait d'effluent de STEP, dilué au 1/20<sup>ème</sup> pour tendre vers une dilution environnementale, a été menée en conditions contrôlées de laboratoire. L'étude des liens de cause à effet implique dans un premier temps la caractérisation chimique de l'exposition. Dans un second temps, les effets sur l'organisme ont été investigués de manière non-ciblée à travers l'approche métabolomique. Une étude approfondie de la littérature a servi de base d'interprétation des données métabolomiques afin d'établir des liens entre les modulations métaboliques observées, les potentiels effets néfastes sur l'organisme que ces modulations pourraient causer et les contaminants détectés dans l'effluent de STEP.

En métabolomique environnementale, l'étude de la relation de cause à effet peut s'avérer difficile quand plusieurs facteurs intrinsèques à l'organisme (ex. âge, sexe, état physiologique, etc.) et à son environnement (ex. température, pH, nourriture, etc.) entrent en jeu dans la réponse biologique de celui-ci à un ou plusieurs contaminants, d'autant plus quand l'organisme d'étude est une espèce sauvage. L'ensemble de ces facteurs est donc susceptible d'induire une variabilité des données métabolomiques mesurées que seul le facteur « exposition » ne pourrait entièrement expliquer

(considérant la variabilité analytique et expérimentateur comme contrôlée). Pour cette raison, l'un des challenges de cette approche est de mieux relier la variabilité mesurée à ses différentes origines, afin de correctement interpréter la réponse biologique au(x) contaminant(s). Cette difficulté pourrait être surmontée grâce à une exposition expérimentale bien designée associée à une analyse statistique adaptée. Lors de la mise en place du design expérimental pour l'étude des effets d'un effluent de STEP sur la moule méditerranéenne, le facteur sexe sera également pris en compte. En se basant sur les données de la littérature, nous émettons l'hypothèse qu'une partie de la réponse biologique des moules à l'exposition sera dépendante du sexe de l'organisme.

Le **troisième objectif** consistera à étudier l'implication du sexe de la moule *M. galloprovincialis* dans la réponse biologique suite à l'exposition à l'effluent de STEP, comme une preuve de concept (Chapitre 4). Pour y répondre, une approche statistique multivariée sera appliquée pour la première fois en métabolomique environnementale à notre jeu de données. Cette approche, intitulée *Analyse of variance Multiblock Orthogonal Partial Least Square* (ANOVA Multiblock OPLS ; AMOPLS), permettra la décomposition de la variabilité de nos données selon les deux facteurs *sexe* et *exposition* ainsi que de l'interaction entre ces deux facteurs. Ainsi, il sera possible de quantifier la part de chaque facteur et de leur interaction sur la variabilité totale mesurée, mais également d'identifier les métabolites contribuant le plus à l'effet de ces facteurs sur la variabilité des données métabolomiques.

Enfin, mon travail de thèse vise également à participer à l'enrichissement des connaissances sur le métabolome de la moule méditerranéenne et par la même occasion à faciliter l'interprétation des données métabolomiques acquises sur cet organisme. Cela se traduit par le développement de la banque de standards analytiques interne au laboratoire (spécifique à l'endo-métabolome de la moule) et à l'élaboration d'une base de données de spectres MS/MS (logiciel TraceFinder 4.1, Thermo Fisher Scientific).

# Chapitre 2

---

Evaluation des effets de la carbamazépine  
sur la moule méditerranéenne *Mytilus*  
*galloprovincialis* : étude du métabolome et  
du protéome

## 1. Introduction et présentation de l'article n°1

En raison de sa forte consommation, estimée à 1214 tonnes en 2015 (Oldenkamp et al. 2019), et sa faible (bio)dégradation dans les STEP ainsi que dans l'environnement, la CBZ fait partie des PP les plus fréquemment détectés dans les systèmes aquatiques. Le milieu marin, réceptacle terminal des eaux continentales mais également en proie à des rejets directs de STEP, n'est donc pas épargné par la présence des PP y compris de la CBZ. Désignée comme un marqueur anthropique de la pollution urbaine (Clara et al., 2004; Hai et al., 2018), la CBZ est principalement présente dans la phase aqueuse, ce qui la rend biodisponible pour les organismes marins et plus particulièrement pour les organismes filtreurs comme les mollusques bivalves (Ternes et al., 2004; Zhang et al., 2008). Par conséquent, la CBZ et certains de ces métabolites ont déjà été détectés dans les tissus de bivalves marins (Alvarez-Muñoz et al., 2015a; Martínez Bueno et al., 2013; McEneff et al., 2013; Wille et al., 2011). Ces études attestent donc de l'exposition de ces organismes à la CBZ et de leur capacité à la métaboliser. Néanmoins, les études relatives à la métabolisation de la CBZ chez les bivalves se base uniquement sur la connaissance des métabolites formés chez l'être humain sans rechercher des voies de biotransformations spécifiques à ces organismes. Connaître les produits de biotransformation de la CBZ chez les bivalves permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action et effets sur l'organisme. Bien que l'impact de la CBZ soit difficile à évaluer directement dans le milieu marin, plusieurs études conduites en laboratoire ont révélé des effets néfastes sur des invertébrés à l'échelle individuelle et sub-individuelle (Chapitre 1, Section 2.1.3). Cependant, peu d'étude se sont intéressées aux mécanismes sous-jacents afin d'expliquer les effets de la CBZ observés chez les invertébrés. Investiguer les mécanismes d'action d'un contaminant est essentiel pour comprendre quels évènements moléculaires sont initiateurs des effets déclenchés à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (référence au concept de l'AOP), et ainsi pouvoir développer des outils de biosurveillance (ex. biomarqueurs) capables de prédire et anticiper ces effets à des stades précoces. En ayant une vision intégrative de l'ensemble des modifications moléculaires suite à une exposition, les -omiques sont des approches pertinentes pour la collecte d'informations mécanistiques sur les contaminants, sans hypothèse préalable, permettant de faire le lien vers des effets néfastes au niveau de l'organisme.

Cet article a pour but de répondre au premier objectif défini dans cette thèse, à savoir, l'étude de la relation de cause à effet entre une exposition à la CBZ et les effets potentiels sur la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*. Au cours de l'exposition des organismes en conditions contrôlées de laboratoire, deux doses ont été investiguées, l'une faible pour se placer dans des conditions environnementales pertinentes, et l'autre plus élevée afin d'obtenir d'autres résultats non perceptibles à plus faible concentration. Dans un premier temps, ce travail a consisté à investiguer les

voies de biotransformation de la CBZ chez *M. galloprovincialis*. Pour cela, une analyse ciblée des métabolites connus de la CBZ a été réalisée dans les tissus de la moule, complétée par une analyse non ciblée, *via* l'approche métabolomique, afin d'identifier d'éventuelles métabolites de la CBZ encore non décrits dans la littérature. Dans un second temps, les mécanismes d'action et effets de la CBZ sur la moule ont été investigués en combinant les analyses métabolomiques et protéogénomiques, réalisées à partir des mêmes échantillons. La discussion des résultats a tout d'abord été rédigée en français et sera traduite en anglais avant la soumission du manuscrit à une revue à comité de lecture internationale.

Ce travail a nécessité une collaboration avec Christine Almunia, du Laboratoire « Technologies Innovantes pour la Détection et le Diagnostic » (Li2D, CEA-Marcoule), pour l'analyse protéogénomique, ainsi qu'avec Julien Bocard, biostatisticien à l'Institut des Sciences Pharmaceutiques à l'Université de Genève, afin de proposer une méthode statistique permettant l'intégration des résultats issus des deux approches -omiques.

L'analyse protéogénomique requiert au préalable les données de séquençage des ARNm de l'organisme étudié. En effet, le génome ou le transcriptome de *Mytilus galloprovincialis* étant partiellement disponible, il est nécessaire d'obtenir un transcriptome de référence de l'organisme pour la construction d'une base de données des protéines spécifiques de l'espèce. Cette base de données protéiques pourra par la suite servir à l'interprétation des spectres MS/MS générés lors de l'analyse protéomique. Pour ce faire, j'ai réalisé l'extraction d'ARNm à partir de trois organes de *M. galloprovincialis* (glande digestive, branchies et manteau) à l'aide du kit RNeasy® Midi Kit (Qiagen) complétée par un traitement DNase-free (DNA-free™ Kit, Ambion). L'extraction a été faite au sein du laboratoire de Biochimie et Toxicologie des Substances Actives (Institut National Universitaire Champollion, Albi), ayant une expertise en biologie moléculaire. Le séquençage des ARNm extraits à partir des trois organes par la technique Illumina (la plus fiable, avec un très faible taux d'erreur) a ensuite été effectué par la plateforme GeT-PlaGe (GenoToul-Plateforme Génomique, INRAE, Toulouse) *via* l'instrument Novaseq6000, pour l'obtention d'une librairie par organe. Les données transcriptomique ont ensuite été assemblées sur Trinity dans l'interface Galaxy.

2. Article n°1

**An integrated metabolomics and proteogenomics approach reveal metabolic alterations following by carbamazepine exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis***

Thibaut Dumas <sup>1</sup>, Christine Almunia <sup>2</sup>, Julien Boccard <sup>3,4</sup>, Elena Gomez <sup>1</sup>, Geoffroy Duporté <sup>1</sup>, Hélène Fenet <sup>1</sup> and Frédérique Courant <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, University of Montpellier, Montpellier 34093, France;

<sup>2</sup> Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRAE, Bagnols-sur-Cèze 30207, France;

<sup>3</sup> School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, Geneva 1211, Switzerland;

<sup>4</sup> Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland, University of Geneva, Geneva 1211, Switzerland

\* Corresponding author at: HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, University of Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier, France. E-mail address: [frederique.courant@umontpellier.fr](mailto:frederique.courant@umontpellier.fr)

*In preparation*

2.1. Introduction

The antiepileptic carbamazepine (CBZ) has been proposed as a possible anthropogenic marker in the aquatic systems (Clara et al., 2004; Hai et al., 2018) and could be a threat for the aquatic organisms (Fabbri and Franzellitti, 2016; Mezzelani et al., 2018; Prichard and Granek, 2016). Because of its low removal in wastewater treatment plants (WWTPs; Margot et al., 2015) and its low (bio)degradation in the environment (Benotti and Brownawell, 2009; Calisto et al., 2011), CBZ is among the most frequent pharmaceutical active compounds (PhACs) detected in the environment. Marine ecosystems constitute the terminal receptacle of (contaminated) continental water and are also prey to direct discharges from WWTPs. Therefore, those ecosystems are not spared by the occurrence of PhACs, including CBZ. The latter is not easily adsorbed by sediments or solid particles and consequently remains mainly in the aqueous phase (Ternes et al., 2004; Zhang et al., 2008), at concentrations ranging from < 1 to 1410 ng/L in marine ecosystems (Arpin-Pont et al., 2016; McEneff et al., 2014). In this way, CBZ is bioavailable to numerous marine organisms, especially filter feeders such as bivalve molluscs. Indeed, CBZ have already been detected in tissues of marine bivalves despite its low bioaccumulation potential (Alvarez-Muñoz et al., 2015; Martínez Bueno et al., 2013; McEneff et al., 2014; Wille et al., 2011). Furthermore, some studies demonstrated the capacity of marine mussels to metabolise the CBZ. Boillot et al. (2015) highlighted the formation of carbamazepine-10,11-epoxide and acridine in tissues of the mussel *Mytilus galloprovincialis* after a CBZ exposure, while Abdelhafidh et al. (2018) only observed the 3-hydroxy-carbamazepine in tissues of another marine bivalve *Scrobicularia plana*. However, only metabolites of CBZ known in humans were targeted in invertebrates, without

investigating metabolites from other biotransformation pathways that could be specific to the organism.

The exposure of marine bivalves to CBZ may lead to adverse effects. Several experimental studies revealed individual and sub-individual effects at different life stages (adult, larval). The most common effect reported was the induction of oxidative stress at environmental concentrations (Almeida et al., 2020, 2014). CBZ also exerts various effects on marine bivalves such as cytotoxicity and immunotoxicity (Aguirre-Martínez et al., 2013; Almeida et al., 2018; Brandts et al., 2018; Martin-Díaz et al., 2009; Tsiaka et al., 2013), genotoxicity (Aguirre-Martínez et al., 2015; Brandts et al., 2018), embryotoxicity (Franzellitti et al., 2019), and can affect the behaviour (Nkoom et al., 2019) as well as the endocrine system (Chen et al., 2019b, 2019a; Oropesa et al., 2016; Tian et al., 2019) of marine crustaceans. Nevertheless, little is known about mechanisms of action of CBZ on invertebrates. Only few mechanisms known in humans were investigated and confirmed in marine bivalves such as its interaction with the adenylyl cyclase system and the consequent reduction of intracellular cAMP levels in *M. galloprovincialis* (Martin-Díaz et al., 2009), its potential agonist role of GABA receptors in the clam *Ruditapes philippinarum* (Almeida et al., 2018), and its interaction with voltage-dependent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels in *S. plana* (Freitas et al., 2016). However, highlighted mechanisms of action are not able to fully explain the adverse effects reported in the literature. Differences in CBZ pharmacokinetics and pharmacodynamics between humans and bivalves are expected to occur. Hence, it is necessary to apply non-hypothesis driven approaches to further investigate mechanisms of action and toxicological effects of CBZ on marine bivalves.

The combination of different omics approaches (i.e., multi-omics) is a relevant way to examine the complex interactions between different biomolecules (e.g. DNA, RNA, proteins, metabolites). Indeed, the major motivation for integrating data from different levels (e.g. transcriptome, proteome, metabolome) is to improve the understanding of the underlying biological system in order to better predict the response of a variable, and to gain further insight into mechanistic knowledge that is not accessible by measuring only one level of the biological system (e.g. metabolomics alone) (Canzler et al., 2020). According to previous ecotoxicological studies, an integrated metabolomics and proteomics approach is suitable to unravel mechanisms of action and toxicological effects of contaminants, without preconceived assumptions about the expected results (Chen et al., 2018; Ji et al., 2016; Sun et al., 2019). However, the integrative analysis of different types of omics data is challenged by biological and technical issues, including in particular the complexity and intrinsic heterogeneity of biological data. For this purpose, different strategies can be considered for data fusion, depending on the structure and the nature of the associated data (Steinmetz et al., 1999). When observations constitute the common mode, i.e. the same samples are characterized by several blocks of variables potentially

of different types and numbers, low/mid/high levels approaches can be implemented (Boccard and Rudaz, 2014).

On the one hand, high-level data fusion involves the individual investigation of each data block and model outputs are then collected to offer a global picture of the data collection. It can provide an increased prediction accuracy, e.g. using a majority vote, but does not allow potential links between signals from the different sources to be explicitly considered. On the other hand, low-level data fusion involves the combination of data at the signal level, e.g. by concatenation of the data. However, this strategy can drastically increase the number of parameters to estimate in the model, worsening the curse of dimensionality and potentially leading to model instability. Because it allows relationships between multiple blocks to be efficiently evaluated, multiblock modelling provides a very efficient approach to carry out low-level data fusion.

Mid-level strategies offer an interesting compromise between these two extremes, by starting with an individual evaluation of the different blocks to extract meaningful information before integrating the processed data in a second step. The first step of mid-level data fusion can be carried out using dimensionality reduction based on latent variable models (e.g. Principal Component Analysis) or variable selection methods. The latter aim to select the most informative subset of variables from each block, therefore usually increasing prediction accuracy. It is also possible to implement an uninformative variable elimination strategy at this stage. Processed data blocks can then be used as input of a multiblock model.

A mid-level data integration strategy involving MCUVE-PLS and consensus OPLS-DA was implemented in this work. By focusing on a relevant subset of data in each block, it offers the advantage of improved prediction performance compared to the whole dataset, while allowing potential links between blocks to be efficiently considered and an objective evaluation of the most relevant data block(s) to be gained using multiblock modelling.

Hence, this integrated metabolomics and proteogenomics strategy was applied to investigate the mechanisms of action and potential toxicological effects of CBZ on the Mediterranean mussel *M. galloprovincialis*. For this purpose, a 3-day exposure at a low (80 ng/L) and higher (8 µg/L) dose was performed in controlled laboratory conditions. In addition, metabolisation of CBZ in mussel tissues was studied based on a targeted analysis of known human CBZ metabolites, complemented by a non-targeted analysis, using the metabolomic approach, in order to identify possible CBZ metabolites not yet described in the literature.

## 2.2. Materials & Methods

### 2.2.1. Chemicals

Pesticide analytical-grade solvents (methanol, dichloromethane and ethanol) and LC/MS grade solvents (water, acetonitrile, formic acid 99%) were obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Ultrapure water was generated by a Simplicity UV system from Millipore (Bedford, MA, USA) with a specific resistance of 18.2 M $\Omega$ .cm at 25°C. Analytical pure standards used for identification of endogenous metabolites at level one (Sumner et al., 2007) were purchased from the following suppliers: Sigma-Aldrich (now part of Merck), Santa Cruz Biotechnology, Toronto Research Chemicals and LGC Standards. Analytical pure standards used for xenobiotics quantification concern carbamazepine (CBZ, Sigma-Aldrich); trans-10,11-dihydroxy-10,11-dihydro-carbamazepine (trans-CBZ, Toronto Research Chemicals); cis-10,11-dihydroxy-10,11-dihydro-carbamazepine (cis-CBZ, Toronto Research Chemicals); carbamazepine-10,11-epoxide (EPOXY); 2-hydroxycarbamazepine (2OH-CBZ, Toronto Research Chemicals); 3-hydroxycarbamazepine (3OH-CBZ); acridine (AI, Sigma-Aldrich); acridone (AO, Sigma-Aldrich); Iminostilbene (IMI, Sigma-Aldrich); 9-hydroxymethyl-10-carbamoyl-acridan (9OH-acridan, Sigma-Aldrich); 10,11-dihydrocarbamazepine (dihydro-CBZ, Sigma-Aldrich); and the deuterated carbamazepine-d8 (CBZ-d8, Toronto Research Chemicals) and 10,11-dihydro-10,11-epoxycarbamazepine-d10 (EPOXY-d10, Toronto Research Chemicals). All chemicals used in this study were analytical grade (purity > 95 %).

### 2.2.2. Animals, experimental design and sample collection

*Mytilus galloprovincialis* mussels were purchased from Les Compagnons de Maguelone mussel culture (Villeneuve-les-Maguelone, France) in March 2019 and were brought back to the laboratory within an hour. Prior to the experiment, 90 mussels with a homogenous shell size (mean: 7.0 cm; standard deviation (sd): 0.4 cm) were rinsed with seawater while algae and barnacles were removed from the shell. Mussels were then randomly distributed in 18 glass aquaria (n = 5 mussels per aquarium), each containing 2 L of filtered seawater (provided by IFREMER, Palavas, France; filter GF/F  $\varnothing$  100  $\mu$ m).

During all the experiment (acclimatisation and exposure periods), seawater was continuously aerated and renewed daily, and mussels were fed once daily with the alga *Tetraselmis suecica* (Greensea, Mèze, France) at constant density (10 000 cells/mL). Physicochemical parameters were checked on a daily basis such as temperature (14.4 °C sd. 0.5), pH (7.5 sd. 0.06), oxygen (10.3 mg/L sd. 0.1) and salinity (36.8 ‰ sd. 0.2), and were maintained constant throughout the experiment.

After a 7-day acclimatisation period, three exposure conditions were constituted (n = 30 mussels *per* condition) with an environmental relevant CBZ concentration (80 ng/L; low dose), a higher

CBZ concentration (8 µg/L; high dose) and a solvent control exposure (20 µL of methanol, vehicle used for the preparation of CBZ solution). Each exposure solution was prepared extemporaneously every day. Aquaria seawater were spiked one hour after feeding to prevent any adsorption of CBZ on the algae. Seawater (500 mL) from aquaria was sampled in triplicate daily before each renewal to quantify carbamazepine concentration. Seawater in a spiked glass aquarium without mussels was also sampled for CBZ quantification.

After three days of exposure, no dead mussels were recorded. Mussels were dissected on ice to collect the digestive gland (used for both metabolomics and proteomics analysis), the gills (for further analyses not in the scope of this study) and the remaining soft tissues (for CBZ and metabolites quantifications) in different cryotubes. In the same time, sex microscopy determination allowed the identification of 17 females, 10 males and 3 undifferentiated in the solvent control exposure condition, 13 females, 12 males and 5 undifferentiated in the low dose exposure condition, and 14 females, 12 males and 4 undifferentiated in the high dose exposure condition. The samples were directly frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C.

In the present study, only samples of male mussels were considered for the following analysis in order to avoid any bias due to the gender confounding factor. However, two samples from the solvent control exposure condition and two samples from the high dose exposure condition were excluded from analysis due to insufficient digestive gland tissue to perform both metabolomics and proteomics analysis (n = 8 males for the solvent control, n = 12 males for the low dose and n = 10 males for the high dose).

### 2.2.3. *Extraction and analysis of carbamazepine and its metabolites*

#### 2.2.3.1. Seawater exposure – Solide Phase Extraction (SPE) method

An extracted calibration curve with seawater samples spiked at 0; 1; 5; 25; 100; 1,000; 10,000 and 50,000 ng/L of a mixture of CBZ and its metabolites, as well as sampled seawater (500 mL, n = 3 *per* condition and *per* day) were prepared according the following SPE protocol. SPE cartridges Oasis HLB 500 mg 6 cc were first conditioned with 2 × 5 mL of methanol and then 2 × 5 mL of water. Afterwards, samples spiked with 1 µg of deuterated internal standards (CBZ-d8 and EPOXY-d10) were loaded into cartridges. The latter were cleaned with 5 mL of water and dried under vacuum for one hour. Elution of analytes was completed with 2 × 5 mL of methanol. Finally, eluate was evaporated to dryness under a nitrogen stream and re-suspended in 200 µL of water/acetonitrile (80/20; v/v).

#### 2.2.3.2. Mussel soft tissues – QuEChERS method

The extraction protocol was based on a *QuEChERS* (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe) method adapted from Martínez Bueno et al. (2013). Freeze-dried soft tissues (500 mg, n = 5 samples *per* condition) enriched with 20 ng of deuterated internal standards (CBZ-d8 and Epoxy-d10) were re-hydrated with 2.5 mL of water in a polypropylene centrifuge tube and mixture was vortexed for 30 s. Next, 2.5 mL of acetonitrile was added and the tubes were manually and vigorously shaken for 1 min. After the addition of 1 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhydrous), 0.25 g NaCl, 0.25 g Na<sub>3</sub>Cit:2H<sub>2</sub>O and 0.13 g Na<sub>2</sub>HCit:3H<sub>2</sub>O into each tube, the mixture was immediately shaken as previously, and then centrifuged at 3500× *g* for 5 min. After a 5 min rest, 1.25 mL of the upper acetonitrile layer was transferred into a polypropylene tube, containing clean-up sorbent (375 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhydrous), 68 mg PSA and 68 mg C18), and 25 µL of formic acid was added and shaken for 1 min. A second centrifugation step was performed at 5000× *g* for 5 min. Supernatant (1 mL) was transferred into a glass tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream and re-suspended in 1 mL of water/acetonitrile (80/20; v/v). Finally, the samples were centrifuged (10,000× *g*, 10 min) to separate the residual lipids and the extract was filtered directly into an analysis vial using a 0.45 µm PTFE syringe filter (Minisart SRP 4, Sartorius).

#### 2.2.3.3. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry method

Targeted analysis of CBZ and its metabolites in mussel soft tissue and seawater samples were performed on an Accela 600 pump HPLC (Thermo Fisher Scientific) coupled to a Q Exactive Orbitrap high resolution mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated electrospray ionisation source (HESI). The HPLC separation was achieved in reversed phase using a Waters CORTECS T3 column (120 Å, 2.7 µm, 2.1 × 100 mm). Samples (10 µL) were loaded onto the column with a full loop injection. The mobile phase was constituted of water and acetonitrile both modified with 0.1 % formic acid. The flow rate was set at 400 µL/min and the elution gradient (water/acetonitrile) started with 80/20 for 1 min, reached 0/100 at 10 min, hold until the 15<sup>th</sup> min, back to the initial condition at 18 min (80/20) and equilibrating the column until the 26<sup>th</sup> min. The mass spectra were acquired in targeted-single ion monitoring (SIM) mode, with a mass tolerance window of 5 ppm, at a mass resolving power of 70,000 Full Width at Half Maximum (FWHM) at *m/z* 200. The HRMS instrument was set in positive ionisation mode. The ESI source conditions and were set as follows: spray voltage at 4 |kV|, sheath gas flow rate of 55, aux gas flow rate at 10, S-Lens RF level of 50, capillary temperature at 300°C and heater temperature at 200°C.

The non-targeted analysis for the discovery of unknown CBZ metabolites in mussels soft tissue was carried out in a full-scan mode on the same tissue samples, as described in Section 2.4.2.

#### 2.2.4. Metabolomics analyses

##### 2.2.4.1. Sample preparation

Digestive glands of male mussels were lyophilised and grinded until a fine powder was obtained. As described in previous studies (Bonafille et al., 2018; Dumas et al., 2020b), the biphasic solvent system methanol/dichloromethane/water (16/16/13; v/v/v) is used to extract metabolites from tissues. Briefly, 30 mg of tissue ( $\pm 0.40$  mg) were first homogenised and extracted in a glass tube with 240  $\mu$ L of methanol and 75  $\mu$ L of water and vortexed for 1 min. In the next step, 240  $\mu$ L of dichloromethane and 120  $\mu$ L of water were added before vortexing the whole 1 min. The samples were left on ice for 15 min and then centrifuged at  $2000\times g$  for 15 min at 4°C. 50  $\mu$ L of the supernatant (polar phase) were collected and evaporated to dryness under a nitrogen stream and finally reconstituted in 200  $\mu$ L of water/acetonitrile (95/5; v/v). The extracts were filtered using a 0.20  $\mu$ m PTFE syringe filter (Minisart SRP 4, Sartorius) into vials prior to liquid chromatography—high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis.

##### 2.2.4.2. Data acquisition and quality control

Non-targeted analysis was carried out using an Accela 600 pump HPLC (Thermo Fisher Scientific) coupled to a Q Exactive Orbitrap HRMS (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated electrospray ionisation source (HESI).

A reversed phase pentafluorophenylpropyl (PFPP) analytical column (100  $\times$  2.1 mm; 3  $\mu$ m particle size; Sigma Aldrich, PA, Bellefonte, USA) was used for HPLC separation. Each sample (10  $\mu$ L) was loaded onto the column with a full loop injection. The mobile phase was constituted of water and acetonitrile both modified with 0.1 % formic acid. The flow rate was set at 250  $\mu$ L/min and the gradient system was as follows (water/acetonitrile): 95/5 until 3 min, 60/40 at 8 min, 50/50 at 9 min, 30/70 at 13 min, 5/95 from 15 to 18 min, going back to the initial condition at 21 min (95/5) and equilibrating the column until the 28<sup>th</sup> min.

The Q Exactive HRMS was turned to a mass resolution of 35,000 (FWHM, m/z 200) with a mass spectrum range of 50–750 m/z. Data were acquired simultaneously in both positive (ESI<sup>+</sup>) and negative (ESI<sup>-</sup>) ionisation modes with the following settings: spray voltage at 3.35 |kV|, sheath gas flow rate of 55, aux gas flow rate at 10, S-Lens RF level of 50, capillary temperature at 300°C and heater temperature at 250°C. It has to be noted that sample order was randomly distributed in the injection sequence to avoid any bias and to reduce the influence of potential confounding factors.

In order to assess the analytical repeatability and sensitivity of acquisitions, a quality control (QC) sample was injected at regular intervals throughout the sequence (every six samples). The QC sample was prepared by pooling 40  $\mu$ L of each injected sample extract.

#### 2.2.4.3. Data pre-processing

The strategy for data pre-processing was already presented in Dumas et al. (2020b, 2020a). Briefly, the raw data were converted into mzXML files with MSConvert freeware (ProteoWizard 3.0, Kesner et al., 2008). A multi-step strategy was applied for processing ESI<sup>+</sup> and ESI<sup>-</sup> acquisitions separately using the XCMS package (Smith et al., 2006) in the R environment. Optimized XCMS parameters were implemented: m/z interval for peak picking was set at 0.0025, the signal-to-noise ratio threshold was set at 10, the group bandwidth was set at 8, and the minimum fraction was set at 0.5. XCMS returned results as a peak table containing variable identity (i.e., m/z and retention time) and feature abundances (i.e. peak area). After visual inspection of each extracted ion chromatogram, all features corresponding to baseline drift or background noise were discarded from the peak table. In addition, the Bioconductor package CAMERA (Kuhl et al., 2012) was used to remove isotopes, adducts, and fragments from the peak table, thus avoiding information redundancy. The analytical repeatability was assessed by calculating the relative standard deviation (RSD) for each features detected in QC samples. A controlled analytical variability was set such that 70 % of features would have an RSD < 30 % (Want et al., 2013). Features with an RSD > 30 % were excluded for statistical analysis.

#### 2.2.4.4. Metabolites annotation and identification

The public databases Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>) and LipidMaps (<https://lipidmaps.org/>) were used for feature annotation. A mass precision was fixed at 0.002 Da. The levels of confidence for the annotation were defined in line with the work of Sumner et al. (2007): (i) level 1 was characterized by unambiguous identification based on the accurate mass and retention time of the corresponding analytical standard injected under the same analytical conditions (in-house database), (ii) level 2 corresponded to putative annotation based upon physicochemical properties and/or spectral similarity with public databases, and (iii) level 3 was putatively characterized compound classes (e.g. based upon characteristic physicochemical properties of a chemical class of compounds).

#### 2.2.4.5. Differential metabolite abundance analysis

Abundance of metabolites (peak area of MS spectra) was compared between the solvent control condition and the CBZ treated conditions. Differential abundance was assessed with a Welch *t*-test and the False Discovery Rate (FDR) was controlled using the Benjamini–Hochberg FDR correction. Metabolites with a significant modulation higher than 30 % (adjusted p-value < 0.05) were considered biologically relevant.

### 2.2.5. Proteogenomics analyses

#### 2.2.5.1. Protein extraction

Each digestive gland, previously lyophilized, was analysed individually by shotgun proteomics in standard conditions. For this, 7 mg from each lyophilisate was mechanically homogenized by bead-beating in 70  $\mu$ l of LDS sample buffer (Invitrogen) with a precellys homogenizer (Bertin). The homogenates were centrifuged at 10,000 $\times g$  for 3 min in order to pellet cellular debris, and the resulting supernatant collected to a new tube. Samples were homogenized with a mix of 0.1 mm and 0.5 mm glass beads and 0.1 mm silica beads. The homogenization was carried out until the dissolution of the whole material was achieved with 5 homogenization cycles at 6800 rpm with a pause of 30 s between each. Then, samples were centrifuged at 16 000 $\times g$  for 2 min. Samples were then incubated for 5 min at 99 °C. A 20  $\mu$ L aliquot of each supernatant was then loaded on SDS-PAGE for a short electrophoretic migration, as described previously (Trapp et al., 2015). The whole-protein content from each well was extracted as a single polyacrylamide band, processed as described (Hartmann et al., 2014), and submitted to proteolysis with trypsin (Roche) using 0.01 % ProteaseMAX surfactant (Promega).

#### 2.2.5.2. Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry method

The peptide mixtures were analysed in data-dependent mode with a Q Exactive HF mass spectrometer (Thermo) coupled with an UltiMate 3000 LC system (Dionex-LC Packings). This instrument was operated essentially as described (Klein et al., 2016). Briefly, peptides were desalted and then resolved onto a nanoscale C18 PepMapTM 100 capillary column (LC Packings) with a 90-min gradient of acetonitrile, 0.1% formic acid, at a flow rate of 0.2  $\mu$ L/min. Following a Top20 method, peptides were analyzed with scan cycles initiated by a full scan of peptide ions in the Orbitrap analyzer, followed by high-energy collisional dissociation and MS/MS scans on the 20 most abundant precursor ions. Full scan mass spectra were acquired from m/z 350 to 1800 at a resolution of 60,000. Ion selection for MS/MS fragmentation and measurement was performed applying a dynamic exclusion window of 10 s.

#### 2.2.5.3. Peptides assignation and proteomics data analysis

MS/MS spectra were assigned to peptide sequences by the MASCOT Daemon 2.3.2 search engine (Matrix Science) searching against the digestive gland specific RNAseq-derived database obtained by *de novo* assembly with Trinity version 2.4 (Haas et al., 2013) and followed by ORF search with Transdecoder as described in Cogne et al. (2019). The database contains 86022 putative protein sequences totaling 29,583,007 amino acids. For MS/MS spectra assignment, the parameters were: full-trypsin specificity, maximum of one missed cleavages, mass tolerances of 5 ppm on the parent ion and

0.02 Da on the MS/MS, carboxyamidomethylated cysteine (+57.0215) as a fixed modification, and oxidized methionine (+15.9949) and deamidation of asparagine and glutamine (+0.9848) as variable modifications. All peptide matches presenting a MASCOT ion score with a p-value of less than 0.05, corresponding to a FDR of 1% as evaluated with the DecoyPyrat procedure (Wright and Choudhary, 2016), were filtered and assigned to a protein with parsimony. Annotation of detected protein was done using Swissprot and NCBI nr databases with the blast tool alignment DIAMOND. Peptide-to-spectrum matches (PSMs) were counted for each protein leader of the protein group defined on the basis of their homology. Functional annotation of proteins was done as previously described (Trapp et al., 2018).

#### 2.2.5.4. Differential protein abundance analysis

The abundances of all MS/MS-detected proteins were based on cumulated spectral counting of peptides used to identify proteins. For the differential comparison of protein abundances, spectral counts were normalized as described in Liu et al. (2004). Statistical evaluation of differential detection was carried out using the Tfold method combined with a Student *t*-test for the p-value calculation. Benjamini-Hochberg correction was applied on p-values using the number of proteins detected with at least two different peptides for each sample. A fold absolute value, obtained with the ratio calculation of the protein spectral count, higher than 1.5 (corresponding to an up-regulation of +50 % or a down-regulation of -30 %) was considered as differentially expressed between the solvent control condition and the CBZ treated conditions.

#### 2.2.6. *Metabolomics and proteogenomics data fusion*

Unit variance was used as a pre-treatment to scale the variables of the different blocks. Monte Carlo Uninformative Variable Elimination – Partial Least Squares (MCUVE-PLS) (Cai et al., 2008) and Consensus Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis (Boccard and Rutledge, 2013) models were computed with combinations of toolboxes and in-house functions under the MATLAB® 8 environment (The MathWorks, Natick, USA). UVE-PLS is a variable selection strategy based on the evaluation of PLS regression coefficients. It computes a reliability index for each variable, which is associated with the stability of its coefficient derived from a population of models generated using resampling. This parameter is then used as selection criterion to remove uninformative variables with a large coefficient variability. The seminal method involves a leave-one-out jackknife procedure and makes use of a set of random variables added to the real data to evaluate the behavior of the parameter under the null hypothesis. The implementation used in this work takes advantages from Monte Carlo resampling to generate a large ensemble of models built on randomly selected training sets. The population of models is then used to evaluate the stability of the coefficients, and thus the

reliability of the variables, leading to a method called MCUVE-PLS. Such a strategy increases the diversity of the training subsets compared to jackknife and offers therefore a more robust estimation of the coefficients variability, decreasing therefore the risk of overfitting (Baumann and Stiefl, 2004). MCUVE-PLS was carried out using the libPLS 1.98 package (Li et al., 2018) using an ensemble of  $10^4$  models with a ratio of calibration samples to the total samples of 0.7. A reliability index threshold of 2 was applied to remove variables considered as uninformative. Consensus OPLS-DA was implemented using the K-OPLS package (Bylesjö et al., 2008). Leave-one-out cross-validation was performed to assess the optimal model size and predictive ability. Consensus OPLS-DA is a multiblock modelling approach that combines multiple kernel learning and OPLS-DA. Because it separates Y-predictive from Y-orthogonal variations, consensus OPLS-DA extends the interpretability of OPLS (Trygg and Wold, 2002) to the multiblock situation. Moreover, it offers improved prediction ability compared to PLS applied to concatenated blocks and is computationally very efficient when a limited number of observations are described by large blocks of variables, as in the case of omics data. Association matrices derived from the different data blocks are scaled by their norm to ensure fairness between them. The combination of multiple datasets is implemented by computing a weighted sum of association matrices to determine a consensus space defined by Y-predictive and Y-orthogonal component(s). Interpretation is then carried out as it is usually done in multivariate modeling, with scores describing the distribution of the observations in the subspace generated by the model, and loadings associated with the variables contributions to build the new axes. In addition, block saliences can be investigated to assess the relevance of each block to define the directions of variations defined by the components.

#### 2.2.7. *Bioinformatics analysis*

Bioinformatics analysis was then carried out to translate metabolic or proteomic signatures, i.e. lists of biomarkers, into meaningful functional information, and get deeper insights into the biological events modulated by CBZ exposure. When a biological pathway is modulated in a given condition, levels of the corresponding proteins and metabolites are expected to change accordingly. In that context, Gene Ontology (GO) terms, i.e. metadata stored in databases linking biological entities to a biological context, can help to highlight meaningful alterations. GO classification were done for regulated proteins as previously described (Trapp et al., 2018). Due to the lack of an annotated genome, we used the top five homologs in the Swissprot database to associate GO terms to each protein. In complement, proteins were also classified according to the KEGG pathway and KEEG BRITE databases (<https://www.kegg.jp/>).

Dedicated algorithms developed to spot biological pathways that are represented more frequently than they would be by random chance offer an objective evaluation of observed modulations. As all data blocks are projected in the same model, multiblock modelling constitutes an efficient strategy before enrichment and network analysis, because the contributions of the variables can be easily compared and ranked (Meng et al., 2016). Moreover, this approach could help to pinpoint relevant signals from less predictive blocks that constitute valuable information for biological interpretation. Because of the quality of its database and its versatility, the MetaCore™ suite was chosen to highlight altered biological pathways using over-representation analysis, based on modulated metabolites. The obtained p-values were then used to rank the biological processes having the highest chance to be significantly modulated under the studied conditions.

In addition, the interactive pathways explorer iPath3.0 (Darzi et al., 2018) was used for a global analysis of KEGG metabolic pathways integrating both disrupted proteins and metabolites.

## 2.3. Results

### 2.3.1. Analysis of carbamazepine and its metabolites

CBZ and its metabolites were quantified in seawater and tissues of mussels for the low and high dose exposure, results are reported in Table 2.1.

#### 2.3.1.1. In seawater

CBZ was quantified in seawater at 88 ng/L and 7932 ng/L for low and high dose exposure, respectively. CBZ concentration in seawater was stable until renewal of seawater as shown by the quantification of CBZ in aquaria without mussels at t0 and t24<sub>h</sub>. Concerning the metabolites, EPOXY, dihydro-CBZ and 3OH-CBZ were quantified only at the high dose (concentrations lower than 15 ng/L), while 2OH-CBZ concentration was lower than 2 ng/L. However, these metabolites were also quantified in aquaria without mussels at the same concentrations. These unexpected results reveal a contamination with CBZ metabolites. In the blank extraction, no metabolites were detected, meaning that the contamination does not originate from the samples preparation (results not shown). We hypothesize that the low instrumental limit of detection allows the detection of impurities from the CBZ solution (purity not specified by the provider) used for the exposure. It has to be confirmed with a LC-HRMS analysis of the CBZ solution.

#### 2.3.1.2. In soft tissue

CBZ was quantified in mussels soft tissue at 2.4 ng/g and 283 ng/g for low and high dose exposure, respectively. At the low dose exposure, only EPOXY was detected in soft tissue, while it was quantified at the high dose exposure (0.1 ng/g) as well as 3OH-CBZ (0.09 ng/g) and 2OH-CBZ (< 0.01 ng/g). However, AI and AO were quantified in all soft tissues including those from mussels exposed to solvent control. It means that those two metabolites were already in mussel tissues at trace levels or that they correspond to endogenous metabolites of mussels. Therefore, we cannot assert that these metabolites originate from the mussel metabolism.

In order to identify novel metabolites of CBZ in mussels, a non-targeted analysis was performed in soft tissue from organisms exposed at the two doses. However, data processing did not reveal any signal corresponding to a potential unknown metabolite (other than the targeted metabolites) according to the following criteria: signal must be present in at least half of the exposed organisms and absent in all unexposed organisms, with a high fold-change.

**Table 2.1:** Quantification of CBZ and its metabolites in seawater exposure (ng/L) and in mussels soft tissue (ng/g) from the different exposure conditions.

	CBZ	EPOXY	dihydro-CBZ	3OH-CBZ	2OH-CBZ	AI	AO	IMI	Cis-CBZ	Trans-CBZ	9OH-acridan
Seawater low exposure	88 ± 12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Seawater high exposure	7932 ± 1756	14.4 ± 2.9	6.6 ± 1.5	3.5 ± 0.3	< 2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Seawater without mussels high exposure t0	7977 ± 1352	16.6 ± 5.6	6.7 ± 1.3	2.7 ± 0.6	< 2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Seawater without mussels high exposure t24h	8071 ± 1552	13.0 ± 4.1	6.3 ± 0.8	2.2 ± 0.4	< 2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tissues low exposure	2.4 ± 0.3	< LOQ	ND	ND	ND	1.4 ± 0.3	0.65 ± 0.3	ND	ND	ND	ND
Tissues high exposure	283 ± 18	0.1 ± 0.002	ND	0.09 ± 0.01	< 0.01	1.5 ± 0.2	0.2 ± 0.03	ND	ND	ND	ND
Tissues solvent control exposure	ND	ND	ND	ND	ND	1.4 ± 0.3	0.1 ± 0.05	ND	ND	ND	ND

ND: Non detected

2.3.2. *Effects of carbamazepine on digestive gland of M. galloprovincialis*

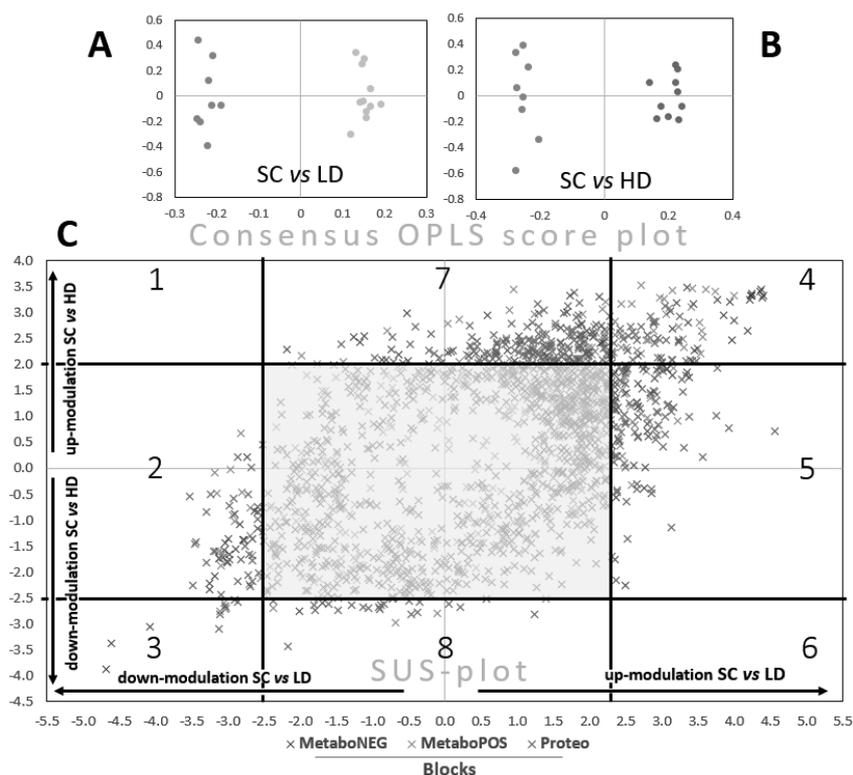
2.3.2.1. Metabolomics and proteomics integrated analysis

Data integration was implemented using a mid-level data fusion strategy involving MCUVE-PLS and consensus OPLS-DA. The metabolomic datasets acquired in ESI<sup>+</sup> (MetaboPOS) and ESI<sup>-</sup> (MetaboNEG) as well as the proteomic dataset (Proteo) were defined as three separate data blocks, accounting for 1178, 1146 and 2422 variables, respectively. These variables correspond to all the signals considered as acceptable according to analytical criteria. First, the three data blocks were processed individually and MCUVE-PLS was carried out to remove uninformative variables. A reliability index cut-off of 2 was found appropriate to remove unwanted signals, while preserving biological information. Subsets of 365, 399 and 937 variables were obtained for the MetaboNEG, MetaboPOS and Proteo blocks, respectively.

Two consensus OPLS-DA models comparing the solvent control (SC) to each exposure condition separately, i.e. low dose 0.08 µg/L (SCvsLD) and high dose 8 µg/L (SCvsHD), were then evaluated. Both models were found optimal with two components (one predictive and one orthogonal) using leave-one-out cross-validation. The SCvsLD model was characterized by R<sup>2</sup><sub>Y</sub>=0.990 and Q<sup>2</sup><sub>Y</sub>=0.851 (Figure 2.1A), while the SCvsHD was associated with R<sup>2</sup><sub>Y</sub>=0.985 and Q<sup>2</sup><sub>Y</sub>=0.811 (Figure 2.1B).

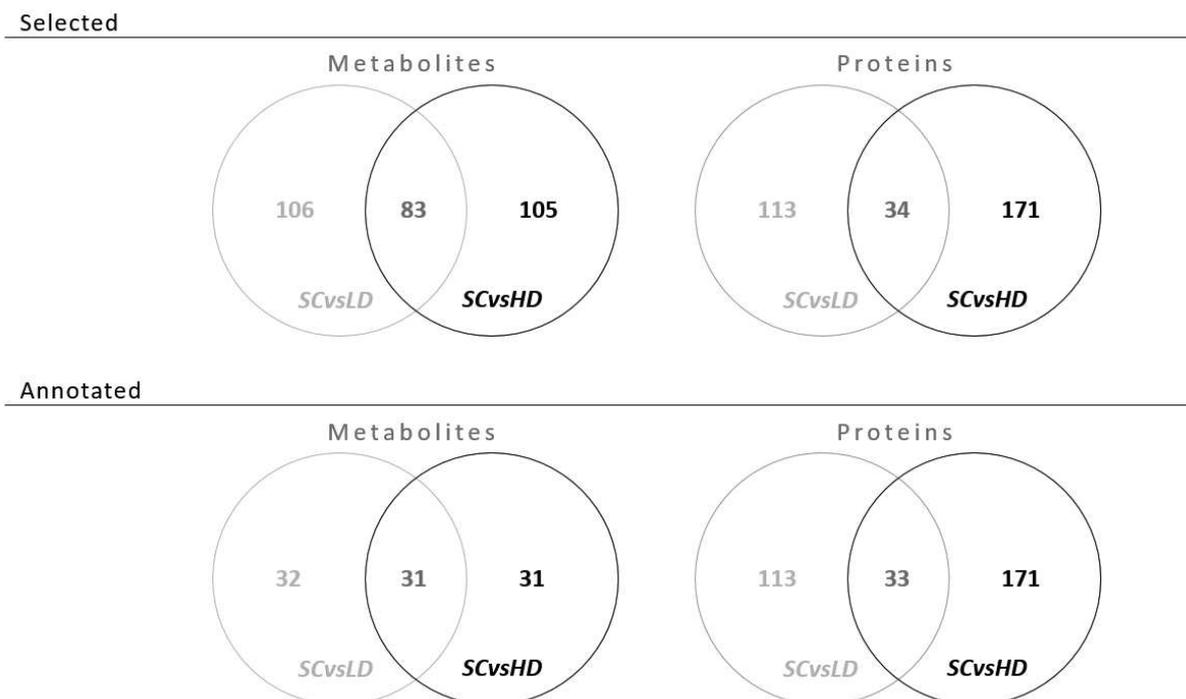
A Shared and Unique Structure (SUS) plot was then used to distinguish signals with common patterns of variations associated with both doses, from specific modulations related to a given exposure condition (Figure 2.1C). Thresholds were fixed to select sufficient signals at the borders of the ellipse from the SUS-plot. These signals are expected to be the most informative according to the models, to explain the effects of CBZ at the low and high dose of exposure on the modulation of proteins and metabolites. The SUS-plot can be split in eight areas as indicated by the number from 1 to 8 on Figure 2.1C. Signals from the areas 2 and 5 are specific of the low dose exposure (according to their direction of modulation) while those from the areas 7 and 8 are specific to the high dose. Whereas the common signals between both doses are localized in the areas 1, 3, 4 and 6.

Hence, the selected signals considered as relevant included subsets of 128, 166 and 318 signals from the blocks MetaboNEG, MetaboPOS and Proteo, respectively. According to the SUS-plot, selected proteins and metabolites showed different patterns between the two conditions of exposure at low and high dose. As summarised in Venn diagrams (Figure 2.2), most proteins are rather specific to an exposure condition with more regulated proteins for the high dose, while modulated metabolites show a more balanced pattern with the same number of specific metabolites at the low and high dose, and an equivalent number of jointly modulated metabolites.



**Figure 2.1:** Consensus OPLS score plots of the two conditions solvent control exposure versus low dose exposure (SCvsLD) (A) and solvent control versus high dose (SCvsHD) (B). Shared and Unique Structure (SUS) plot integrating both comparisons SCvsLD and SCvsHD with common and specific modulations (C). The thresholds are represented with black lines and irrelevant variables are shaded. The numbers correspond to different modulation patterns, specific or common to the two doses.

Among these selected signals, 50 were annotated from the block MetaboNEG, 45 from the MetaboPOS and 317 from the Proteo. The annotations were provided in Table S1 and Table S2 for metabolites and proteins, respectively. When looking at annotated signals, the common and specific patterns of modulation between the two doses were conserved, although only one third of the metabolites were annotated (Figure 2.2). In order to highlight the significantly modulated proteins and metabolites, their fold-change and p-value for both comparisons SCvsLD and SCvsHD were provided in Tables S1 and S2. As expected, all the selected signals have not necessarily a significant fold-change, especially for proteins. It means that the selection of proteins and metabolites from the SUS-plot is not necessarily based on their significant fold-change but also depends on the correlation between the variables. Compounds with an insignificant fold-change, but localized at the borders of the SUS-plot ellipse, should have a high correlation with others compounds. The statistical correlation between the variables could have a biological meaning. Therefore, all the selected signals were considered for the following bioinformatics analyses.

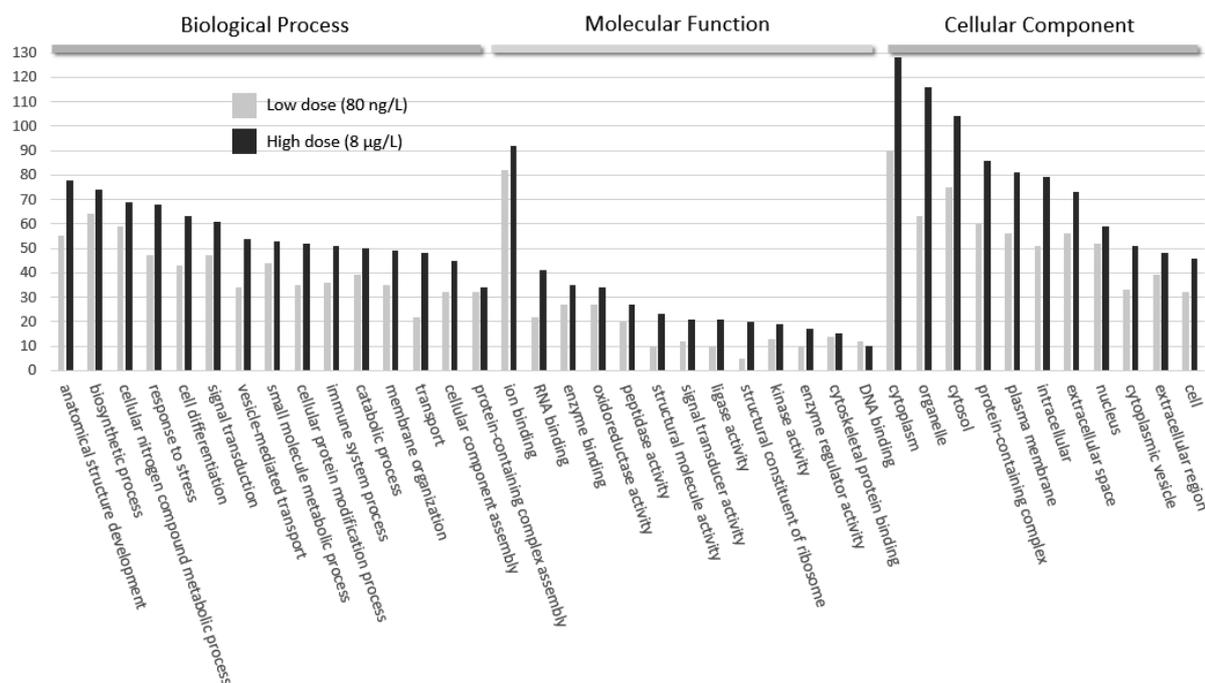


**Figure 2.2:** Venn diagrams highlighting specific and common variables (metabolites and proteins) between both comparisons solvent control exposure versus low dose exposure (SCvsLD) and solvent control versus high dose (SCvsHD). Results are given for the selected signals according to the SUS-plot and then for the annotated ones.

Different bioinformatics tools were used to highlight the relevant biological processes and functions altered by the CBZ exposure from the selected subsets of proteins and metabolites. Hence, a GO classification of proteins complemented by information from the KEGG Pathway and KEGG BRITE databases was performed to understand the functions of regulated proteins and then the biological processes altered in the organism. In addition, an over-representation analysis was applied with the modulated metabolites to highlight the most disturbed metabolic pathways. Finally, both proteins and metabolites were employed for a global analysis of metabolic pathways, in order to observe relationship between the two omics layers.

#### 2.3.2.2. Proteome analysis

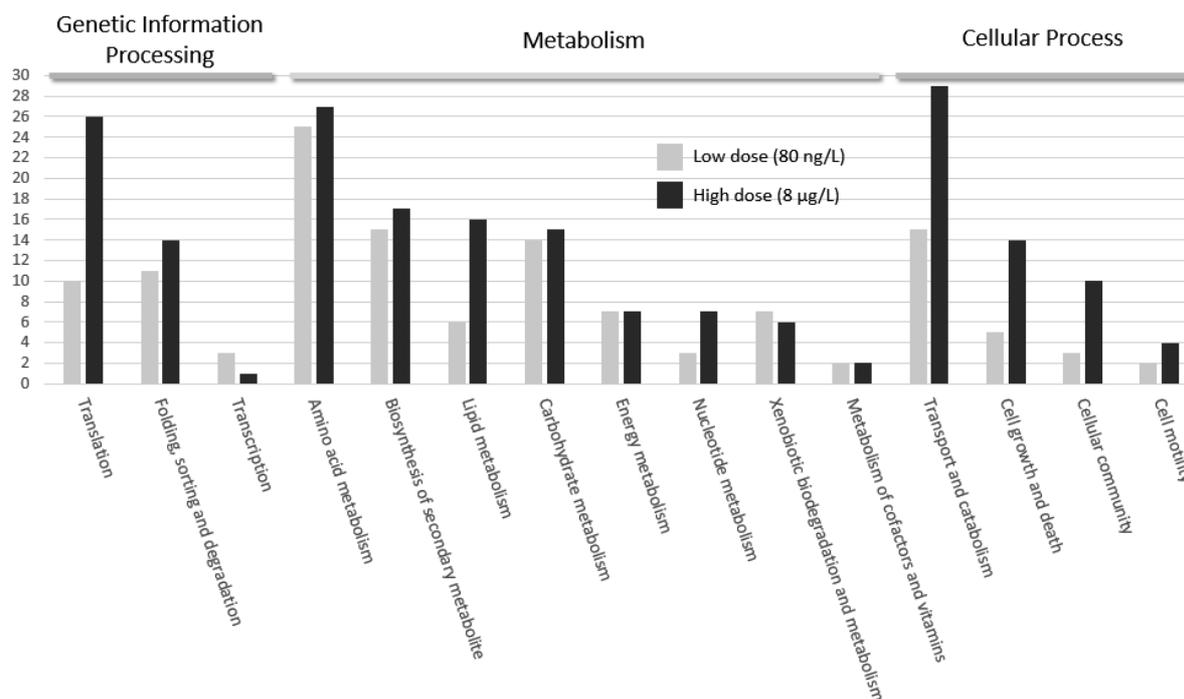
GO classification was applied to provide an overview of the biological context of the proteins, selected for their involvement in the response of mussels to CBZ, from three categories: biological process, molecular function and cellular component. For the low and high dose, respectively, 108 and 152 proteins match with biological processes, 125 and 175 proteins match with molecular functions and, 112 and 162 proteins match with cellular components. Most significant entries of these three categories are presented in number of proteins regulated for the low and high CBZ dose (Figure 2.3), knowing that a protein can be classified in several entries.



**Figure 2.29:** Gene ontology classification of proteins that were expressed in digestive gland of mussels exposed to low and high dose of carbamazepine.

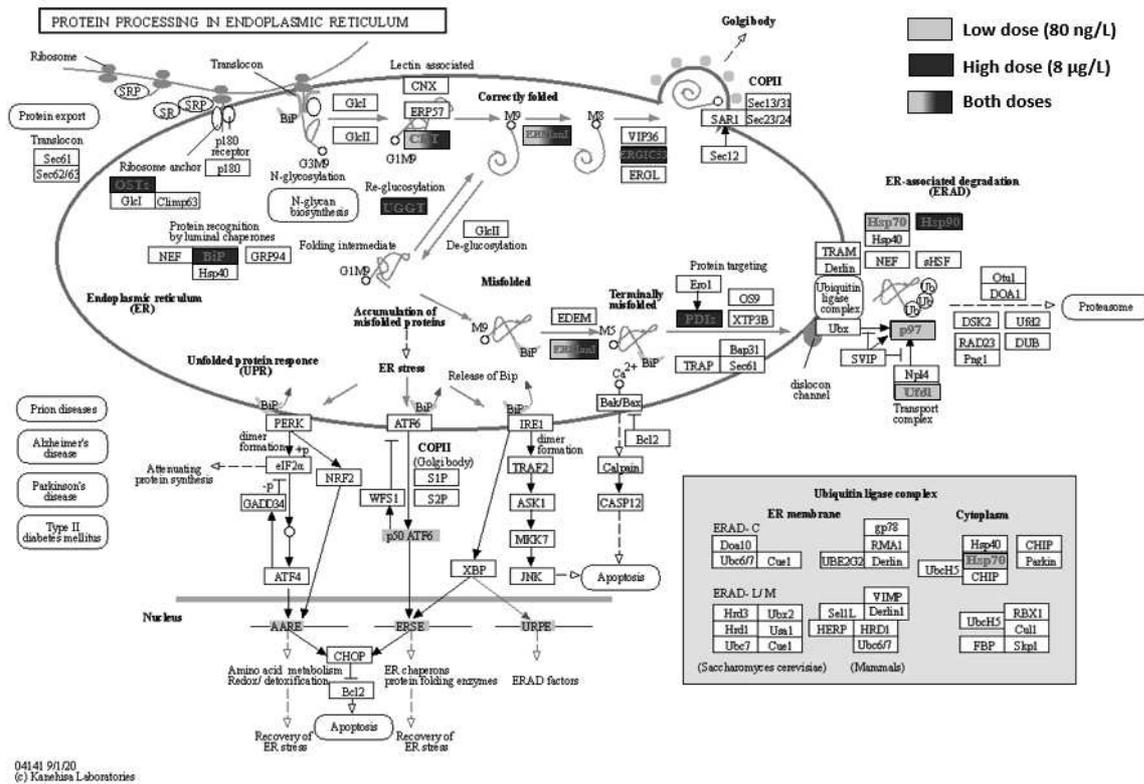
Even if most of the selected proteins seemed to follow a dose-specific regulation pattern according to the Venn diagram (Figure 2.2), GO classification revealed globally similar results between the two exposure conditions, meaning that the same biological processes and functions could be disturbed at the low or high dose of CBZ but in different ways or at different intensity levels. Affected proteins covered a wide range of biological processes, mainly including anatomical structure development, biosynthetic process (i.e., chemical reactions and pathways resulting in the formation of substances), cellular nitrogen compound metabolic process (e.g. compounds containing purine, pyrimidine, imidazole, indole, pyridine or amino acid betaine), and response to stress. Based on molecular functions, majority of proteins were concentrated on ion binding (66 % for the low dose and 52 % for the high dose), consisting in interacting selectively and non-covalently with ions, charged atoms or groups of atoms. According to the cellular compound classification, proteins were mainly localized in cytoplasm and more specifically in cytosol and organelles but also, to a lesser extent, in plasma membrane, nucleus and extracellular space.

As a complement to the classification in GO terms, regulated proteins were also queried against KEGG and assigned to pathways, themselves classified in three categories: genetic information processing, metabolism and cellular process (Figure 2.4). All of the 318 proteins queried against the KEGG database were not assigned to a KEGG ID. Therefore, the number of regulated proteins assigned to KEGG pathways was 97 for the low dose (67 % of the submitted proteins) and 160 for the high dose (78 % of the submitted proteins).



**Figure 2.4:** KEGG pathways in which the regulated proteins are involved at the low and high dose of carbamazepine.

Pathways related to genetic information processing mainly concern translation and folding, sorting and degradation for both CBZ doses and especially at the high dose involving 16 proteins more in the translation process (Figure 2.4). Differences between the two doses in the translation process appear at ribosomal level with 5 proteins involved at the low dose (4 down-regulated and 1 up-regulated) against 21 proteins mainly up-regulated at the high dose. Ribosomes perform biological proteins synthesis by decoding the information contained in the messenger RNA (mRNA) and linking amino acids together to form a polypeptide chain. Newly synthesized peptides enter the endoplasmic reticulum (ER; subcellular organelle) to be glycosylated (folding step). Correctly folded proteins are packaged into transport vesicles that shuttle them to the Golgi complex, while misfolded proteins are retained within the ER lumen in complex with molecular chaperones (sorting step). Proteins that are terminally misfolded are directed toward degradation through the proteasome in a process called ER-associated degradation. As illustrated in Figure 2.5, proteins observed in this study during the folding, sorting and degradation process indicate a change in proteins synthesis and degradation after a CBZ exposure, more pronounced at the high dose.



**Figure 2.5:** Folding, sorting and degradation processes disrupted by exposure to low and high doses of carbamazepine.

Concerning metabolic pathways, most regulated proteins match with the amino acid metabolism (about 25 proteins), followed by the biosynthesis of secondary metabolites (around 15 proteins) and carbohydrate metabolism (about 15 proteins), while no differences occur between both doses (Figure 2.4). However, more proteins are regulated at the high dose for the lipid metabolism (16 proteins *versus* 6 at the low dose) and the nucleotide metabolism (7 proteins *versus* 3 at the low dose).

Among the cellular processes, transport and catabolism is the most enriched process with 15 and 29 regulated proteins at the low and high dose, respectively (Figure 2.4). These transport and catabolism processes concern endocytosis and autophagy, as well as the organelles phagosome, lysosome and peroxisome. Regulated proteins involved in these processes were described in Table 2.2. Endocytosis is the process by which cells internalize substances from their external environment. One of the three primary types of endocytosis is phagocytosis. A phagosome is formed by the fusion of the cell membrane around a particle, a microorganism, a senescent cell or an apoptotic cell. The phagosome then fuses with an organelle called a lysosome and becomes known as a phagolysosome. Lysosomes contain enzymes that digest organic material once released within the phagolysosome. The useful materials (e.g. amino acids) from the digested particles are moved into the cytosol, and wastes are removed by exocytosis. Another cellular organelle, the peroxisome, is an oxidative organelle playing a key role in lipid metabolism (long chain fatty acids, branched chain fatty acids, bile acid intermediates) and the conversion of reactive oxygen species. Autophagy is the mechanism of the cell

that degrades and recycles useless or dysfunctional components (unwanted or damaged organelles, misfolded proteins, etc.).

**Table 2.2:** Relevant proteins selected by the models, involved in the transport and catabolism cellular process.

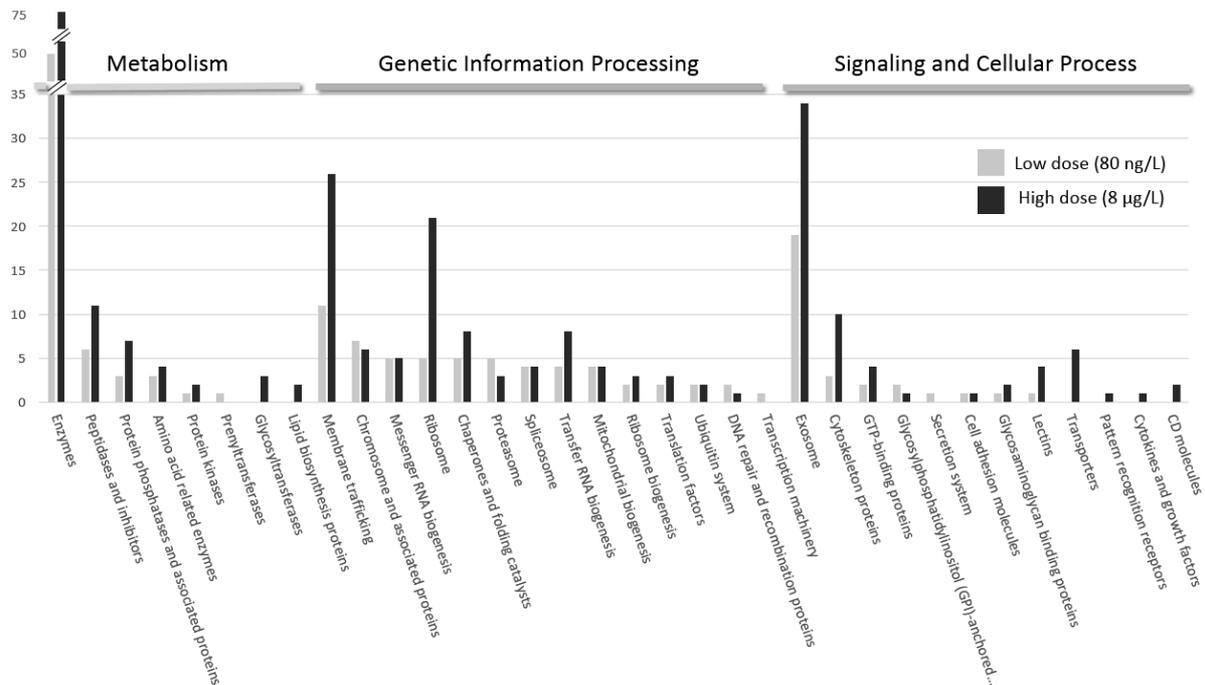
	<b>Low dose (80 ng/L)</b>	<b>High dose (8 µg/L)</b>
<b>Endocytosis</b>	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A/1B; capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta (+55 %)	<i>AP-2 complex subunit alpha (+59 %); actin related protein 2/3 complex, subunit 1A/1B (+42 %);</i> capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta (+108 %); capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha (+131 %); <b>Ras-related protein Rab-7A; sorting nexin-5/6/32</b>
<b>Phagosome</b>	calreticulin; V-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit F (-64 %); cathepsin L (-67%); cathepsin-like protein-4, partial (+126 %)	calreticulin; V-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit F (-54 %); <b>Ras-related protein Rab-7A;</b> cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 isoform X11 (+111 %); cathepsin-like protein-4, partial (+125 %); mannose receptor, C type (331 %); Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (+105 %)
<b>Lysosome</b>	<b>Proteases:</b> cathepsin L (-67 %); cathepsin-like protein-4, partial (+126 %); <i>cathepsin B (+49 %)</i> <b>Glycosidases:</b> alpha-L-fucosidase (+91 %); lysosomal alpha-mannosidase <b>Lysosomal activators:</b> ganglioside GM2 activator (+ 521 %)	V-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase subunit d-like (+132 %) <b>Proteases:</b> cathepsin-like protein-4, partial (+125 %); cathepsin B (+75 %) <b>Glycosidases:</b> alpha-L-fucosidase (+137 %) <b>Lysosomal activators:</b> ganglioside GM2 activator (+286 %)
<b>Peroxisome</b>	<b>Fatty acid oxidation:</b> acyl-CoA oxidase (β oxidation) <b>Antioxidant system:</b> superoxide dismutase <b>Purine metabolism:</b> <i>xanthine dehydrogenase/oxidase (+97 %)</i>	<b>Fatty acid oxidation:</b> - β oxidation: acyl-CoA oxidase (+233 %); peroxisomal multifunctional enzyme type 2 isoform X2 (+72 %); peroxisomal bifunctional enzyme-like (+159 %); - <b>unsaturated fatty acid β oxidation:</b> <i>Delta3,5-Delta2,4-dienoyl-CoA isomerase (+94 %);</i> long-chain acyl-CoA synthetase (+141 %); <b>Antioxidant system:</b> <i>catalase (+30 %)</i>
<b>Autophagy</b>	cathepsin L; cathepsin-like protein-4, partial (+126 %); <i>serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit (+49 %); cathepsin B (+49 %)</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 1 (+471 %); <b>Ras-related protein Rab-7A;</b> cathepsin-like protein-4, partial (+125 %); cathepsin B (+45 %)

Significantly regulated proteins are in blue (up-regulated) or in red (down-regulated) while proteins which tend to be regulated are in italic (*p*-value < 0.1). Proteins in black were selected by the model but not regulated.

Cell growth and death is the second most enriched cellular process, especially at the high dose (Figure 2.4). More specifically, regulated proteins belong mainly to the cell death process that concerns apoptosis (5 proteins, e.g. caspase 2, tumor necrosis factor ligand superfamily member 10), necroptosis (4 proteins, e.g. histone H2A, HSP90A) and cellular senescence (3 proteins). To a lesser extent, cell death processes are also modified after the low dose exposure with the up-regulation of

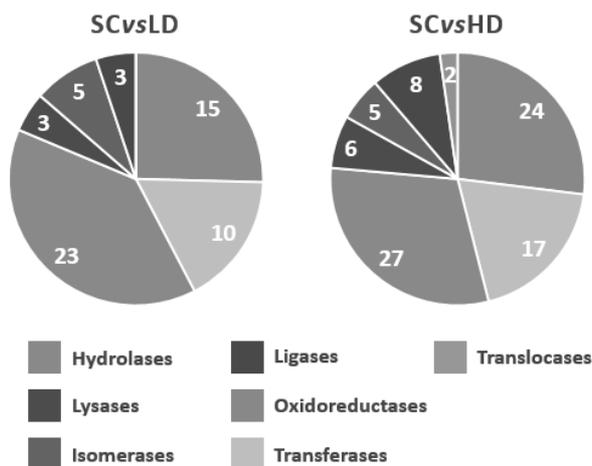
the protein histone-binding protein RBBP4 (+119 %) involved in the cellular senescence and the down-regulation of the quinone oxidoreductase PIG3-like isoform X2 (-58 %) from the p53 signaling pathway.

The KEGG BRITE database gives another complementary information about hierarchical classification of our regulated proteins into protein families, according to the same categories: genetic information processing, metabolism and signaling and cellular process (Figure 2.6).



**Figure 2.6:** Hierarchical classification of regulated proteins into protein families at the low and high dose, using the KEGG BRITE database.

In the metabolism category, most of the regulated proteins belong to the enzymes family for both doses (74 and 51 proteins at the high and the low dose, respectively) (Figure 2.6). Among the enzymes family, a protein can fulfill several functions. The distribution of regulated proteins within the different functions is illustrated in Figure 2.7. In an equivalent proportion between the two doses, the most regulated enzymes are hydrolases, oxidoreductases and transferases.



**Figure 2.7:** Distribution of regulated enzymes according to their function after an exposure to carbamazépine at a low (SCvsLD) and high dose (SCvsHD).

Concerning the genetic information processing, membrane trafficking is the most enriched process with 11 and 26 regulated proteins for the low and the high dose, respectively. Membrane trafficking encompasses the wide variety of processes that go into the movement of substances (typically proteins, pathogens and other macromolecules) using membrane bound transport vesicles (e.g. endocytosis). This transport can take place within different organelles in the same cell, or across the cell membrane to and from the extracellular environment. A second proteins family is highly represented at the high dose such as ribosomal proteins (21 regulated proteins), that has already been described previously within the translation process.

According to the signaling and cellular process, exosomal proteins constitute the main family of regulated proteins at the low and high dose (19 and 34 proteins respectively). Exosomes are vesicles produced in the endosomal compartment of most eukaryotic cells that are released in the extracellular space. Exosomes contain various molecular constituents such as proteins, nucleic acids or RNA. Hence, exosomes can transfer molecules from one cell to another *via* membrane vesicle trafficking. To a lesser extent, 10 proteins regulated at the high dose belong to the cytoskeleton proteins, with 7 actin filaments/microfilaments, 1 intermediate filament and 2 microtubules.

### 2.3.2.3. Metabolome analysis

Among the 294 signals selected from the blocks MetaboNEG and MetaboPOS, 95 were annotated and reported in Table S1. Many signals were annotated at level 2, some of them with several potential annotations, while 4 metabolites were identified at level 1. 56 metabolites are significantly modulated (abundance modulation > 30 % and p-value < 0.05) at the low dose (SCvsLD) (42 up-

modulated and 14 down-modulated), while 67 metabolites were significantly modulated at the high dose (SCvsHD) (57 up-modulated and 10 down-modulated).

MetaCore is an integrated software suite for functional analysis of omics data, based on a high-quality, manually curated database. It allowed functional relationships between biological compartments to be efficiently considered. Hence, an over-representation analysis using MetaCore was performed for each CBZ dose exposure. For the 85 annotation IDs queried against MetaCore, 57 were mapped in pathways at the low dose, while 67 were mapped over the 90 annotation IDs queried at the high dose. The Top10 of over-represented pathways were reported for the low and high dose in Table 2.3. Consistent with proteomics results, amino acid metabolism is the most represented and significant metabolic pathway at both doses. Interestingly, both doses also contain metabolites involved in neurotransmission, energy metabolism, apoptosis and nucleotide metabolism, although these pathways were not significantly over-represented. The specific metabolic pathway or class compound assigned to each metabolite are provided in Table S1.

**Table 2.3:** Over-representation analysis of pathways based on metabolites modulated at the low and high carbamazepine doses.

	<b>Pathways</b>	<b>p-value</b>	<b>FDR</b>	<b>Ratio</b>
<i>SCvsLD (80 ng/L)</i>				
1	Amino acid metabolism and its regulation	2.58E-06	8.24E-05	12/1196
2	Nicotine action	1.79E-02	2.87E-01	3/252
3	Metabolic diseases	3.44E-02	3.67E-01	11/2875
4	Nucleotide metabolism and its regulation	5.99E-02	4.78E-01	3/405
5	Retinoid signaling	7.47E-02	4.78E-01	2/203
6	Neurotransmission	9.18E-02	4.90E-01	5/1100
7	Energy metabolism and its regulation	1.63E-01	7.44E-01	5/1317
8	Apoptosis	2.79E-01	9.99E-01	6/1996
9	Vasoconstriction	4.25E-01	9.99E-01	2/643
10	Nuclear receptor signaling	4.85E-01	9.99E-01	2/721
<i>SCvsHD (8 µg/L)</i>				
1	Amino acid metabolism and its regulation	1.13E-08	4.30E-07	17/1196
2	Metabolic diseases	2.11E-03	4.00E-02	17/2875
3	Neurotransmission	4.62E-02	5.85E-01	7/1100
4	Energy metabolism and its regulation	1.01E-01	9.61E-01	7/1317
5	Nicotine action	1.81E-01	1.00E+00	2/252
6	Xenobiotic Metabolism and its regulation	2.42E-01	1.00E+00	2/306
7	Cholesterol and bile acid homeostasis	2.59E-01	1.00E+00	3/576
8	Nucleotide metabolism and its regulation	3.55E-01	1.00E+00	2/405
9	Apoptosis	4.16E-01	1.00E+00	7/1996
10	Inflammatory diseases	5.67E-01	1.00E+00	3/949

Among the amino acid metabolism, the phenylalanine metabolism, the tyrosine as well as the catecholamines metabolism, the tryptophan metabolism and the arginine and proline metabolism were the most represented. The phenylalanine amino acid was significantly up-modulated at the low (+64 %) and the high (+34 %) dose. This amino acid is the precursor of the tyrosine amino acid. Although tyrosine was detected but not modulated (results not shown), several annotated metabolites belonging to its metabolic pathway, especially to the catecholamines pathway, were modulated. For example, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, a dopamine metabolite, is down-modulated (-61 %) at the low dose. From the tryptophan metabolism, indoleacetaldehyde was up-modulated at the low (+31 %) and, to a lesser extent, the high (+21 %) dose, as well as L-3-hydroxykynurenine, up-modulated (+99 %) at the high dose.

Concerning the nucleotide metabolism, purine compounds were significantly modulated at the low dose such as glycineamideribotide (-62 %) and the methylated purine base 1-methylinosine (+121 %). At the high dose, xanthine was significantly up-modulated (+63 %), while adenosine (+57 %; p-value = 0.052) and 1-methylinosine (+153 %; p-value = 0.052) tends to be up-modulated.

Other metabolites such as the neurotransmitter acetylcholine was down-modulated (-35 %) only at the low dose. Propionylcholine, which can be hydrolysed to generate propionic acid and choline, a precursor of acetylcholine, was also down-modulated at the low dose (-42 %) while it tends to be down-modulated at the high dose (-30 %; p-value = 0.083). A metabolite of vitamin E (tocopherol), gamma-CEHC, was up-regulated (+118 %) only at the low dose. Vitamin E is known as an important antioxidant. Several annotated metabolites as dipeptides, from the catabolism of proteins, were up-modulated at both low and high doses.

Several annotated metabolites did not match to any of the MetaCore metabolic pathways. A large part of these metabolites, modulated either at the low dose, the high dose or both, belongs to the lipid metabolism. As reported in Table S1, the main compound classes of modulated lipids were fatty acids, branched fatty acids, fatty esters, acyl carnitines and acyl glycines.

#### 2.3.2.4. Global analysis of metabolic pathways integrating impacted proteins and metabolites

In order to visualize interactions between the proteomics and metabolomics results, a global analysis of metabolic pathways mapping all the disrupted metabolites and proteins together was performed at each dose of CBZ exposure. Because all metabolites and proteins are not systematically assigned to a KEGG ID as well as to a metabolic pathway, this global analysis was done with less compounds than expected. Hence, 19 metabolite annotations (out of the 78 submitted to KEGG pathway) and 29 protein annotations (out of the 147 submitted) were mapped at the low dose (Figure

2.8). While for the high dose, 21 metabolite annotations (out of the 69 submitted) and 39 protein annotations (out of the 205 submitted) were mapped (Figure 2.9). These limited assignment rates indicate a partial representation of the biochemical processes disturbed by the CBZ. To complement, common metabolic pathways shared between modulated metabolites and regulated proteins were detailed in Table 2.4, even for compounds that cannot be mapped on Figures 2.8 and 2.9. However, since no metabolic pathways database exist for bivalve molluscs or marine invertebrates, metabolic pathways known from human were used for the analysis, that can lead to approximate pathways.

*CBZ exposure at the low dose (80 ng/L)* – Majority of mapped metabolites belongs to the amino acid metabolism. As highlighted by the global metabolic pathways analysis (Figure 2.8), modulation of phenylalanine is consistent with the up-regulation of two enzymes, aspartate aminotransferase involved in the conversion of phenylpyruvate to phenylalanine, and phenylalanine-4-hydroxylase which converts phenylalanine to tyrosine. Although the latter is not seen as modulated at this precise moment, tyrosine is the precursor of catecholamine neurotransmitters (e.g. dopamine, metanephrine, norepinephrine, etc.). Therefore, a low dose of CBZ could have an impact on catecholamines metabolism by disrupting phenylalanine and subsequently the tyrosine metabolism. This hypothesis is also supported by the modulation of the dopamine metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde, and possibly of a dopamine derivative, N-acetyldopamine. Two metabolites that tend to be up-modulated, alpha-ketoisovaleric acid and (S)-3-hydroxyisobutyric acid, as well as the up-regulated enzyme methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, share the same pathway of the valine, leucine and isoleucine degradation. In addition, two regulated proteins (betaine--homocysteine S-methyltransferase 1-like isoform X1 and aspartate aminotransferase) and the up-modulated metabolite 5'-methylthioadenosine have in common the cysteine and methionine metabolism. Among the rest of the amino acid metabolism, no more overlapping can be observed between the regulated proteins and the modulated metabolites on Figure 2.8.

Concerning the nucleotide metabolism, the observed modulation of purine compound cannot be explained by the mapped regulated proteins. An up-regulation of the xanthine dehydrogenase/oxidase responsible for the conversion of hypoxanthine to xanthine and then to uric acid was observed, while xanthine was detected but not modulated at the low dose.

Carbohydrate metabolism, in close relation with energy metabolism, presents several up-regulated proteins involved in the pentose phosphate pathway (transketolase-like protein 2 isoform X1), starch and sucrose metabolism (glycogen debranching enzyme), ascorbate and aldarate metabolism (gluconolactonase), and fructose and mannose metabolism (phosphomannomutase). However, no metabolites in connection with these enzymes were observed, excepted for the gulonic

acid (+68 %) that can be converted to L-gulonono-1,4-lactone by the gluconolactonase. Probably because of our extraction method that is not suited to these compounds.

Lipid metabolism was mainly characterized by the down-regulation of the enzyme long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, actively involved in fatty acid degradation in mitochondria. To complement the Figure 2.8, five unmapped metabolites from the fatty acid degradation or biosynthesis pathways were provided in Table 4. Furthermore, several modulated metabolites belonging to the class of fatty acids were also reported in Table S1, meaning that a low dose of CBZ induces changes in lipid metabolism. In addition, we observed a down-regulated protein, prostaglandin-H2 D-isomerase / glutathione transferase, involved in the arachidonic acid metabolism by converting prostaglandin H2 to prostaglandin D2. Although these two metabolites were not detected, a signal with two possible annotations, prostaglandin G2 or 6-ketoprostaglandin E1, was nevertheless assigned to the arachidonic acid metabolism. Arachidonic acid is the precursor of the eicosanoid family including prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes. The metabolite 11-dehydro-2,3-dinor-TXB2, derived from thromboxane compounds, tends to be up-modulated (Table 2.4).

*CBZ exposure at the high dose (8 µg/L)* – Visualization of the global metabolic pathway reveals a reinforcement of the metabolic disturbances observed at the lower dose (Figure 2.9).

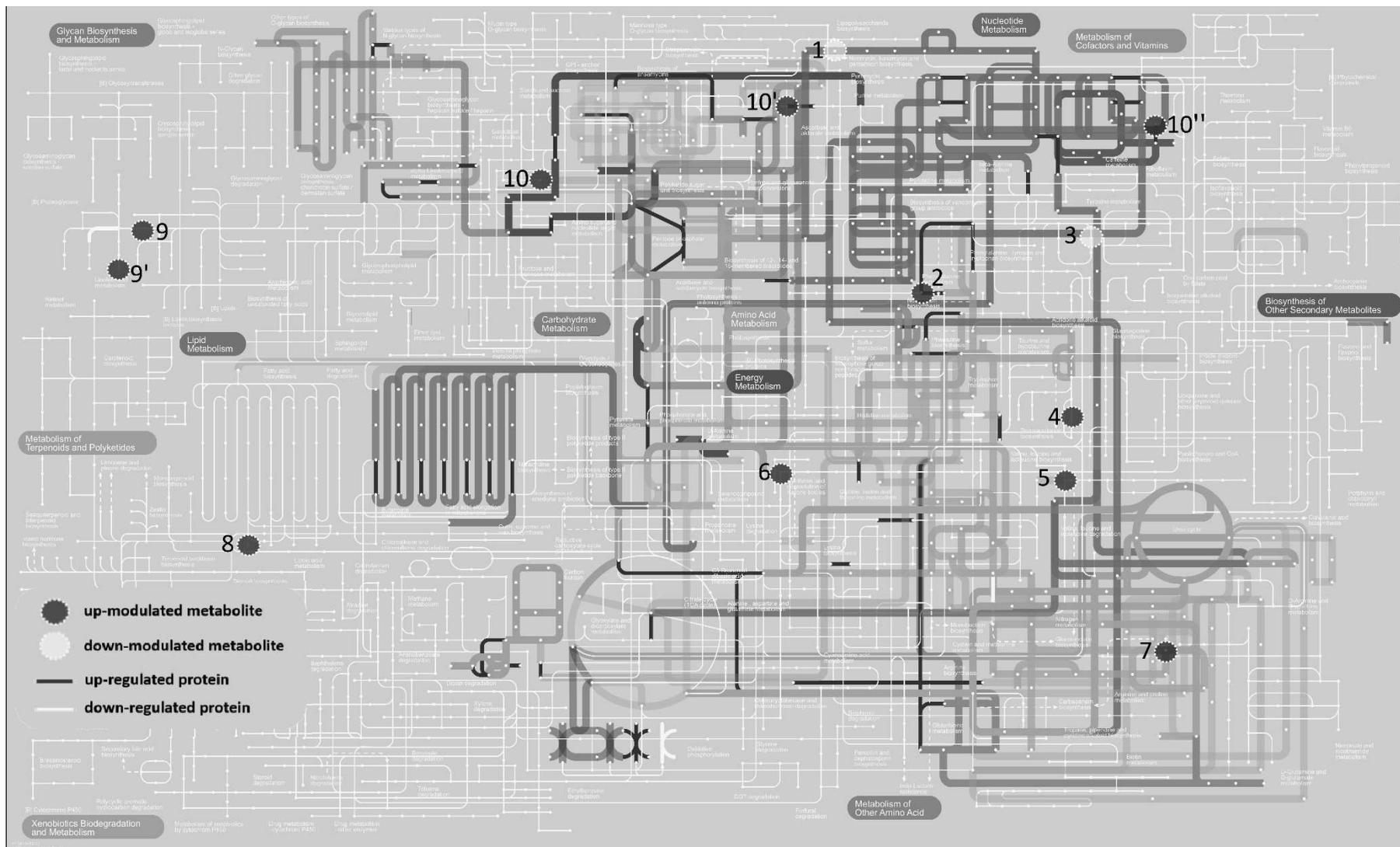
While the phenylalanine up-modulation was maintained, the catecholamine pathway seems even more disturbed with the up-regulation of two key enzymes, monoamine oxidase and alcohol dehydrogenase. These enzymes are responsible for the synthesis of the catecholamines dopamine, noradrenaline, adrenaline, normetanephrine and metanephrine. However, none of these catecholamines and their intermediates were modulated or detected. Nevertheless, another metabolite derived from catecholamines metabolism was modulated such as N-acetyldopamine (dopamine derivative). Other metabolic pathways shared between modulated metabolites and proteins at the high dose were detailed in Table 2.4, although differences with the low dose are minors.

In contrast with the disturbances at the low dose, the nucleotide metabolism was enzymatically more affected at the high dose of exposure (Figure 2.9 and Table 2.4). Indeed, four enzymes from the purine and pyrimidine metabolism (5'-nucleotidase, purine-nucleoside phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase, uridine phosphorylase), involved in several reactions, were up-regulated. Consequently, the two purine compounds related to these enzymatic reactions, adenosine and xanthine, were up-modulated. However, none of the pyrimidine compounds were modulated or detected.

Concerning the carbohydrate metabolism, the metabolic situation was sensitively similar to the low dose (Figure 2.9). In supplement, transketolase-like protein 2 isoform X1 from the pentose

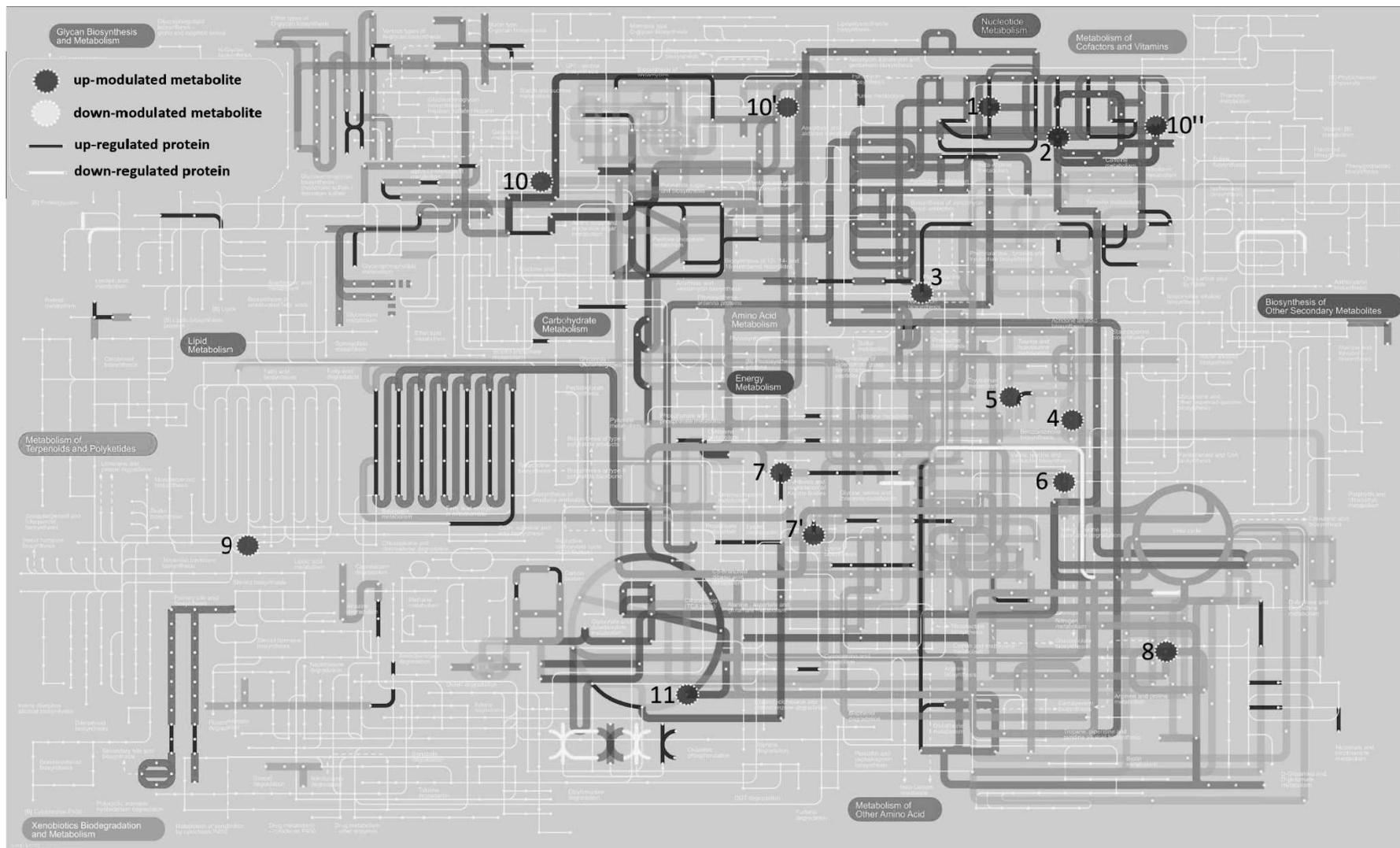
phosphate metabolism tends to be up-regulated. This enzyme is involved in a cascade of enzymatic reactions which one of the end product is D-erythrose 4-phosphate, involved in the synthesis of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine, tryptophan). However, D-erythrose 4-phosphate was not detected.

An intensification of the lipid metabolism can be observed. Fatty acid degradation takes an important place in response to the exposure at the high CBZ dose. The four different enzymes that complete the fatty acid degradation in mitochondria and peroxisome were up-regulated (acyl-coenzyme A oxidase 1; long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4-like; alcohol dehydrogenase class-3 isoform X1; peroxisomal bifunctional enzyme-like), while several modulated fatty acids were reported in Table S1. In addition, the peroxisomal multifunctional enzyme type 2 isoform X2 involved in unsaturated fatty acids metabolism and in primary bile acid biosynthesis was up-regulated. About the arachidonic acid metabolism, it was still disturbed at the high dose, with the down-regulation of carbonyl reductase 1 and the enzyme arachidonate 5-lipoxygenase that tends to be up-regulated, while the previous prostaglandin up-modulated at the low dose was not at the high dose. However, the thromboxane derivative 11-dehydro-2,3-dinor-TXB2 that tends previously to be up-modulated at the low dose was significantly up-modulated at the high dose.



- |  |  |  |  |
|--|--|--|--|
| <p><b>Purine metabolism</b></p> <p><b>1</b> glycineamide ribotide</p> <p><b>Phenylalanine metabolism</b></p> <p><b>2</b> phenylalanine</p> <p><b>Tyrosine metabolism</b></p> <p><b>3</b> 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde</p> | <p><b>Tryptophan metabolism</b></p> <p><b>4</b> indoleacetaldehyde</p> <p><b>Valine, leucine and isoleucine degradation</b></p> <p><b>5</b> alpha-Ketoisovaleric acid</p> <p><b>6</b> (S)-3-Hydroxyisobutyric acid</p> <p><b>Cysteine and methionine metabolism</b></p> <p><b>7</b> 5'-methylthioadenosine</p> | <p><b>Fatty acid biosynthesis</b></p> <p><b>8</b> octanoic acid</p> <p><b>Arachidonic acid metabolism</b></p> <p><b>9</b> prostaglandin G2</p> <p><b>9'</b> 6-ketoprostaglandin E1</p> | <p><b>Pentose and glucuronate interconversions / Ascorbate and aldarate metabolism</b></p> <p><b>10</b> galactonic acid</p> <p><b>10'</b> gluconic acid</p> <p><b>Caffeine metabolism</b></p> <p><b>10''</b> 1,7-Dimethyluric acid</p> |
|--|--|--|--|

**Figure 2.8:** Global metabolic pathways analysis based on significantly regulated proteins and modulated metabolites in digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* exposed to a low dose of carbamazepine (80 ng/L). Features with several annotations are marked with an apostrophe " ' " . 137



- |                                 |   |   |                            |
|---------------------------------|---|---|----------------------------|
| <b>Purine metabolism</b>        | <b>Valine, leucine and isoleucine degradation</b> | <b>Fatty acid biosynthesis</b>                  | <b>Caffeine metabolism</b> |
| 1 adenosine                     | 6 alpha-ketoisovaleric acid                       | 9 octanoic acid                                 | 10'' 1,7-Dimethyluric acid |
| 2 xanthine                      | 7 (S)-3-hydroxyisobutyric acid                    | <b>Pentose and glucuronate interconversions</b> | <b>Citrate cycle</b>       |
| <b>Phenylalanine metabolism</b> | 7' (R)-3-hydroxyisobutyric acid                   | 10 galactonic acid                              | 11 oxoglutaric acid        |
| 3 phenylalanine                 | <b>Cysteine and methionine metabolism</b>         | 10' gluconic acid                               |                            |
| <b>Tryptophan metabolism</b>    | 8 5'-methylthioadenosine                          |   |                            |
| 4 indoleacetaldehyde            |   |   |                            |
| 5 L-3-hydroxykynurenine         |   |   |                            |

**Figure 2.9:** Global metabolic pathways analysis based on significantly regulated proteins and modulated metabolites in digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* exposed to a high dose of carbamazépine (8 µg/L). Features with several annotations are marked with an apostrophe “'”.

**Table 2.4:** Regulated proteins and modulated metabolites involved in common metabolic pathways.

		SCvsLD (80 ng/L)		SCvsHD (8 µg/L)	
Metabolic pathways	Regulated proteins	Modulated metabolites		Regulated proteins	Modulated metabolites
<b>Carbohydrate metabolism</b>					
Ascorbate and aldarate metabolism	K01053 (gluconolactonase)	Galactonic acid or Gulonic acid			Galactonic acid or Gulonic acid; Oxoglutaric acid
Pyruvate metabolism	K00029 (NADP-dependent malic enzyme-like); K00049 (glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase)				<i>S-Lactoylglutathione</i>
<b>Lipid metabolism</b>					
Fatty acid metabolism	K00255 (long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial)	trans-Tetra-dec-2-enoic acid; <i>Stearic acid</i> ; trans-2-Octenoic acid; trans-Dec-2-enoic acid; <i>Octanoic acid</i>		K01897 (long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4-like); <i>K00121 (alcohol dehydrogenase class-3 isoform X1)</i> ; K00232 (peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1); K01897 (long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4-like); K07514 (peroxisomal bifunctional enzyme-like)	trans-Tetra-dec-2-enoic acid; <i>Stearic acid</i> ; trans-2-Octenoic acid; trans-Dec-2-enoic acid; Octanoic acid
Unsaturated fatty acids metabolism		5-Tetradecenoic acid; <i>Stearic acid</i>		K00232 (peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1); K12405 (peroxisomal multifunctional enzyme type 2 isoform X2)	5-Tetradecenoic acid; <i>Stearic acid</i>
Glycerophospholipid metabolism	K00006 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, NAD+)	Acetylcholine; <i>N-Methylethanolaminium phosphate</i>			
Arachidonic acid metabolism	K04097 (prostaglandin-H2 D-isomerase / glutathione transferase)	Prostaglandin G2 or 6-Ketoprostaglandin E1; <i>Indan-1-ol</i> ; <i>11-dehydro-2,3-dinor-TXB2</i>		K00079 (carbonyl reductase 1); <i>K00461 (arachidonate 5-lipoxygenase-like isoform X1)</i>	<i>Indan-1-ol</i> ; 11-dehydro-2,3-dinor-TXB2
<b>Nucleotide metabolism</b>					
Purine metabolism	<i>K00106 (xanthine dehydrogenase/oxidase-like isoform X1)</i>	Glycineamideribotide		K00944 (GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial-like); K01081 (cytosolic purine 5'-nucleotidase-like); K03783 (purine nucleoside phosphorylase-like isoform X1)	<i>Adenosin</i> ; Xanthine

**Table 2.4** (continued)

Metabolic pathways	SCvsLD (80 ng/L)		SCvsHD (8 µg/L)	
	Regulated proteins	Modulated metabolites	Regulated proteins	Modulated metabolites
<b>Amino acid metabolism</b>				
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	K13566 (omega-amidase NIT2-like); K14454 (aspartate aminotransferase, cytoplasmic)			Oxoglutaric acid; 2-Ketoglutaric acid
Cysteine and methionine metabolism	K00544 (betaine--homocysteine S-methyltransferase 1-like isoform X1); K14454 (aspartate aminotransferase, cytoplasmic)	5'-Methylthioadenosine	<i>K01251 (adenosylhomocysteinase A)</i>	5'-Methylthioadenosine
Valine, leucine and isoleucine degradation	K01969 (methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial-like)	<i>alpha-Ketoisovaleric acid; (S)-3-Hydroxyisobutyric acid</i>	K07514 (peroxisomal bifunctional enzyme-like)	alpha-Ketoisovaleric acid; (S)-3-Hydroxyisobutyric acid
Lysine degradation		4-Trimethylammoniobutanoic acid	K07514 (peroxisomal bifunctional enzyme-like)	Oxoglutaric acid
Arginine biosynthesis	K14454 (aspartate aminotransferase, cytoplasmic)		K14677 (aminoacylase-1-like)	Oxoglutaric acid
Arginine and proline metabolism	K14454 (aspartate aminotransferase, cytoplasmic)	<i>Acetamidopropanal</i>	<i>K00274 (monoamine oxidase)</i>	4-Hydroxy-L-glutamic acid
Histidine metabolism			K20247 (L-cysteine desulfhydrase, chloroplasmic); <i>K00274 (monoamine oxidase)</i>	Oxoglutaric acid
Tyrosine metabolism	K14454 (aspartate aminotransferase, cytoplasmic); K07253 (phenylpyruvate tautomerase)	3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde; (R)-1,2-dimethyl-5,6-dihydroxy-tetrahydroisoquinoline; 1,2-Dehydrosalsolinol or N-Acetyldopamine	<i>K00121 (alcohol dehydrogenase class-3 isoform X1)</i> ; K07253 (phenylpyruvate tautomerase); <i>K00274 (monoamine oxidase)</i>	(R)-1,2-dimethyl-5,6-dihydroxy-tetrahydroisoquinoline; 1,2-Dehydrosalsolinol or N-Acetyldopamine
Tryptophan metabolism		Indoleacetaldehyde	K07514 (peroxisomal bifunctional enzyme-like); <i>K03781 (catalase)</i> ; <i>K00274 (monoamine oxidase)</i>	<i>Indoleacetaldehyde</i> ; L-3-Hydroxykynurenine
Phenylalanine metabolism	K00500 (phenylalanine-4-hydroxylase); K07253 (phenylpyruvate tautomerase); K14454 (aspartate aminotransferase, cytoplasmic)	Phenylalanine	K07253 (phenylpyruvate tautomerase); <i>K00274 (monoamine oxidase)</i>	Phenylalanine

**Table 2.4** (continued)

		SCvsLD (80 ng/L)		SCvsHD (8 µg/L)	
Metabolic pathways	Regulated proteins	Modulated metabolites		Regulated proteins	Modulated metabolites
<b>Metabolism of other amino acids</b>					
Glutathione metabolism	K04097 (prostaglandin-H2 D-isomerase / glutathione transferase)	<i>gamma-Glutamylalanine</i>		<i>K01255 (leucyl aminopeptidase)</i>	<i>S-Lactoylglutathione</i>
<b>Metabolism of cofactors and vitamins</b>					
Pantothenate and CoA biosynthesis	K01431 (beta-ureidopropionase)	<i>alpha-Ketoisovaleric acid</i>		<i>K00207 (dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]-like isoform X1)</i>	<i>alpha-Ketoisovaleric acid</i>
<b>Biosynthesis of other secondary metabolites</b>					
Caffeine metabolism	<i>K00106 (xanthine dehydrogenase/oxidase-like isoform X1)</i>	1,7-Dimethyluric acid			1,7-Dimethyluric acid; Xanthine

Significantly, up-modulated or down-modulated compounds are in blue or red, respectively, while compounds that tend to be modulated are in italic (*p*-value < 0.1). In black are proteins with a fold-change > 3 but a *p*-value > 0.1.

## 2.4. Discussion

### 2.4.1. Métabolisation de la CBZ chez la moule *M. galloprovincialis*

Les résultats de quantification de la CBZ dans les tissus mous confirment bien que les moules ont ingéré la CBZ et que l'exposition a bien eu lieu aux deux doses. En ce qui concerne la métabolisation de la CBZ par la moule, l'origine des métabolites détectés (EPOXY, 2OH-CBZ et 3OH-CBZ) ne peut pour le moment être confirmée suite à leur détection dans des aquariums exposés sans moule. L'hypothèse avancée serait que des traces de métabolites de la CBZ seraient présentes dans la solution d'exposition. Une analyse par LC-HRMS de la solution d'exposition est prévue pour confirmer ou non cette hypothèse. Toutefois, une telle métabolisation de la CBZ en EPOXY et 3OH-CBZ a déjà été reportée chez des bivalves (Abdelhafidh et al., 2018; Boillot et al., 2015).

Concernant l'investigation de métabolites encore non identifiés chez la moule, aucun signaux candidats n'a pu être mis en évidence. Les métabolites pouvant être à de très faibles concentrations, la sensibilité de l'instrument pourrait ne pas être suffisante pour les détecter. De plus, la technique d'extraction pourrait ne pas être favorable à certains composés comme par exemple les conjugués glucuronides. Bien que la formation de conjugués glucuronides ait déjà été renseignée pour certains xénobiotiques (Kurelec et al., 1986), il n'est cependant pas le processus métabolique le plus commun chez la moule (James, 1987).

Il serait intéressant d'effectuer cette même investigation dans la glande digestive de la moule. La probabilité de découvrir de nouveaux métabolites de la CBZ dans cet organe serait plus élevée, la glande digestive étant le haut lieu de métabolisation et de biotransformation des xénobiotiques chez *M. galloprovincialis* (Faggio et al., 2018).

### 2.4.2. Effets de la CBZ sur le protéome et le métabolome de la glande digestive de la moule *M. galloprovincialis*

La stratégie de fusion des données métabolomiques et protéomiques, via les approches MCUVE-PLS et consensus OPLS-DA, a pour but de mettre en évidence des signatures métaboliques et protéiques corrélées entre elles, afin d'étudier les éventuelles relations biologiques entre ces entités en réponse à l'exposition de la moule à une dose faible et une dose élevée de CBZ. Les deux modèles consensus OPLS-DA construits, comparant chacun la condition SC soit avec la condition faible dose (SCvsLD) soit avec la condition forte dose (SCvsLD), se sont révélés robustes avec un fort pouvoir de prédiction. La combinaison de ces deux modèles sous forme d'un SUS-plot nous a donc permis d'extraire les signaux les plus informatifs, en lien avec des schémas de modulation communs entre les deux doses ou bien spécifiques à chacune d'entre elles. La première information qu'il en ressort, est le

nombre plus important de protéines ou de métabolites sur-modulés, avec davantage de protéines spécifiques à la forte dose et peu communes entre les deux doses, tandis que le nombre de métabolites spécifiques à chaque dose est équitablement réparti, avec presque autant de métabolites modulés communs aux deux doses. Ces informations pourraient témoigner d'une certaine spécificité dans la réponse globale à chacune des doses d'exposition, avec davantage de perturbations au niveau des protéines à forte dose.

L'étape d'annotation des signaux sélectionnés a révélé une grande disparité entre les deux approches -omiques, pointant l'avance de la protéomique sur la métabolomique. Quand la protéomique a pu annoter la totalité des signaux d'intérêt avec un degré de certitude élevé, grâce à la construction d'un transcriptome de référence et à la disponibilité d'outils bioinformatiques et de bases de données, la métabolomique n'a pu en revanche annoter que 30 % des signaux sélectionnés, dont la majorité sont des annotations putatives (niveau 2 selon les critères de Sumner et al. (2007)) malgré la disponibilité d'une banque de standards analytiques interne au laboratoire d'environ 300 métabolites. Afin d'augmenter le degré de certitude des métabolites annotés, nous avons commandé une cinquantaine de standards analytiques supplémentaires, à réinjecter dans les mêmes conditions analytiques et sur le même instrument pour confirmation.

Les outils bioinformatiques pour replacer les protéines dans leur(s) contexte(s) biologique(s) sont également plus avancés, tandis que des outils équivalents ne sont pas toujours disponibles pour les métabolites. Nous avons donc dans un premier temps étudié séparément les effets de chacune des doses sur le protéome et sur le métabolome, avant d'investiguer les liens entre protéines et métabolites via des outils de visualisation des voies métaboliques.

La classification des protéines au sein des termes GO ou selon les bases de données KEGG, a permis de mettre en évidence des processus cellulaires et métaboliques largement concernés par les protéines régulées à faible ou forte dose. Ces processus englobent principalement la synthèse des protéines (trois fois plus intense en nombre de protéines régulés à la forte dose), le transport et le catabolisme (deux fois plus de protéines impliquées à la forte dose), la métabolisation des acides aminés et des glucides (de manière équivalente entre les deux doses), la dégradation des lipides (trois fois plus de protéines impliquées à plus forte dose), et la programmation de la mort cellulaire (trois fois plus de protéines concernées à la forte dose).

Une augmentation de la synthèse des protéines est exprimée par un certain nombre de protéines ribosomales sur-réglées dès la faible dose, mais en quantité plus importante à forte dose, impliquées dans le processus de traduction génétique (*translation*). L'étape suivant la traduction génétique, impliquant le repliement des protéines nouvellement synthétisées, le tri et la dégradation

des protéines malformées (*folding, sorting and degradation processes*), est également impactée à travers la régulation de protéines présentes dans le réticulum endoplasmique, de manière plus marquée à la forte dose. Cependant, aux deux doses, des protéines impliquées dans la prise en charge des protéines mal repliées ont été régulées, signifiant une augmentation du taux de protéines mal repliées à dégrader. Dans cette étude, les protéines observées appartiennent majoritairement à la famille des enzymes. Le rôle de la glande digestive étant la digestion, la dégradation et la transformation de la matière (exogène ou endogène), l'augmentation de la synthèse en protéines, et probablement du nombre de protéines malformées à dégrader, pourrait correspondre à une demande plus importante en enzymes pour assurer les processus de catabolisme suite à l'exposition à la CBZ.

Différents processus de transport et de catabolisme semblent surexprimés à faible dose et, dans une mesure plus importante, à forte dose. Comme décrit en Tableau 2.2, plusieurs protéines, principalement sur-régulées, interviennent dans l'internalisation de composés dans la cellule par endocytose/phagocytose, y compris dans la dégradation de composés via les phagosomes, les lysosomes, les peroxysomes, ou encore par autophagie.

En réponse à une exposition, les lysosomes contribuent chez les bivalves à la dégradation et détoxification des contaminants grâce à différentes enzymes (Martínez-Gómez et al., 2015). Parmi ces enzymes, les cathepsines sont souvent impliquées dans la détoxification des métaux ou des contaminants organiques (Milan et al., 2013; Venier et al., 2006). Dans notre étude, l'exposition à la faible et à la forte dose ont engendré la sur-régulation de la cathepsine B et d'une protéine cathepsin-like protein-4, tandis qu'une sous-régulation de la cathepsine L a été mesurée à la faible dose uniquement. Une étude récente a observé une surexpression du gène codant pour la cathepsine L dans les glandes digestives de moules *M. galloprovincialis*, exposées 3 jours à 6,3 µg/L de CBZ (proche de nos conditions d'exposition) (Brandts et al., 2018). Une exposition du bivalve marin *Ruditapes philippinarum* à 1 µg/L de CBZ pendant 28 jours a également entraîné une surexpression de ce même gène (Almeida et al., 2018). A des doses comparables de CBZ (0,1 µg/L et 10 µg/L) mais un temps d'exposition plus long (7 jours), Martin-Diaz et al. (2009) ont mesuré une diminution dose-dépendante de la stabilité des membranes de lysosomes d'hémocytes, prélevés dans la glande digestive de la moule *M. galloprovincialis*. Un changement de la perméabilité membranaire et de la taille des lysosomes sont deux des principales réponses des lysosomes à un stress environnemental chez les bivalves marins (Martínez-Gómez et al., 2015). Des marqueurs enzymatiques lysosomales de tels changements sont utilisés dans des programmes de biosurveillance, comme la N-acétyl-β-hexosaminidase, la phosphatase acide et la β-glucuronidase (Raftopoulou and Dimitriadis, 2012). Dans notre étude, une sur-régulation significative de la β-glucuronidase a été observée à la faible (fold-change = 3,1 ; p-value = 0.004) et la forte dose (fold-change = 2,3 ; p-value = 0.034), bien qu'elle n'ait

pas été sélectionnée par les modèles. Une modification de la stabilité membranaire des lysosomes ou de leur morphologie serait envisageable dans notre étude aux deux doses d'exposition. Une des causes pourrait être une perturbation de l'homéostasie des lipides et des protéines suite à des phénomènes d'oxydation.

Les peroxysomes et mitochondries jouent un rôle très important dans les phénomènes de  $\beta$ -oxydation des acides gras pour maintenir l'homéostasie des lipides chez les cellules eucaryotes (Schrader et al., 2015). En ce qui concerne la spécificité du substrat, les peroxysomes dégradent les acides gras à longue ou très longue chaîne (> C16) jusqu'à une longueur de chaîne de 6 à 8 atomes de carbone. Les acides gras dont la chaîne a été raccourcie sont ensuite exportés vers les mitochondries, qui métabolisent préférentiellement les acides gras à chaîne longue et courte. Ces réactions enzymatiques produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), dégradé ensuite par la catalase (Lawrence and Hemingway, 2008). Dans notre étude, une sur-régulation des enzymes peroxysomales et mitochondriales responsables de la  $\beta$ -oxydation des acides gras saturés et insaturés (ex. acyl-CoA oxydase ; long-chain acyl-CoA synthetase ; peroxisomal multifunctional enzyme type 2 isoform X2) a été observée, principalement à la forte dose, ainsi qu'une légère sur-régulation de la catalase. Conjointement à cela, les données métabolomiques ont également montré une perturbation du métabolisme des lipides et notamment des acides gras. En réponse à un certain nombre de composés endogènes et de xénobiotiques, les peroxysomes peuvent subir une prolifération massive, accompagnée généralement par l'induction de certaines activités enzymatiques peroxysomales, en particulier celles du système de  $\beta$ -oxydation des acides gras, tandis que la catalase peut ne pas être induite ou faiblement (Lawrence and Hemingway, 2008; Reddy and Mannaerts, 1994). Par conséquent, la prolifération des peroxysomes est considérée comme une source potentielle de stress oxydant pour les cellules, puisque les enzymes produisant des ROS sont induites dans une plus grande mesure que la catalase capable de détoxiquer les ROS (Nemali et al., 1989 ; Reddy and Lalwai, 1983), ce qui s'avère être le cas dans notre étude. Cette situation peut être encore accentuée quand les enzymes antioxydantes superoxyde dismutase et glutathion peroxydase sont inhibées dans les situations de prolifération des peroxysomes (Lawrence and Hemingway, 2008). Nos données protéomiques montrent que la superoxyde dismutase, la CuZn-superoxyde dismutase, la Mn-superoxyde dismutase ainsi que le glutathion peroxydase ne présentent aucun signe de régulation (résultats non présentés), présageant un stress oxydant accentué. Bien que l'induction de la prolifération peroxysomale ait déjà été observée dans les cellules de la glande digestive de *M. galloprovincialis* en réponse à des contaminants (Cajaraville and Ortiz-Zarragoitia, 2006), ce phénomène, à notre connaissance, n'a en revanche pas été décrit chez des invertébrés exposés à la CBZ. Des mesures plus ciblées sur la densité numérique et volumique des peroxysomes

ainsi que sur l'activité enzymatique de l'acyl-CoA oxydase permettraient de vérifier cette hypothèse (Cajaraville and Ortiz-Zarragoitia, 2006).

L'éventualité d'une suractivité ou d'un dysfonctionnement de certains organites comme les lysosomes, les peroxysomes et les mitochondries, dont l'une des conséquences est l'induction d'un stress oxydant, peut également être supportée par la sur-modulation significative du 4-hydroxynonéal (4-HNE) à la forte dose, l'un des métabolites majeurs issu de la peroxydation des lipides, bien que l'annotation de ce métabolite reste toutefois à confirmer. Des dommages membranaires par peroxydation lipidique ont déjà été occasionnés chez *M. galloprovincialis* exposé à la CBZ (Martin-Diaz et al., 2009; Tsiaka et al., 2013). De plus, il a été démontré que le 4-HNE est capable d'induire l'apoptose via différentes voies de signalisation dans des cellules de mammifères (Kutuk and Basaga, 2007). L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à des signaux émis, par exemple, suite à des dommages à l'ADN ou encore au dysfonctionnement de certains organites. Dans notre étude, plusieurs protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose ont été régulées de manière significative, ou tendancielle, à la forte dose, telles que la TNF ligand-like 1 (+164 % ; p-value = 0,042), la TNF ligand superfamily member 10 (+ 42 % ; p-value = 0,068), la caspase 2 (-25 % ; p-value = 0,067), la cathepsine B (+75 % ; p-value = 0.015) et la mitogen-activated protein kinase kinase 1 (+471 % ; p-value = 0,0015) (Abreu-Martin et al., 1999; Foghsgaard et al., 2001; Guo et al., 2002; Kumar, 2009). Tandis qu'à la faible dose, une régulation de la quinone oxidoreductase PIG3-like isoform X2 serait impliquée dans l'induction de l'apoptose en générant un stress oxydant (Porté et al., 2009). A cette même dose, une tendance à la sous-régulation de la caspase 2 (-32 % ; p-value = 0,059) et d'une sur-régulation de la cathepsine B (+ 49 % ; 0,081) ainsi qu'une sur-régulation significative de la mitogen-activated protein kinase kinase (+395 % ; p-value = 0.024) a également été observée, appuyant l'idée de l'induction d'une mort cellulaire programmée.

Les données protéomiques et métabolomiques convergent également dans le sens d'une modification du métabolisme des acides aminés à la faible comme à la forte dose d'exposition. En revanche, aucune voie métabolique ne semble significativement surreprésentée. La phénylalanine, seul acide aminé significativement modulé, peut être directement liée avec la sur-régulation de deux enzymes, la phénylalanine-4-hydroxylase et l'aspartate aminotransférase. Cet acide aminé est également le précurseur de la tyrosine, à son tour précurseur des catécholamines (ex. dopamine). Certaines données suggèrent que la CBZ peut altérer les fonctions de la dopamine, en augmentant la libération et le renouvellement de celle-ci, et provoquer des altérations des niveaux des monoamines (i.e. catécholamines et tryptamines) dans le cerveau de rat (Ambrósio et al., 2002). Dans notre étude, des métabolites en lien avec les catécholamines et les tryptamines ont été modulés à la faible dose

notamment. Cela concerne le 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde, produit lors de la désamination oxydative de la dopamine catalysée par la monoamine oxydase (sur-régulé à la forte dose, +212 %, mais de manière non significative), ou encore la N-acetyldopamine, mais également l'indoleacétaldéhyde, un métabolite de la tryptamine (métabolisme du tryptophane). Cependant, il est difficile d'imputer ces observations au mécanisme d'action de la CBZ, encore incertain à ce niveau.

Bien que les acides aminés et les métabolites intermédiaires de leur métabolisme peuvent être impliqués dans de nombreux processus et voies de signalisation, le métabolisme des acides aminés permet de fournir notamment les substrats pour la synthèse des protéines qui, comme le montre nos résultats, augmente en réponse à l'exposition. De plus, les acides aminés peuvent également servir à la production d'énergie, dont la demande peut-être plus importante en cas de stress chez les invertébrés (Sokolova et al., 2012). Cela pourrait être rapproché avec une modification du métabolisme des glucides, étroitement lié avec le métabolisme énergétique.

A la faible dose, une sur-régulation de l'acétylcholinestérase (+69 % ; p-value = 0,013 ; AChE) a été mesurée. Cette enzyme, largement utilisée comme biomarqueur d'effets neurotoxiques des contaminants, est responsable de la dégradation du neurotransmetteur acétylcholine en acide acétique et choline, permettant aux neurones cholinergiques de revenir à leur état de repos après leur activation par des influx nerveux. Les données métabolomiques ont également montré une sous-modulation de l'acétylcholine (-35 % ; p-value = 0,011), en accord avec les données protéomiques. A notre connaissance, aucune étude auparavant n'avait démontré une perturbation de l'activité de l'AChE chez la moule *M. galloprovincialis* exposée à une concentration environnementale de la CBZ. Une inhibition de l'activité de l'AChE a toutefois été mesurée dans la glande digestive du bivalve *R. philippinarum*, exposé 14 jours à des concentrations allant de 0,1 à 50 µg/L de CBZ (Aguirre-Martínez et al., 2016). Néanmoins, la sur-régulation de l'AChE et la sous-modulation de l'acétylcholine observées dans notre étude semblent exprimer une augmentation de l'activité enzymatique, un effet neurotoxique étant plutôt causé par une inhibition de l'activité de l'AChE.

L'analyse intégrée des données protéomiques et métabolomiques offre une vision détaillée des processus cellulaires et métaboliques modulés en réponse à la CBZ, témoignant d'un état de stress général des cellules de la glande digestive de *M. galloprovincialis*. L'induction d'un stress oxydant étant l'effet le plus souvent reporté de la CBZ chez les organismes non-cibles, cette étude pourrait donner davantage de précision sur les causes de ce stress à travers une éventuelle déstabilisation des membranes lysosomales, déjà démontré par d'autres études, mais également via une suractivité enzymatique des peroxysomes (voire d'une prolifération des peroxysomes) et des mitochondries, dont nos résultats apportent les premières preuves chez *M. galloprovincialis*. Comme montré dans cette

étude, et supporté par d'autres, la génération de ROS a pour conséquence une altération des membranes par peroxydation lipidique, et pourrait entraîner la mort programmée des cellules via l'apoptose. Ces effets cytotoxiques engendrés par la CBZ pourraient également expliquer la diminution de la viabilité cellulaire observée dans des études conduites sur les hémocytes de *M. galloprovincialis* traités 1h à différentes concentrations (0,01 ; 0,1 ; 1 ; 10 et 100 µg/L) (Tsiaka et al., 2013) ou sur des hémocytes de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* dès 96h de traitement à la plus faible dose testée 1 µg/L (Parolini et al., 2011), ayant pour conséquence un affaiblissement du système immunitaire. A ce stade d'interprétation des résultats, la CBZ ne semble pas opérer selon un mécanisme d'action spécifique mais plutôt par l'induction d'un stress général de la cellule. Ce stress est initié dès 3 jours d'exposition à une concentration environnementale (80 ng/L) mais de manière beaucoup plus avancée à plus forte dose (8 µg/L). Il serait intéressant de vérifier si une exposition prolongée à la faible dose induirait le niveau de stress atteint à la forte dose.

L'interprétation des données métabolomiques croisées avec les données protéomiques s'avère parfois difficile quand il s'agit d'expliquer les modifications d'un niveau par un autre. La coordination entre la modulation d'un métabolite et la régulation d'une protéine peut être contrainte par des phénomènes de rétrocontrôle ainsi que par l'échelle de temps qui les sépare. En effet, la concentration d'un métabolite peut moduler l'expression d'un gène, et les changements d'expression d'un gène peuvent engendrer une augmentation ou diminution de la concentration d'une enzyme ou d'une protéine régulatrice, affectant par la suite la concentration du métabolite (Bradley et al., 2009). En se basant sur la mesure simultanée des concentrations de métabolites et de transcrits ou protéines, différentes études ont abouti à des conclusions contradictoires sur la coordination des modifications observées entre les différents niveaux (Bradley et al., 2009). Certaines études ont affirmé que les transcrits et les métabolites sont substantiellement co-régulés (Hirai et al., 2005, 2004; Nikiforova et al., 2005), fournissant des exemples de corrélations cohérentes entre les enzymes biosynthétiques et leurs produits (Hirai et al., 2005). En revanche, d'autres études ont démontré que les profils des transcrits et des métabolites ont tendance à se comporter différemment (Gibon et al., 2006), et certaines ont fait valoir que les approches corrélatives ne sont pas suffisamment spécifiques pour tirer des conclusions sur les gènes et les métabolites fonctionnellement liés (Carrari et al., 2006; Urbanczyk-Wochniak et al., 2005). Nos observations sont partagées entre ces deux conclusions, avec d'un côté des protéines et métabolites co-régulés (ex. les enzymes peroxysomales et mitochondriales et les acides gras, la phénylalanine et la phenylalanine-4-hydroxylase, l'acétylcholinestérase et l'acétylcholine, etc.), et d'un autre côté des protéines et des métabolites dont les changements semblent non coordonnés ou isolés. En plus des phénomènes de rétrocontrôle et des échelles de temps qui peuvent expliquer ces derniers cas, il est également fort probable que l'accès partiel au

métabolome et au protéome ainsi que le manque de connaissances sur les interactions protéines-métabolites et protéines-protéines soient en cause.

### Aknowledgement & Funding

This research was funded by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement, et du Travail (AMeCE 2015/1/091) and the Agence Nationale de la Recherche (IMAP ANR-16-CE34-0006-01). The doctoral fellowship of Thibaut Dumas was financially supported by the Agence Nationale de la Recherche (IMAP ANR-16-CE34-0006-01). The authors are grateful to Céline Roques and Bénédicte Marion (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, France) for their technical support.

### 2.5. References

- Abdelhafidh, K., Ali, M., Hassen, K., Badreddine, S., Jaume, A., Sandra, P., Ethel, E., Damià, B., Hamouda, B., Ezzeddine, M., **2018**. Uptake and metabolism of carbamazepine (CBZ) by clam *Ruditapes decussatus* and its effects in biochemical responses. *Xenobiotica* 48, 727–733. <https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1354268>
- Abreu-Martin, M.T., Chari, A., Palladino, A.A., Craft, N.A., Sawyers, C.L., **1999**. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1 Activates Androgen Receptor-Dependent Transcription and Apoptosis in Prostate Cancer. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5143–5154. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.5143>
- Aguirre-Martínez, G.V., Buratti, S., Fabbr, E., DelValls, A.T., Martín-Díaz, M.L., **2013**. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. *J. Environ. Sci. China* 25, 1408–1418. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(12\)60207-1](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(12)60207-1)
- Aguirre-Martínez, G.V., DelValls, A.T., Laura Martín-Díaz, M., **2015**. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 120, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.036>
- Aguirre-Martínez, G.V., DelValls, T.A., Martín-Díaz, M.L., **2016**. General stress, detoxification pathways, neurotoxicity and genotoxicity evaluated in *Ruditapes philippinarum* exposed to human pharmaceuticals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.031>
- Almeida, A., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., **2014**. Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 156, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.002>
- Almeida, Â., Esteves, V.I., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., **2020**. Effects of Carbamazepine in Bivalves: A Review, in: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. *Springer International Publishing*, Cham, pp. 1–19. [https://doi.org/10.1007/398\\_2020\\_51](https://doi.org/10.1007/398_2020_51)
- Almeida, Â., Freitas, R., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Campos, B., Barata, C., **2018**. Effects of carbamazepine and cetirizine under an ocean acidification scenario on the biochemical and transcriptome responses of the clam *Ruditapes philippinarum*. *Environ. Pollut.* 235, 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.121>

- Alvarez-Muñoz, D., Huerta, B., Fernandez-Tejedor, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., **2015**. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. *Talanta* 136, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.035>
- Ambrósio, A.F., Soares-da-Silva, P., Carvalho, C.M., Carvalho, A.P., **2002**. Mechanisms of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochem. Res.* 27, 121–130. <https://doi.org/10.1023/A:1014814924965>
- Arpin-Pont, L., Bueno, M.J.M., Gomez, E., Fenet, H., **2016**. Occurrence of PPCPs in the marine environment: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4978–4991. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3617-x>
- Baumann, K., Stiefl, N., **2004**. Validation tools for variable subset regression. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 18, 549–562. <https://doi.org/10.1007/s10822-004-4071-5>
- Benotti, M.J., Brownawell, B.J., **2009**. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environ. Pollut.* 157, 994–1002. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.009>
- Boccard, J., Rudaz, S., **2014**. Harnessing the complexity of metabolomic data with chemometrics. *J. Chemom.* 28, 1–9. <https://doi.org/10.1002/cem.2567>
- Boccard, J., Rutledge, D.N., **2013**. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Anal. Chim. Acta* 769, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.022>
- Boillot, C., Martinez Bueno, M.J., Munaron, D., Le Dreau, M., Mathieu, O., David, A., Fenet, H., Casellas, C., Gomez, E., **2015**. In vivo exposure of marine mussels to carbamazepine and 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazepine: Bioconcentration and metabolization. *Sci. Total Environ.* 532, 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.067>
- Bonnefille, B., Gomez, E., Alali, M., Rosain, D., Fenet, H., Courant, F., **2018**. Metabolomics assessment of the effects of diclofenac exposure on *Mytilus galloprovincialis*: Potential effects on osmoregulation and reproduction. *Sci. Total Environ.* 613–614, 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.146>
- Bradley, P.H., Brauer, M.J., Rabinowitz, J.D., Troyanskaya, O.G., **2009**. Coordinated Concentration Changes of Transcripts and Metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Comput. Biol.* 5, e1000270. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000270>
- Brandts, I., Teles, M., Gonçalves, A.P., Barreto, A., Franco-Martinez, L., Tvarijonaviciute, A., Martins, M.A., Soares, A.M.V.M., Tort, L., Oliveira, M., **2018**. Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Sci. Total Environ.* 643, 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.257>
- Bylesjö, M., Rantalainen, M., Nicholson, J.K., Holmes, E., Trygg, J., **2008**. K-OPLS package: Kernel-based orthogonal projections to latent structures for prediction and interpretation in feature space. *BMC Bioinformatics* 9, 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-106>
- Cai, W., Li, Y., Shao, X., **2008**. A variable selection method based on uninformative variable elimination for multivariate calibration of near-infrared spectra. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 90, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2007.10.001>
- Cajaraville, M.P., Ortiz-Zarragoitia, M., **2006**. Specificity of the peroxisome proliferation response in mussels exposed to environmental pollutants. *Aquat. Toxicol.*, The Stavanger Workshop Biological Effects of Environmental Pollution (BEEP) in marine coastal ecosystem 78, S117–S123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.016>
- Calisto, V., Domingues, M.R.M., Erny, G.L., Esteves, V.I., **2011**. Direct photodegradation of carbamazepine followed by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. *Water Res.* 45, 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.037>
- Canzler, S., Schor, J., Busch, W., Schubert, K., Rolle-Kampczyk, U.E., Seitz, H., Kamp, H., von Bergen, M., Buesen, R., Hackermüller, J., **2020**. Prospects and challenges of multi-omics data integration in toxicology. *Arch. Toxicol.* 94, 371–388. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02656-y>
- Carrari, F., Baxter, C., Usadel, B., Urbanczyk-Wochniak, E., Zanol, M.-I., Nunes-Nesi, A., Nikiforova, V., Centro, D., Ratzka, A., Pauly, M., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., **2006**. Integrated Analysis of

- Metabolite and Transcript Levels Reveals the Metabolic Shifts That Underlie Tomato Fruit Development and Highlight Regulatory Aspects of Metabolic Network Behavior. *Plant Physiol.* 142, 1380–1396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088534>
- Chen, H., Diao, X., Wang, H., Zhou, H., **2018**. An integrated metabolomic and proteomic study of toxic effects of Benzo[a]pyrene on gills of the pearl oyster *Pinctada martensii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.040>
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., **2019a**. Acute and Chronic Toxicity of Carbamazepine on the Release of Chitinase, Molting, and Reproduction in *Daphnia similis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 209. <https://doi.org/10.3390/ijerph16020209>
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., Liang, X., Martyniuk, C.J., **2019b**. Carbamazepine disrupts molting hormone signaling and inhibits molting and growth of *Eriocheir sinensis* at environmentally relevant concentrations. *Aquat. Toxicol.* 208, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.010>
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N., **2004**. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* 38, 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.058>
- Cogne, Y., Degli-Esposti, D., Pible, O., Gouveia, D., François, A., Bouchez, O., Eché, C., Ford, A., Geffard, O., Armengaud, J., Chaumot, A., Almunia, C., **2019**. De novo transcriptomes of 14 gammarid individuals for proteogenomic analysis of seven taxonomic groups. *Sci. Data* 6, 184. <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0192-5>
- Darzi, Y., Letunic, I., Bork, P., Yamada, T., **2018**. iPath3.0: interactive pathways explorer v3. *Nucleic Acids Res.* 46, W510–W513. <https://doi.org/10.1093/nar/gky299>
- Dumas, T., Bocard, J., Gomez, E., Fenet, H., Courant, F., **2020a**. Multifactorial Analysis of Environmental Metabolomic Data in Ecotoxicology: Wild Marine Mussel Exposed to WWTP Effluent as a Case Study. *Metabolites* 10, 269. <https://doi.org/10.3390/metabo10070269>
- Dumas, T., Bonnefille, B., Gomez, E., Bocard, J., Castro, N.A., Fenet, H., Courant, F., **2020b**. Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to a WWTP effluent extract. *Sci. Total Environ.* 712, 136551. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136551>
- Fabbri, E., Franzellitti, S., **2016**. Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 799–812. <https://doi.org/10.1002/etc.3131>
- Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S., **2018**. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Sci. Total Environ.* 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., Jäätelä, M., **2001**. Cathepsin B Acts as a Dominant Execution Protease in Tumor Cell Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor. *J. Cell Biol.* 153, 999–1010. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.999>
- Franzellitti, S., Balbi, T., Montagna, M., Fabbri, R., Valbonesi, P., Fabbri, E., Canesi, L., **2019**. Phenotypical and molecular changes induced by carbamazepine and propranolol on larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 234, 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.045>
- Freitas, R., Almeida, Â., Calisto, V., Velez, C., Moreira, A., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Wrona, F.J., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., **2016**. The impacts of pharmaceutical drugs under ocean acidification: New data on single and combined long-term effects of carbamazepine on *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ.* 541, 977–985. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.138>

- Gibon, Y., Usadel, B., Blaesing, O.E., Kamlage, B., Hoehne, M., Trethewey, R., Stitt, M., **2006**. Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis rosettes*. *Genome Biol.* 7, R76. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-8-r76>
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., **2002**. Caspase-2 Induces Apoptosis by Releasing Proapoptotic Proteins from Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277, 13430–13437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108029200>
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A., **2013**. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hai, F.I., Yang, S., Asif, M.B., Sencadas, V., Shawkat, S., Sanderson-Smith, M., Gorman, J., Xu, Z.-Q., Yamamoto, K., **2018**. Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies. *Water* 10, 107. <https://doi.org/10.3390/w10020107>
- Hartmann, E.M., Allain, F., Gaillard, J.-C., Pible, O., Armengaud, J., **2014**. Taking the Shortcut for High-Throughput Shotgun Proteomic Analysis of Bacteria, in: Vergunst, A.C., O’Callaghan, D. (Eds.), Host-Bacteria Interactions: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. *Springer*, New York, NY, pp. 275–285. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1261-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1261-2_16)
- Hirai, M.Y., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Yamazaki, Y., Kanaya, S., Nakamura, Y., Kitayama, M., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., Papenbrock, J., Saito, K., **2005**. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics. *J. Biol. Chem.* 280, 25590–25595. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502332200>
- Hirai, M.Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T., Saito, K., **2004**. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10205–10210. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403218101>
- James, M.O., **1987**. Conjugation of Organic Pollutants in Aquatic Species. *Environ. Health Perspect.* 71, 97–103. doi:10.2307/3430417
- Ji, C., Li, F., Wang, Q., Zhao, J., Sun, Z., Wu, H., **2016**. An integrated proteomic and metabolomic study on the gender-specific responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* to tetrabromobisphenol A (TBBPA). *Chemosphere* 144, 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.052>
- Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D., Mallick, P., **2008**. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* 24, 2534–2536. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn323>
- Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T.R., Neumann, S., **2012**. CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets. *Anal. Chem.* 84, 283–289. <https://doi.org/10.1021/ac202450g>
- Kumar, S., **2009**. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat. Rev. Cancer* 9, 897–903. <https://doi.org/10.1038/nrc2745>
- Kurelec, B., Britvić, S., Krča, S., Zahn, R.K., **1986**. Metabolic fate of aromatic amines in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 91, 523–527. <https://doi.org/10.1007/BF00392604>
- Kutuk, O., Basaga, H., **2007**. Apoptosis signalling by 4-hydroxynonenal: a role for JNK-c-Jun/AP-1 pathway. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 12, 30–34. <https://doi.org/10.1179/135100007X162329>
- Lawrence, A.J., Hemingway, K.L., **2008**. Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses. *John Wiley & Sons*.
- Li, H.-D., Xu, Q.-S., Liang, Y.-Z., **2018**. libPLS: An integrated library for partial least squares regression and linear discriminant analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 176, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.03.003>

- Liu, H., Sadygov, R.G., Yates, J.R., **2004**. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* 76, 4193–4201. <https://doi.org/10.1021/ac0498563>
- Margot, J., Rossi, L., Barry, D.A., Holliger, C., **2015**. A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. *WIREs Water* 2, 457–487. <https://doi.org/10.1002/wat2.1090>
- Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., **2009**. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 94, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.06.015>
- Martínez Bueno, M.J., Boillot, C., Fenet, H., Chiron, S., Casellas, C., Gómez, E., **2013**. Fast and easy extraction combined with high resolution-mass spectrometry for residue analysis of two anticonvulsants and their transformation products in marine mussels. *J. Chromatogr. A* 1305, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.071>
- Martínez-Gómez, C., Bignell, J., Lowe, D., **2015**. Lysosomal membrane stability in mussels. (No. 56). *International Council for the Exploration of the Sea (ICES)*. <https://doi.org/10.25607/OBP-240>
- McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., Quinn, B., **2014**. A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *Sci. Total Environ.* 476, 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.123>
- Meng, C., Zeleznik, O.A., Thallinger, G.G., Kuster, B., Gholami, A.M., Culhane, A.C., **2016**. Dimension reduction techniques for the integrative analysis of multi-omics data. *Brief. Bioinform.* 17, 628–641. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv108>
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F., **2018**. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 140, 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>
- Milan, M., Pauletto, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., Marin, M.G., Matozzo, V., **2013**. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquat. Toxicol.* 126, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.007>
- Nemali, M.R., Reddy, M.K., Usuda, N., Reddy, P.G., Comeau, L.D., Rao, M.S., Reddy, J.K., **1989**. Differential induction and regulation of peroxisomal enzymes: Predictive value of peroxisome proliferation in identifying certain nonmutagenic carcinogens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 97, 72–87. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(89\)90056-2](https://doi.org/10.1016/0041-008X(89)90056-2)
- Nikiforova, V.J., Daub, C.O., Hesse, H., Willmitzer, L., Hoefgen, R., **2005**. Integrative gene-metabolite network with implemented causality deciphers informational fluxes of sulphur stress response. *J. Exp. Bot.* 56, 1887–1896. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri179>
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Yang, H., Dong, H., **2019**. Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.061>
- Oropesa, A.L., Floro, A.M., 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6907-7>
- Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A., **2011**. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere* 84, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.049>
- Porté, S., Valencia, E., Yakovtseva, E.A., Borràs, E., Shafqat, N., Debreczeny, J.E., Pike, A.C.W., Oppermann, U., Farrés, J., Fita, I., Parés, X., **2009**. Three-dimensional structure and enzymatic function of proapoptotic human p53-inducible quinone oxidoreductase PIG3. *J. Biol. Chem.* 284, 17194–17205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001800>

- Prichard, E., Granek, E.F., **2016**. Effects of pharmaceuticals and personal care products on marine organisms: from single-species studies to an ecosystem-based approach. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 22365–22384. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7282-0>
- Raftopoulou, E.K., Dimitriadis, V.K., **2012**. Aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, in relation to lysosomal enzymes, lipofuscin presence and shell size: Contribution in the assessment of marine pollution biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.12.017>
- Reddy, J.K., Lalwai, N.D., **1983**. Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *Crit. Rev. Toxicol.* 12, 1–58. <https://doi.org/10.3109/10408448309029317>
- Reddy, J.K., Mannaerts, G.P., **1994**. Peroxisomal Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 343–370. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.14.070194.002015>
- Schrader, M., Costello, J., Godinho, L.F., Islinger, M., **2015**. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 681–702. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9819-7>
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., **2006**. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., **2012**. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Steinmetz, V., Sévila, F., Bellon-Maurel, V., **1999**. A Methodology for Sensor Fusion Design: Application to Fruit Quality Assessment. *J. Agric. Eng. Res.* 74, 21–31. <https://doi.org/10.1006/jaer.1999.0428>
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reily, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., **2007**. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Sun, J., Zhou, Q., Hu, X., **2019**. Integrating multi-omics and regular analyses identifies the molecular responses of zebrafish brains to graphene oxide: Perspectives in environmental criteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.011>
- Ternes, T.A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., Joss, A., **2004**. A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* 38, 4075–4084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.015>
- Tian, Y., Xia, X., Wang, Jinhua, Zhu, L., Wang, Jun, Zhang, F., Ahmad, Z., **2019**. Chronic Toxicological Effects of Carbamazepine on *Daphnia magna* Straus: Effects on Reproduction Traits, Body Length, and Intrinsic Growth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 103, 723–728. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02715-w>
- Trapp, J., Armengaud, J., Pible, O., Gaillard, J.-C., Abbaci, K., Habtoul, Y., Chaumot, A., Geffard, O., **2015**. Proteomic Investigation of Male *Gammarus fossarum*, a Freshwater Crustacean, in Response to Endocrine Disruptors. *J. Proteome Res.* 14, 292–303. <https://doi.org/10.1021/pr500984z>
- Trapp, J., Gouveia, D., Almunia, C., Pible, O., Degli Esposti, D., Gaillard, J.-C., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., **2018**. Digging Deeper Into the Pyriproxyfen-Response of the Amphipod *Gammarus fossarum* With a Next-Generation Ultra-High-Field Orbitrap Analyser: New Perspectives for Environmental Toxicoproteomics. *Front. Environ. Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00054>
- Trygg, J., Wold, S., **2002**. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* 16, 119–128. <https://doi.org/10.1002/cem.695>
- Tsiaka, P., Tsarpali, V., Ntaikou, I., Kostopoulou, M.N., Lyberatos, G., Dailianis, S., **2013**. Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology* 22, 1208–1220. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1108-3>

- Urbanczyk-Wochniak, E., Baxter, C., Kolbe, A., Kopka, J., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., **2005**. Profiling of diurnal patterns of metabolite and transcript abundance in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Planta* 221, 891–903. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1483-y>
- Venier, P., De Pittà, C., Pallavicini, A., Marsano, F., Varotto, L., Romualdi, C., Dondero, F., Viarengo, A., Lanfranchi, G., **2006**. Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 602, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.08.007>
- Want, E.J., Masson, P., Michopoulos, F., Wilson, I.D., Theodoridis, G., Plumb, R.S., Shockcor, J., Loftus, N., Holmes, E., Nicholson, J.K., **2013**. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat. Protoc.* 8, 17–32. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.135>
- Wille, K., Kiebooms, J.A.L., Claessens, M., Rappé, K., Vanden Bussche, J., Noppe, H., Van Praet, N., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., **2011**. Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1459–1472. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4878-6>
- Wright, J.C., Choudhary, J.S., **2016**. DecoyPyrat: Fast Non-redundant Hybrid Decoy Sequence Generation for Large Scale Proteomics. *J. Proteomics Bioinform.* 9, 176–180. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000404>
- Zhang, Y., Geißen, S.-U., Gal, C., **2008**. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>

## 2.6. Supplementary data

The following are available online at <https://drive.google.com/file/d/1SOc3mZ1Dx2-7WLCKRWH2bf1ch664tyPi/view?usp=sharing>, Table S1: Annotation and identification of relevant metabolites selected according to the SUS-plot, modulated by CBZ exposure in male mussels either at the low dose, high dose, or both. Table S2: Annotation of relevant proteins selected according to the SUS-plot, regulated by CBZ exposure in male mussels either at the low dose, high dose, or both.

# Chapitre 3

---

Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endométrabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

## 1. Introduction et présentation de l'article n°2

Etudier la relation de cause à effet d'une exposition à un PP seul est essentiel pour comprendre les mécanismes et modes d'action de la molécule sur l'organisme. Toutefois, pour comprendre l'impact de la contamination dans son intégralité, il est nécessaire de considérer une diversité réaliste de molécules qui caractérise la contamination telle qu'elle est dans l'environnement, car en effet, les PP co-existent avec une multitude de contaminants présents simultanément dans le milieu. Comme expliqué en Chapitre 1, les PP sont introduits en continu dans le milieu marin principalement *via* les effluents de STEP, en même temps qu'une large diversité de contaminants. Ces rejets sont ainsi représentatifs de la pollution des milieux aquatiques et constituent donc des échantillons environnementaux pertinents pour étudier l'impact de la contamination anthropique sur les organismes marins.

Cet article a pour objectif d'étudier les effets de la contamination représentative du milieu marin, en lien avec la problématique des PP, sur la moule méditerranéenne, et ce, à travers une approche métabolomique non-ciblée. Pour y parvenir, une exposition de la moule *M. galloprovincialis* à un extrait d'effluent de STEP (dilué au 1/20<sup>ème</sup>) pendant 7 jours a été mise en place dans des conditions contrôlées de laboratoire. Afin d'éliminer des composés de l'effluent susceptibles d'être des nutriments pour les moules, le rejet de STEP collecté a été purifié sur cartouche SPE. La méthode employée a favorisé la concentration des contaminants polaires à moyennement polaires comme par exemple les PP, suspectés d'être fortement présents dans les effluents collectés à la sortie d'une STEP en milieu urbain (480 000 équivalent habitant).

L'étude de l'endo-métabolome par une analyse non-ciblée en LC-HRMS a été réalisée afin d'identifier, sans *a priori*, les métabolites dont l'abondance est sur- ou sous-modulée en réponse à l'exposition. De telles modifications de l'endo-métabolome ont ensuite été interprétées pour proposer des hypothèses, construites sur la base de la littérature, quant aux causes biochimiques de ces changements et aux conséquences physiologiques que cela aurait sur l'organisme.

Afin de définir au mieux les relations de cause à effet, nous avons caractérisé le rejet de STEP en se basant sur une liste de 80 contaminants (principalement des PP et des pesticides ainsi que leurs métabolites). A travers les résultats de la caractérisation du rejet et d'une étude bibliographique approfondie, nous avons pu enrichir la discussion en émettant des hypothèses sur les liens entre les effets observés par notre approche métabolomique et les effets renseignés dans la littérature des contaminants détectés dans notre rejet (ou susceptibles de l'être mais non recherchés car standard analytique non disponible au laboratoire pour confirmation).

Du fait de leur richesse d'information, seules les données métabolomiques générées chez les organismes mâles ont été présentées dans cette étude. Les mâles pouvant avoir une réponse

biologique à l'exposition différente de celle des femelles, il est en effet important de distinguer le traitement des données selon le sexe des organismes afin de ne pas introduire de biais dans l'interprétation des résultats. L'intégration du facteur genre dans le design expérimental ainsi que dans le traitement des données sera considéré dans l'article n°3 (Chapitre 4) à travers une approche statistique originale.

2. Article n°2

**Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to a WWTP effluent extract**

Thibaut Dumas <sup>a</sup>, Bénilde Bonnefille <sup>a</sup>, Elena Gomez <sup>a</sup>, Julien Boccard <sup>b</sup>, Nancy Ariza Castro <sup>a,c</sup>,  
Hélène Fenet <sup>a</sup>, Frédérique Courant <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Hydrosiences Montpellier, University of Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France

<sup>b</sup> Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland, University of Geneva, Geneva 1211, Switzerland

<sup>c</sup> Escuela de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 159-7050, Costa Rica

\* Corresponding author at: HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, University of Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier, France. E-mail address: frederique.courant@umontpellier.fr

Published in *Science of The Total Environment*, 7 January 2020, 712, pp. 136551 (Impact Factor: 6.551)

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136551>

Abstract

Conventional wastewater treatment plants (WWTPs) discharge a highly diverse range of organic contaminants in aquatic environments, including marine waters. The health of marine ecosystems could be threatened by contaminants release. Environmental metabolomics can be helpful to assess the effects of multi-contamination on marine organisms without any a priori information since it is able to provide meaningful information on the biochemical response of organisms to a stress. The aim of the present study was to evaluate the potential of metabolomics to highlight key metabolites disrupted by a WWTP effluent extract exposure and then elucidate the biological effects of such exposure on Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Exposed male mussels showed numerous metabolites altered in response to WWTP effluent exposure. The highlighted metabolites belong mainly to amino acids metabolism (e.g. tyrosine, phenylalanine, leucine, proline, etc.), neurohormones (dopamine and a serotonin metabolite), purine and pyrimidine metabolism (e.g. adenosine, adenine, guanine, uracil, etc.), citric acid cycle intermediates (e.g. malate, fumarate), and a component involved in oxidative stress defense (oxidized glutathione). Modulation of these metabolites could reflect the alteration of several biological processes such as energy metabolism, DNA and RNA synthesis, immune system, osmoregulation, byssus formation and reproduction, which may lead to a negative impact of organism fitness. Our study provided further insight into the effects of WWTP effluents on marine organisms.

## 2.1. Introduction

Conventional wastewater treatment plants (WWTPs) are not yet able to completely remove organic contaminants (Bolong et al., 2009; Deblonde et al., 2011; Loos et al., 2013). Hence, numerous contaminants are discharged in the aquatic environment, including a highly diverse range of pharmaceutically active compounds (PhACs), pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, plasticizers, etc. (Fent et al., 2006; Kolpin et al., 2002; Loos et al., 2013). However, wastewater volumes have been rising proportionately to the quickly growing global human population (Sato et al., 2013). Due to the high demographic pressure, coastlines are affected by the discharge of contaminants through the development of WWTP sea outfalls and also by the rivers discharging in the area. Marine organisms are then chronically exposed to low concentrations (ng-µg/L) of a mixture of contaminants (dos Santos et al., 2018; Vidal-Dorsch et al., 2012). Moreover, the coastal environment, especially transition zones between continental and marine waters, constitute key environments for the breeding of many species and biodiversity conservation. The health of those important ecosystems could be threatened by contaminants release.

So far, scientific evidence has highlighted the bioaccumulation and toxicological effects of contaminants carried through WWTP effluents in the aquatic environments (Dodder et al., 2014; Fent et al., 2006; Mezzelani et al., 2018a; Picot Groz et al., 2014; Sánchez-Avila et al., 2012). WWTP effluents effects are mostly described on freshwater organisms, showing endocrine disruption, impacts on immune and reproductive system, neurotoxicological effects, oxidative stress induction, survival and growth reduction (Bouchard et al., 2009; Gagné et al., 2007, Gagné et al., 2004; Gillis et al., 2014; Nobles and Zhang, 2015). New approaches are needed to evaluate these various effects of multi-contamination, without preconceived assumptions about the expected effects.

Recent studies have shown the interest of omics approaches to highlight effects from multi-contamination, either metabolomics (Berlioz-Barbier et al., 2018; David et al., 2017; Simmons et al., 2017), transcriptomics (Ings et al., 2011) or proteomics (Bebianno et al., 2016; Simmons et al., 2017). Among them, metabolomics is an efficient approach to assess the health status of organisms based on the identification of low molecular weight metabolites (50–1500 Da), whose production and levels vary with the physiological, developmental or pathological state of cells, tissues, organs or whole organisms (Courant et al., 2014; Lin et al., 2006). Hence, environmental metabolomics is commonly applied to more deeply investigate and unravel the unknown toxicological effects and mechanisms of single contaminants or mixtures (Lankadurai et al., 2013; Lin et al., 2006; Miller, 2007). As an example of metabolomics application in the case of a multi-contamination, David et al. (2017) identified changes in the exposome and metabolome of roaches (*Rutilus rutilus*) exposed for 15 days to a WWTP effluent. They revealed the bioaccumulation of 31 PhACs and metabolites of biodegradation in plasma and

tissues. Meanwhile, they demonstrated that effluent exposure resulted in a reduction in prostaglandin levels, as well as tryptophan/serotonin, bile acid and lipid metabolism disruption in fish. Such studies will likely advance our understanding of the link between exposure to complex mixtures of contaminants and their adverse effects, by its ability to screen alterations of multiple metabolic pathways. Moreover, it could constitute a first step forward by highlighting key events that may result in adverse outcomes which could be further used in risk assessment and environmental monitoring (Bundy et al., 2009; Martyniuk, 2018; Van Aggelen Graham et al., 2010).

In marine ecotoxicology and biomonitoring, *Mytilus* spp. mussels are extensively used as wild species to assess environmental health, especially the impact of chemical contamination in estuarine and coastal ecosystems (Farcy et al., 2013; Fasulo et al., 2012). This is due to their wide geographical distribution, sessility, ability to tolerate a range of environmental conditions and suitability for caging experiments at field sites (Fasulo et al., 2012). Furthermore, mussels can tolerate and accumulate xenobiotics in their tissues at levels higher than those present within the aquatic environment (Faggio et al., 2018). In studies conducted in field, it is difficult to establish causal relationships between effects and particular contaminants, because of the multitude of interacting environmental factors (abiotic factors, food availability, predation pressure, etc.). Laboratory experiments are then sometimes necessary for first reducing confounding factors and understand how organisms respond to contaminants.

The aim of the present study was to evaluate the potential of metabolomics to highlight key metabolites disrupted by WWTP effluent exposure and then elucidate the biological effects of such exposure on Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Mussels were exposed for 7 days to a WWTP effluent extract corresponding to an environmental dilution of 5%. Metabolic fingerprints were generated from control and exposed organisms by liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) and processed to highlight potential metabolic alterations. Disrupted metabolites along with their metabolic pathways were then linked to biological effects on this organism. Moreover, the WWTP effluent extract was chemically characterized to better understand these observed effects, based on the screening of 80 contaminants.

## 2.2. Materials & Methods

### 2.2.1. Chemicals

Ultrapure water was generated by a Simplicity UV system from Millipore (Bedford, MA, USA) with a specific resistance of 18.2 M $\Omega$ .cm at 25 °C. Pesticide analytical-grade solvents (methanol, dichloromethane and ethanol) and LC/MS grade solvents (water, acetonitrile, formic acid 99%) were from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Analytical pure standards used for identification at level one (Sumner et al., 2007) were obtained from the four following suppliers: Sigma-Aldrich (now part of Merck), Santa Cruz Biotechnology, Toronto Research Chemicals and LGC Standards.

### 2.2.2. WWTP effluent extract preparation

24-h composite samples were collected over 3 days for a total of 15 L of effluent from an urban WWTP (470,000 population equivalent) in Hérault (France). Since PhACs consumption has been rising during the last decades, they may constitute a large class of contaminants present in the WWTP effluent. The following WWTP effluent preparation was focused on the extraction of dissolved hydrophilic compounds.

After filtration through GF/C filters (1.2  $\mu$ m), effluent (15 L) was concentrated on 30 SPE cartridges (Oasis HLB 500 mg, 6 cc) which allow extracting soluble substances from medium to high polarity. The cartridges were conditioned with 5 mL methanol and 5 mL distilled water. 500 mL of WWTP effluent was deposited on each cartridge. The cartridges were then washed (5 mL Milli Q water), dried and eluted each with 2  $\times$  5 mL of methanol. The eluate of all cartridges were evaporated until 3 mL of concentrated extract was obtained. In addition, two cartridges were also prepared in the same condition, substituting effluent by 500 mL Milli Q water deposited on each cartridge, to get an analytical blank.

The solution (for exposure experiment) was prepared extemporaneously every day from 20  $\mu$ L of concentrated extract to which 80  $\mu$ L of methanol was added. In order to obtain a final effluent dilution of 5% in the aquarium, 100  $\mu$ L of the solution was added to 2 L of seawater during exposure.

### 2.2.3. Animals and experimental design

*Mytilus galloprovincialis* mussels (n = 50) were obtained from a Mediterranean Sea mussel culture (Bouzigues, France) in April 2016. Mussels were cleaned and uniformly selected according to their shell size (5.3–7.5 cm). They were randomly distributed in 10 glass aquaria (five mussels *per* glass aquarium) with 2 L of filtered seawater (which is provided, and already filtered, sterilized and degassed, by IFREMER Palavas, France). During a 7-day acclimatization period, filtered seawater was continuously aerated and renewed daily (static renewal). After 7 days, five aquaria (n = 25 mussels)

underwent solvent control exposure (SC, 100  $\mu$ L absolute methanol) and five aquaria (n = 25 mussels) underwent WWTP solution exposure (20  $\mu$ L WWTP extract and 80  $\mu$ L methanol). SC and WWTP solutions were added at the same time after daily water renewal over a 7-day exposure period. Seawater (150 mL) was sampled in each glass aquarium every day. Aquaria pH, temperature and oxygen concentration were checked daily during the experiment. The temperature was maintained at  $14 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and salinity at 36.5 g/L. Mussels were fed once daily with the marine green alga *Tetraselmis suecica* (Greensea, Mèze, France) at constant density (10,000 cells/mL). On the last day, no dead mussels were recorded. The two groups of mussels were collected at the same time for dissection and sex microscopy determination (for SC exposure n = 10 males, n = 12 females and n = 3 undifferentiated; for WWTP effluent exposure n = 15 males and n = 10 females). Digestive glands were frozen at  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . The present study was performed on male mussels, with 9 having SC exposure and 10 WWTP effluent exposure. Shell size was not significantly different between the two groups (p = 0.51; result not shown).

#### 2.2.4. Tissue sample preparation

The tissue sample preparation technique was previously described by Bonnefille et al. (2018). Briefly, 30 mg dry weight ( $\pm 0.25$  mg) of sample digestive gland tissue was extracted in two steps according to the biphasic mixture methanol/dichloromethane/water in a volume ratio of 16/16/13 respectively. First step: 240  $\mu$ L of methanol + 75  $\mu$ L of water were added into each sample and vortexed for 60 s. Second step: 240  $\mu$ L of dichloromethane +120  $\mu$ L of water were added and then vortexed again. After a 15 min rest at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , the samples were vortexed and then centrifuged (2000 $\times g$ ; 15min;  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). 50  $\mu$ L of supernatant (polar phase) was collected in a glass tube. The extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted in 200  $\mu$ L acetonitrile/water (5/95; v/v) and filtered directly into an analysis vial using a 0.20  $\mu$ m PTFE syringe filter (Minisart SRP 4, Sartorius). A quality control (QC) sample was prepared by pooling 10  $\mu$ L of each sample extract included in the experiment.

#### 2.2.5. Metabolic fingerprint LC-HRMS analysis

The injections were randomly performed on an Exactive Orbitrap LC-HRMS (Thermo Fischer Scientific), equipped with a heated electrospray ionization probe (HESI) source. For LC separation, a reverse phase PFP analytical column (100 mm  $\times$  2.1 mm; 3  $\mu$ m particle size; Sigma Aldrich) was used. Each sample (5  $\mu$ L) was loaded onto the column with a full loop injection. Two separate mobile phases were used: water was used as solvent A, acetonitrile as solvent B, and both were modified with 0.1 % formic acid. The flow rate was 200  $\mu$ L/min according to the following gradient system (A/B): 95/5 from

0 to 3 min, 60/40 at 8 min, 50/50 at 9 min, 30/70 at 13 min, 5/95 from 15 to 18 min, followed by a re-equilibration period (95/5) from 21 to 31 min (total run time, 31 min).

The Exactive HRMS was turned to a mass resolution of 50,000 (FWHM,  $m/z$  200) with a mass spectrum range of 50–1000  $m/z$ . Samples were analyzed in both positive and negative electrospray ionization modes (ESI+ and ESI-). The analyses, respectively in ESI+ and ESI-, were completed with a spray voltage of 3.5 |kV| and 3.40 |kV|, a capillary voltage of 45 V and -50 V, a tube lens voltage of 90 V and -120 V, and a skimmer voltage of 26 V and -25 V. The capillary and heater temperature was 250 °C.

#### 2.2.6. Quality control

A quality control (QC) sample corresponding to a pool of 10  $\mu$ L collected from each sample extract was injected several times at the beginning of the analytical sequence to equilibrate the column. QC injections were repeated every ten samples to control analytical repeatability and sensitivity. Relative standard deviation (RSD) was calculated for each feature detected in the replicated QC injections to assess the former. A repeatability characterized by 70% of features with a RSD < 30 % (Want et al., 2013) was considered acceptable. Only features with a RSD < 30 % were retained for further data processing and annotation.

#### 2.2.7. Data processing and statistical analysis

To facilitate understanding of the data processing and the subsequent identification strategy, a schematic workflow is presented in Supplementary Data (Figure S1).

##### 2.2.7.1. Data processing

The raw data were converted into mzXML files with MSConvert freeware (ProteoWizard 3.0, Chambers et al., 2012). Then data were processed using the XCMS package (Smith et al., 2006) in the R environment. Optimized XCMS parameters were implemented:  $m/z$  interval for peak picking was set at 0.01, the signal-to-noise ratio threshold was set at 3, the group band width was set at 8, and the minimum fraction was set at 0.5. A multi-step strategy was applied in the data processing using the XCMS package, as detailed in Courant et al. (2009). First, peak alignment is applied for ensuring that each ion [ $m_i/z_i$ ] of the MS fingerprint appears at identical retention time ( $rt_i$ ) across all the analyzed samples. As a second step, peak picking is carried out to report the feature abundance observed for each ion [ $m/z$ ;  $rt$ ]<sub>*i*</sub> in each of the analyzed samples (i.e. XCMS extracts each specific ion chromatogram corresponding to each  $m/z$  value and integrates the corresponding chromatographic peaks). During a third step, the software compares feature abundances observed for identical ions in two groups of

samples based on a Welch *t*-test, to highlight metabolites presenting intensities significantly different in the two groups, and ranks these metabolites according to the *p*-value associated with the observed difference. Finally, XCMS returns a table containing peak information (i.e. *m/z* and retention time) and feature abundances (i.e. area) in all samples. Visual inspection of raw data for all the features reported by XCMS was performed to ensure that each integrated signal at a defined *m/z* and retention time corresponded to a metabolite presenting a Gaussian chromatographic peak (i.e. not a baseline drift or background noise). If not, features were discarded from the dataset.

#### 2.2.7.2. Statistical analysis

A Welch *t*-test was applied using the XCMS package to highlight features presenting intensity modulations between the two groups of exposed and control samples. The Welch-*t*-test is an adaptation of the Student-*t*-test for comparing the mean of two groups with unequal variances. Features with a *p*-value lower than 0.1 were selected for annotation and identification. The rationale for choosing such a threshold was based on the opportunity to reveal a biological modulation trend due to the exposure. Considering single metabolites separately is somewhat a reductionist view of metabolic alterations involving complex interconnected metabolic pathways. Indeed, a trend ( $p < 0.1$ ) toward down- or up-modulation of several metabolites from the same pathway (highlighting a disruption in the biochemical cascade) may be more biologically relevant than a single marker metabolite ( $p < 0.05$ ). As a consequence, processed data were then exported to SIMCA 13.0.3 software (Umetrics, Sweden) for multivariate analysis in order to reduce the dataset dimensionality and highlight relevant metabolic patterns with respect to the WWTP effluent exposure. Datasets were log transformed and Pareto scaled. Mussels individuals were considered independent since no clustering related to glass aquarium was observed using Principal Analysis Components (PCA) or hierarchical clustering analysis (results not shown).

#### 2.2.8. Metabolite annotation and identification strategy

The annotation strategy was performed on features with a difference of amplitude higher than 30 % between the control group and the WWTP exposed group and with  $p < 0.1$ . Metabolite annotation was completed by mass-matching with 0.002 Da precision using the online Human Metabolome Database tool (HMDB; <http://www.hmdb.ca/>). Metabolite annotation was based on two levels of confirmation according to Sumner et al. (2007). Level 1 corresponds to annotation confirmed by injection of the analytical standard on the same analytical platform under the same conditions (validation based on both accurate mass and retention time). Level 2 was characterized by metabolite putatively annotated in agreement with the physicochemical properties and on the basis of public

databases. In addition, to add more power to some annotations of level 2, we used the external laboratory results reported by Boudah et al. (2014) using the same chromatographic column. As the gradient used in Boudah et al. (2014) was slightly different, this aspect was taken into account by considering the water/acetonitrile ratio at which the molecules were eluted rather than their retention time. The identification levels are reported in Table 3.2. Identified and annotated metabolites were assigned to metabolic pathways according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <http://www.kegg.jp>) and HMDB. Pathway analysis was then performed using MetaboAnalyst 4.0 (Xia and Wishart, 2010) in order to highlight significantly impacted metabolic pathways (Figure S2).

#### 2.2.9. Characterization of the WWTP effluent extract

Characterization of the WWTP effluent extract aimed to get a better picture of the chemical responsible for exposure effects. The extraction, performed on SPE HLB with methanol, was chosen to elute mainly hydrophilic compounds such as PhACs and pesticides to the detriment of polycyclic aromatic hydrocarbons or polychlorinated biphenyls. The characterization of the WWTP effluent extract was based on the screening of 80 organic contaminants belonging to PhACs and pesticides (Table S1), based on the comparison with analytical standards injected in the same analytical conditions.

50  $\mu$ L WWTP effluent extract was evaporated to dryness and reconstituted with 250  $\mu$ L of acetonitrile/water (20/80; v/v), and filtered into an analysis vial using a 0.20  $\mu$ m PTFE syringe filter (Minisart SRP 4, Sartorius). The injections (in triplicate) were performed on a Q-Exactive Orbitrap LC-HRMS (Thermo Fischer Scientific). A Zorbax Eclipse XDB-C8 column (3.0  $\times$  150 mm 3.5  $\mu$ m; Agilent) was used. Each sample (10  $\mu$ L) was loaded onto the column with a full loop injection. Two separate mobile phases were used: water was used as solvent A, acetonitrile (ACN) as solvent B, and both were modified with 0.1 % formic acid. The flow rate was 400  $\mu$ L/min according to the following gradient system: 10 % ACN from 0 to 1 min, until 100 % at 10 min, 100 % ACN at 15 min, followed by a re-equilibration period at 10 % ACN from 15.1 to 25 min.

The Q-Exactive HRMS was turned to a mass resolution of 35,000 (FWHM,  $m/z$  200) with a mass spectrum range of 80–450  $m/z$ . Samples were analyzed in both ESI+ and ESI-. The analyses, respectively in ESI+ and ESI-, were completed with a spray voltage of 4.0 |kV| and 3.35 |kV|, a S-lens RF level of 50 and a sheath gas flow rate of 55 in both ESI modes. The capillary temperature was 300 °C and the heater temperature was 250 °C.

## 2.3. Results

### 2.3.1. *Characterization of the WWTP effluent extract*

The screening of 80 contaminants allowed the detection of 38 PhACs and their metabolites from various therapeutic classes, and 4 pesticides, occurring in the WWTP effluent extract (Table 3.1). In order to evaluate the proportion of each analyzed contaminants, a relative abundance was estimated based on its chromatographic peak area in the analytical standard (prepared at a known concentration) and in the seawater samples. Relative abundance estimated are given in Table 3.1 and are represented with "+".

**Table 3.1:** Detected pharmaceutically active compounds and pesticides in the WWTP effluent extract.

Class	Compounds	Molecular ion species detected	Calculated mass	Observed mass	Mass difference (ppm)	Retention time WWTP effluent extract (min)	Standard retention time (min)	Relative abundance <sup>a</sup>
<b>Analgesics</b>	4-acetylaminoantipyrine (Noramidopyrine metabolite)	[M+H] <sup>+</sup>	246.1237	246.12401	1.3	5.75	5.72	++
	4-formylaminoantipyrine (Noramidopyrine metabolite)	[M+H] <sup>+</sup>	232.10805	232.10829	1.0	5.78	5.76	++
	Acetaminophen	[M+H] <sup>+</sup>	152.07061	152.07079	1.2	3.63	3.55	+++
	Antipyrine	[M+H] <sup>+</sup>	189.10224	189.10255	1.6	6.8	6.78	++
	Codeine	[M+H] <sup>+</sup>	300.15942	300.15982	1.3	3.88	3.86	+++
	Ketoprofen	[M+H] <sup>+</sup>	255.10157	255.10204	1.8	9.8	9.8	+++
	Mefenamic acid	[M+H] <sup>+</sup>	242.11756	242.11794	1.6	11.52	11.52	+
<b>Anesthetics</b>	Mepivacaine	[M+H] <sup>+</sup>	247.18049	247.18048	0	6.35	6.29	+
<b>Antibiotics</b>	Amoxicillin	[M+H] <sup>+</sup>	366.11182	366.11243	1.7	6.2	6.19	+++
	Flumequine	[M+H] <sup>+</sup>	262.0874	262.0881	2.7	9.02	9.02	+
	Metronidazole	[M+H] <sup>+</sup>	172.07167	172.07185	1.0	3.8	3.7	+++
	Ofloxacin	[M+H] <sup>+</sup>	362.15106	362.1514	0.9	5.98	5.94	+++
	Sulfamethoxazole	[M+H] <sup>+</sup>	254.05939	254.05974	1.4	7.92	7.91	+++
	Sulfapyridine	[M+H] <sup>+</sup>	250.06447	250.06476	1.2	6.01	5.98	+++
	Trimethoprim	[M+H] <sup>+</sup>	291.14517	291.14545	1.0	5.9	5.82	+++
<b>Antineoplastic agents</b>	Cyclophosphamide	[M+H] <sup>+</sup>	261.0321	261.03232	0.8	7.89	7.89	+
	Ifosfamide	[M+H] <sup>+</sup>	261.0321	261.03214	0.2	7.78	7.78	+
<b>Benzodiazepines</b>	Oxazepam	[M+H] <sup>+</sup>	287.05818	287.05865	1.6	8.96	8.94	+++
<b>Beta-Blockers</b>	Atenolol	[M+H] <sup>+</sup>	267.17032	267.17059	1.0	2.3	2.31	+++
	Metoprolol	[M+H] <sup>+</sup>	268.19072	268.19092	0.7	6.66	6.62	++
	Nadolol	[M+H] <sup>+</sup>	310.20128	310.20175	1.5	5.61	5.55	++
	Propranolol	[M+H] <sup>+</sup>	260.16451	260.16501	1.9	7.58	7.5	++
	Sotalol	[M+H] <sup>+</sup>	273.12674	273.12714	1.5	2.69	2.66	+++
<b>Bronchodilators</b>	Salbutamol	[M+H] <sup>+</sup>	240.15942	240.15974	1.3	2.24	2.24	++

Table 3.1 (continued)

Class	Compounds	Molecular ion species detected	Calculated mass	Observed mass	Mass difference (ppm)	Retention time WWTP effluent extract (min)	Standard retention time (min)	Relative abundance <sup>a</sup>
<b>Corticosteroids</b>	Methylprednisolone	[M+H] <sup>+</sup>	375.2166	375.2171	1.3	8.52	8.5	+++
<b>Lipid regulators</b>	Fenofibric acid	[M+H] <sup>+</sup>	319.07316	319.07376	1.9	10.83	10.83	+++
<b>Non-steroidal anti-inflammatory drug</b>	Diclofenac	[M-H] <sup>-</sup>	294.00941	294.00955	0.5	10.86	10.86	+++
<b>Psychiatrics-drug</b>	10,11-epoxycarbamazepine (Carbamazepine metabolite)	[M+H] <sup>+</sup>	253.0971	253.09749	1.5	7.9	7.9	++
	Amitriptyline	[M+H] <sup>+</sup>	278.19033	278.19089	2.0	8.18	8.27	+
	Carbamazepine	[M+H] <sup>+</sup>	237.1022	237.10254	1.4	8.7	8.7	+++
	Citalopram	[M+H] <sup>+</sup>	325.17107	325.17157	1.5	7.86	7.78	+
	Primidone	[M+H] <sup>+</sup>	219.1128	219.11346	3.0	6.9	6.89	++
	Venlafaxine	[M+H] <sup>+</sup>	278.21146	278.21158	0.4	7.25	7.19	+++
<b>Ulcer healings</b>	Omeprazole	[M+H] <sup>+</sup>	346.12199	346.12244	1.3	6.95	6.95	++
	Ranitidine	[M+H] <sup>+</sup>	315.14854	315.14902	1.5	2.51	2.46	+
<b>Stimulants</b>	Caffeine	[M+H] <sup>+</sup>	195.08765	195.08794	1.5	5.32	5.25	++++
	Nicotine	[M+H] <sup>+</sup>	163.12298	163.12311	0.8	1.54	1.46	++
	Paraxanthine (Caffeine metabolite)	[M+H] <sup>+</sup>	181.072	181.07208	0.4	3.35	3.29	++++
<b>Herbicides</b>	Atrazine	[M+H] <sup>+</sup>	216.10105	216.10129	1.1	9.65	9.64	+
	Simazine	[M+H] <sup>+</sup>	202.0854	202.08592	2.6	8.77	8.79	+
	Terbutryn	[M+H] <sup>+</sup>	242.14339	242.14378	1.6	9.14	9.1	+
<b>Insecticides</b>	Fipronil	[M-H] <sup>-</sup>	434.93143	434.93134	-0.2	11.61	11.61	+

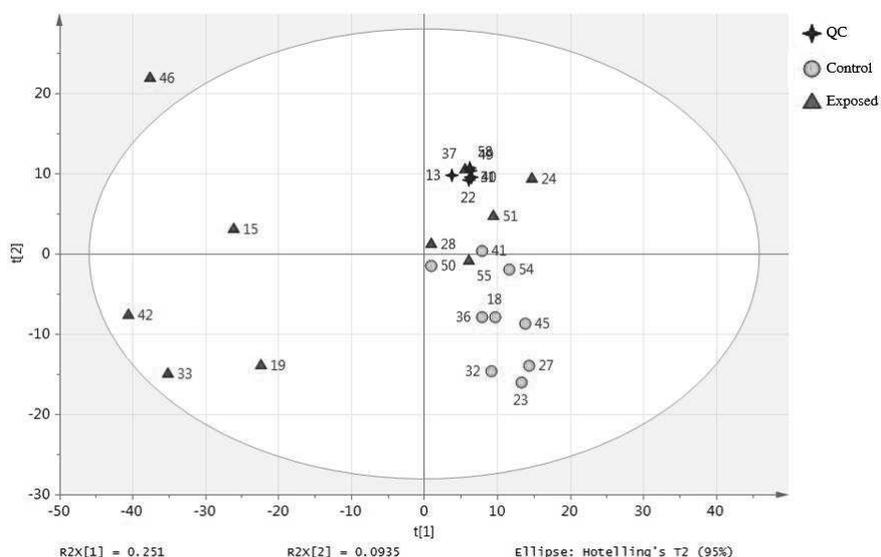
<sup>a</sup> Relative abundance was calculated based on their chromatographic peak area. The more "+" there are, the higher the proportion.

### 2.3.2. Metabolic fingerprint LC-HRMS analysis

#### 2.3.2.1. Analytical performance and statistical analysis

LC-HRMS analysis of digestive glands of control male mussels (SC) and those exposed to the WWTP effluent extract was carried out in both negative and positive electrospray ionization modes (ESI- and ESI+). Leading to metabolic fingerprints of 4563 features detected in ESI- and 2185 features in ESI+. The percentages of features with a RSD < 30 % in ESI- and ESI+ were 68 % and 65 %, respectively. The analytical repeatability was acceptable, as highlighted on the PCA score plot, where the QC samples injected at regular intervals throughout the analytical run were tightly clustered together (Figure 3.1). PCA score plot (Four principal components for a  $r^2X = 50\%$ ) described a clustering trend for the two groups, i.e. SC and exposed male mussels (Figure 3.1). However, the latter were split into two sub-groups, one close to the SC group and the other more scattered. An OPLS-DA model is also proposed in Supplementary Data for further information on the structure of the dataset (Figure S3).

Univariate analysis (Welch  $t$ -test) provided 675 features that differed between the SC and exposed groups in ESI- and 214 features in ESI+ ( $p < 0.1$ ; RSD QC < 30 %; amplitude difference > 30 %). Features with  $p < 0.1$  revealed an up- or down-modulation trend in response to exposure. These discriminant features were meaningful, especially if connected in the same metabolic pathway, and may highlight WWTP effluent effects that could be biologically relevant.



**Figure 3.1:** PCA score plot of metabolic fingerprints from control (green circle) and exposed (red triangle) mussels showing a clustering pattern between these two conditions. In blue (cross), QC are clustered. The numbers represent the injection order.

### 2.3.2.2. Metabolite modulation and pathway analysis

Mass-matching analysis using the online HMDB database allowed putative annotation of the features of interest ( $p < 0.1$ ; RSD QC  $< 30$  %; amplitude difference  $> 30$  %). Metabolites identified by confirmation with pure analytical standards ( $n = 23$ ) and putatively annotated features ( $n = 15$ ) belonging to relevant metabolic pathways are reported in Table 3.2. The Supporting Information (Table S2) reports all features of interest (some with level 2 annotation) which are not presented in Table 3.2. A negative shift between theoretical and observed mass for low molecular mass compounds was noted in ESI-, sometimes with a bias of around 14 ppm (Table 3.2). However, this mass bias was also observed for the pure analytical standard when injected. This suggests lower accuracy in the ESI- data acquisition for our analysis, which was considered for features annotation.

After annotation and identification of main modulated metabolites, twenty-two were assigned to seven amino acid metabolic pathways, six to purine metabolism and four to pyrimidine metabolism. Most of these metabolic pathways were significantly affected as revealed by further pathway analysis from MetaboAnalyst 4.0 (Figure S2), and seem relevant to discuss. Among these, five identified metabolites were significantly down-modulated in the phenylalanine metabolism, including L-phenylalanine ( $-50$  %,  $p < 0.05$ ), N-acetyl-L-phenylalanine ( $-50$  %,  $p < 0.05$ ), hydroxycinnamate ( $-31$  %,  $p < 0.05$ ), phenylethylamine ( $-81$  %,  $p < 0.05$ ) and the L-tyrosine amino acid ( $-41$  %,  $p < 0.05$ ) (Figure 3.2). L-tyrosine, is a catecholamine precursor (i.e. dopamine, metanephrine, epinephrine, etc.) directly synthesized from L-phenylalanine. Its down-modulation may lead to a significant decrease in the dopamine neurohormone ( $-36$  %,  $p < 0.05$ ) (Figure 3.2). Other amino acids were down-modulated, including L-methionine ( $-55$  %,  $p < 0.05$ ), L-proline ( $-42$  %,  $p < 0.1$ ), two branched-chain amino acids (BCAAs) L-isoleucine ( $-39$  %,  $p < 0.05$ ) and L-leucine ( $-35$  %,  $p < 0.1$ ), as well as L-threonine or its isomer L-homoserine ( $-29$  %,  $p < 0.05$ ). Although L-tryptophan was not significantly modulated (results not shown) by the WWTP effluent extract exposure, four metabolites belonging to its metabolic pathway were impacted (Figure 3.3). We highlighted significant down-modulation of L-kynurenine ( $-63$  %,  $p < 0.05$ ), N'-formylkynurenine ( $-55$  %,  $p < 0.05$ ), 5-methoxyindoleacetate (a serotonin metabolite,  $-57$  %,  $p < 0.05$ ) and a decrease in 5-hydrokynurenamine ( $-63$  %,  $p < 0.1$ ). WWTP effluent exposure also contributed to purine and pyrimidine metabolism disruption (Figure 3.4). Purine metabolism was mainly affected through an increase in adenosine ( $+138$  %,  $p < 0.1$ ) and adenine ( $+34$  %,  $p < 0.1$ ), and downmodulation of guanine ( $-32$  %,  $p < 0.1$ ) and xanthine ( $-78$  %,  $p < 0.05$ ). Concerning pyrimidine metabolism, uracil ( $-54$  %,  $p < 0.05$ ), deoxyuridine ( $-57$  %,  $p < 0.05$ ) and deoxycytidine ( $-28$  %,  $p < 0.1$ ) were identified as down-modulated metabolites. Two intermediates in the citric acid cycle were down-modulated, including fumarate ( $-31$  %,  $p < 0.05$ ) and malate ( $-24$  %,  $p < 0.1$ ). Finally, we observed up-modulation of oxidized glutathione ( $+34$  %,  $p < 0.1$ ), a biomarker of oxidative stress.

**Table 3.2:** List of the main metabolic pathways modulated by exposure to WWTP effluent extracts in male mussel digestive glands, considering also metabolites with a p-value < 0.1.

Metabolism pathway	Metabolite	Retention Time (min)	Molecular ion species detected	Calculated mass	Observed mass	Mass difference (ppm)	RSD QC <sup>c</sup> %	RSD SC <sup>c</sup> %	RSD Exposed <sup>c</sup> %	Difference amplitude %	p-value	Annotation level <sup>a</sup>
Phenylalanine metabolism	<i>L-tyrosine</i> <sup>†</sup>	3.82	[M-H] <sup>-</sup>	180.0666	180.0654	7	33	19	74	↘ -41	0.01745	1
	L-phenylalanine	6.90	[M+H] <sup>+</sup>	166.0863	166.0860	2	3	17	54	↘ -48	0.00042	1
		6.92	[M-H] <sup>-</sup>	164.0717	164.0704	8	3	30	61	↘ -50	0.00215	1
	N-acetyl-L-phenylalanine	9.40	[M-H] <sup>-</sup>	206.0823	206.0812	5	3	20	29	↘ -50	0.00002	1
	4-hydroxycinnamic acid	9.50	[M-H] <sup>-</sup>	163.0401	163.0388	8	8	37	22	↘ -31	0.04103	1
	Phenylethylamine	10.92	[M+H] <sup>+</sup>	122.0964	122.0963	1	4	79	94	↘ -81	0.01519	1
	L-3-phenyllactic acid	9.30	[M-H] <sup>-</sup>	165.0557	165.0544	8	17	74	77	↗ +188	0.02734	2
Tyrosine metabolism	Dopamine	4.95	[M-H] <sup>-</sup>	152.0717	152.0703	9	10	31	58	↘ -32	0.06220	1
		4.97	[M+H] <sup>+</sup>	154.0863	154.0860	2	11	34	52	↘ -36	0.03397	1
	<i>L-tyrosine</i> <sup>†</sup>	3.82	[M-H] <sup>-</sup>	180.0666	180.0654	7	33	19	74	↘ -41	0.01745	1
	Gamma-glutamyltyrosine	5.68	[M-H] <sup>-</sup>	309.1092	309.1088	1	7	52	73	↘ -51	0.02850	2
	Tyramine-o-sulfate	8.02	[M-H] <sup>-</sup>	216.0336	216.0326	5	2	17	81	↗ +153	0.04239	2
Tryptophan metabolism	L-kynurenine	7.6	[M-H] <sup>-</sup>	207.0775	207.0765	5	9	70	71	↘ -63	0.02887	1
		7.58	[M+H] <sup>+</sup>	209.0921	209.0917	2	3	71	77	↘ -63	0.03020	1
	N <sup>1</sup> -formylkynurenine	7.27	[M-H] <sup>-</sup>	235.0724	235.0716	3	8	63	75	↘ -55	0.03902	1
	<i>5-hydroxykynurenamine</i>	3.67	[M+NH4] <sup>+</sup>	198.1237	198.1233	2	29	73	177	↘ -63	0.06585	2
	5-methoxyindoleacetate <sup>b</sup>	10.10	[M+NH4] <sup>+</sup>	223.1077	223.1073	2	4	44	64	↘ -57	0.00513	2
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	L-isoleucine	3.90	[M-H] <sup>-</sup>	130.0874	130.0859	12	8	25	73	↘ -39	0.03391	1
	<i>L-leucine</i>	4.37	[M-H] <sup>-</sup>	130.0874	130.0859	12	11	23	71	↘ -35	0.05334	1
	(s)-3-hydroxyisobutyric acid	1.45	[M-H2O-H] <sup>-</sup>	85.0290	85.0280	12	14	24	25	↘ -32	0.00450	2

**Table 3.2** (continued)

Metabolism pathway	Metabolite	Retention Time (min)	Molecular ion species detected	Calculated mass	Observed mass	Mass difference (ppm)	RSD QC <sup>c</sup> %	RSD SC <sup>c</sup> %	RSD Exposed <sup>c</sup> %	Difference amplitude %	p-value	Annotation level <sup>a</sup>
<b>Arginine and proline metabolism</b>	<i>L</i> -proline	1.57	[M+H] <sup>+</sup>	116.0706	116.0707	1	7	46	77	↘ -42	0.05913	1
	N-acetyl-l-alanine	2.22	[M-H] <sup>-</sup>	130.0510	130.0495	12	10	24	32	↘ -49	0.00016	1
<b>Cysteine and methionine metabolism</b>	L-methionine	2.57	[M-H] <sup>-</sup>	148.0438	148.0423	10	19	35	97	↘ -55	0.00773	1
<b>Glycine, serine and threonine metabolism</b>	L-threonine or homoserine	1.50	[M-H] <sup>-</sup>	118.0510	118.0494	14	6	15	48	↘ -29	0.03384	2
		1.47	[M+H] <sup>+</sup>	120.0655	120.0653	2	5	20	60	↘ -31	0.05461	2
<b>Purine metabolism</b>	<i>Adenosine</i>	3.28	[M+H] <sup>+</sup>	268.1040	268.1035	2	5	66	85	↗ +127	0.07510	1
		3.28	[M+FA-H] <sup>-</sup>	312.0950	312.0944	2	7	61	82	↗ +138	0.05656	1
	<i>Guanine</i>	2.42	[M-H] <sup>-</sup>	150.0421	150.0407	9	9	45	36	↘ -32	0.0866	1
	Xanthine	1.87	[M-H] <sup>-</sup>	151.0261	151.0247	9	5	37	86	↘ -78	0.00011	1
	5'-phosphoribosyl-n-formylglycinamide or 2-oxo-4-methylthiobutanoic acid	6.95	[M-H2O-H] <sup>-</sup>	295.0331	295.0325	2	7	13	55	↘ -45	0.00087	2
	<i>Adenine</i>	2.80	[M-H] <sup>-</sup>	134.0472	134.0459	10	8	36	31	↗ +34	0.07383	1
dGDP or Adenosine 3',5'-diphosphate	3.63	[M+FA-H] <sup>-</sup>	472.0276	472.0277	0	29	16	58	↘ -45	0.00174	2	

**Table 3.2** (continued)

Metabolism pathway	Metabolite	Retention Time (min)	Molecular ion species detected	Calculated mass	Observed mass	Mass difference (ppm)	RSD QC <sup>c</sup> %	RSD SC <sup>c</sup> %	RSD Exposed <sup>c</sup> %	Difference amplitude %	p-value	Annotation level <sup>a</sup>
<i>Pyrimidine metabolism</i>	Uracil	1.72	[M-H] <sup>-</sup>	111.0200	111.0185	14	7	25	49	↘ -53	0.00018	1
		1.72	[M+H] <sup>+</sup>	113.0346	113.0345	1	22	28	60	↘ -54	0.00058	1
	Deoxycytidine	2.93	[M+FA-H] <sup>-</sup>	272.0888	272.0887	0	5	32	43	↘ -28	0.06584	1
	Deoxyuridine	2.18	[M-H] <sup>-</sup>	227.0673	227.0666	3	29	66	73	↘ -57	0.03682	1
	<i>(r)-b-aminoisobutyric acid</i>	3.37	[M-H] <sup>-</sup>	102.0561	102.0546	14	13	32	87	↗ +158	0.05324	2
<i>Pyruvate metabolism</i>	Malate	1.55	[M-H] <sup>-</sup>	133.0142	133.0128	11	8	20	44	↘ -24	0.07911	1
	Fumarate	2.57	[M-H] <sup>-</sup>	115.0037	115.0022	13	25	31	47	↘ -31	0.04040	1
	S-acetyldihydroipoamide	1.95	[M+H] <sup>+</sup>	250.0930	250.0946	6	12	30	32	↘ -46	0.00148	2
	<i>S-lactoylglutathione</i>	2.75	[M-H] <sup>-</sup>	378.0977	378.0976	0	29	69	60	↗ +87	0.05693	2
<i>Glutathione metabolism</i>	<i>Oxidized glutathione</i>	2.40	[M-H] <sup>-</sup>	611.1447	611.1443	1	31	25	33	↗ +34	0.09481	1
	Cysteineglutathione disulfide	1.50	[M-H] <sup>-</sup>	425.0806	425.0802	1	17	26	66	↘ -44	0.00797	2
	Cysteinyglycine <sup>b</sup>	4.38	[2M-H] <sup>-</sup>	355.0752	355.0742	3	16	24	86	↘ -51	0.00556	2
<i>Analogue to GSH</i>	Norphthalmic acid	1.60	[M-H] <sup>-</sup>	274.1045	274.1040	2	17	13	35	↘ -39	0.00022	2

Annotation level 1: metabolite identity confirmed by injection of the corresponding analytical standard in the same analytical conditions.

Annotation level 2: putative annotation, based on the use of public databases.

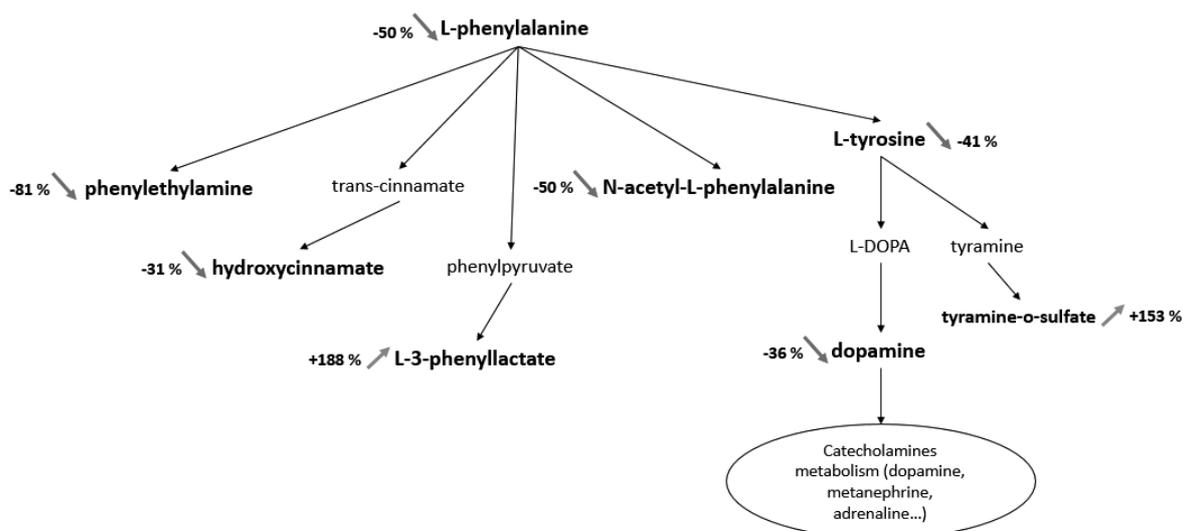
<sup>a</sup> Based on the work of Sumner et al. (2007).

<sup>b</sup> In accordance with the retention time observed for the corresponding analytical standard in Boudah et al. (2014) with the same chromatographic column.

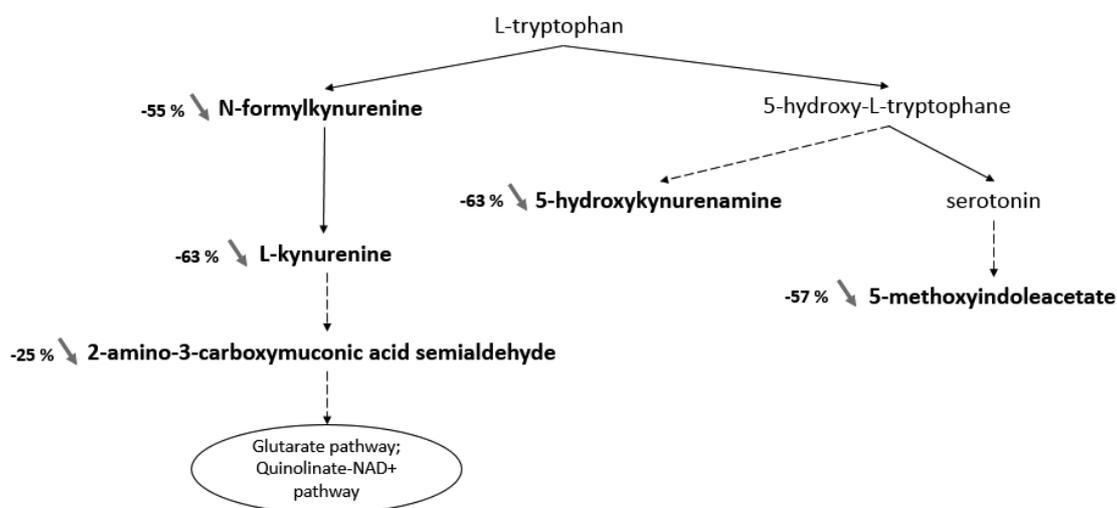
<sup>c</sup> RSD: Relative Standard Deviation calculated for each feature detected in Quality Control (QC) sample injected throughout the analytical sequence (analytical variability), in solvent control (SC) group and exposed group (biological variability).

† Belong to several metabolic pathways

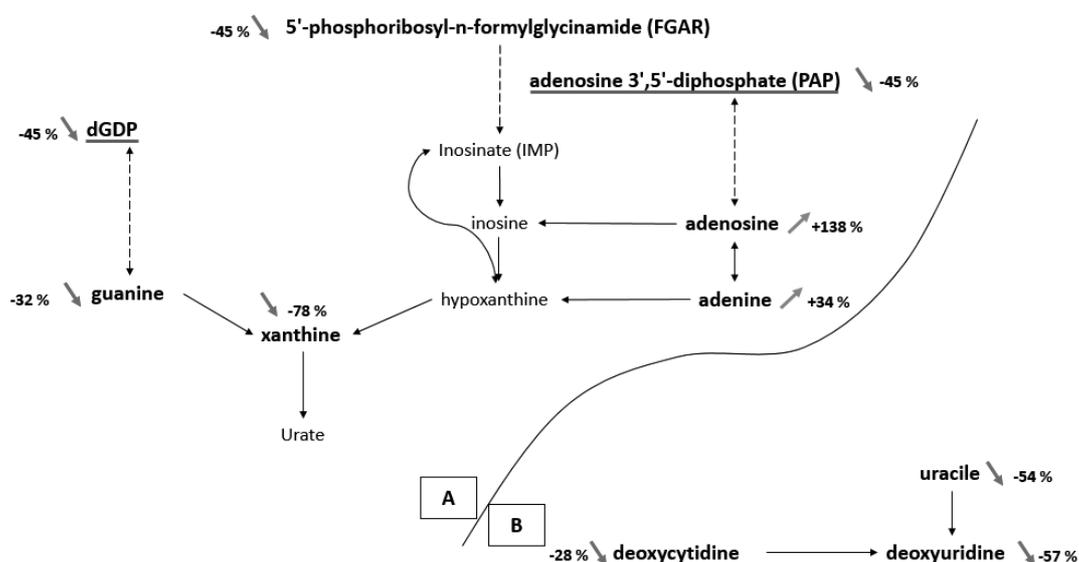
Metabolites marked in italic show a trend in modulation ( $p < 0.1$  and/or modulation amplitude  $< 30$  %) or are analytically less restrictive (RSD QC  $< 35$  %). Nevertheless, they may represent biologically relevant metabolites.



**Figure 3.2:** Partial map of phenylalanine and tyrosine metabolism in the response of *M. galloprovincialis* to a WWTP effluent exposure extract. Metabolites modulated by exposure are shown in bold, while metabolites not detected or not modulated are not in bold. The red arrow corresponds to down-modulation and the green arrow to up-modulation (exposed compared to control). Direct connections between metabolites are indicated with full arrows.



**Figure 3.3:** Partial map of tryptophan metabolism in the response of *M. galloprovincialis* to a WWTP effluent extract exposure. Metabolites modulated by exposure are shown in bold, while metabolites not detected or not modulated are not in bold. Red arrows correspond to down-modulation and green arrows to up-modulation (exposed compared to control). Direct connections between metabolites are indicated with full arrows while indirect connections are shown with dashed arrows.



**Figure 3.4:** Partial map of purine metabolism (A) and pyrimidine metabolism (B) in the response of *M. galloprovincialis* to a WWTP effluent extract exposure. Metabolites modulated by exposure are shown in bold, while metabolites not detected or not modulated are not in bold. Red arrows correspond to down-modulation and green arrows to up-modulation (exposed compared to control). Direct connections between metabolites are indicated with full arrows, while indirect connections are shown with dashed arrows. Underlined metabolites of the same color correspond to several possible annotations for the same feature.

## 2.4. Discussion

Male mussels exposed for 7 days to a WWTP effluent extract in laboratory conditions showed alterations of their metabolism. These alterations belong to the metabolism of several amino acid (e.g. tyrosine, phenylalanine, BCAAs, proline, etc.), neurohormones (dopamine and a serotonin metabolite), purine and pyrimidine metabolism (e.g. adenosine, guanine, xanthine, uracil, deoxyuridine, etc.), citric acid cycle intermediates (malate and fumarate), and a component involved in oxidative stress defense (GSSG). To our knowledge, our results are the first to highlight a disruption of these metabolic pathways in *M. galloprovincialis* in response to a WWTP effluent exposure. Modulations of these metabolites could reflect potential effects on several of the biological processes discussed below, such as energy metabolism, DNA and RNA synthesis, immune system, osmoregulation, byssus formation and adhesion, and reproduction. WWTP effluents could also activate defense mechanisms, especially against oxidative stress in male mussels. A summary table based on literature, complementary with the discussion, was proposed in order to relate the observed effects with contaminants detected in our WWTP effluent extract (Table 3.3), although synergistic, antagonistic or additive effects with other chemicals cannot be excluded.

**Table 3.3:** Summary table relating observed effects with contaminants detected in the WWTP effluent extract.

Impacted metabolites and metabolic pathways	Impacted metabolites are implied in these biological functions	Contaminants already reported as altering these biological functions
<p><b>Amino acids metabolism:</b> isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tyrosine</p> <p><b>Citric acid cycle:</b> malate, fumarate</p> <p><b>ATP components:</b> adenine, adenosine</p>	<p><b>Energy metabolism</b> Sokolova et al., 2012</p>	<p><b>Caffeine:</b> 0.5, 3 and 18 µg/L, alterations on energy reserves of <i>Ruditapes philippinarum</i> (Cruz et al., 2016); 0.2, 0.3 and 0.4 mM, inhibition of glycogen phosphorylase in <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Serrano et al., 1995).</p> <p><b>Carbamazepine:</b> 0.3, 3 and 6 µg/L, decrease of glycogen and protein content in <i>Scrobicularia plana</i> and <i>Diopatra neapolitana</i> (Freitas et al., 2015b); 50 µg/L, alteration of siphoning behavior in <i>Corbicula fluminea</i> (Chen et al., 2014).</p> <p><b>Diazinon or endosulfan:</b> 0.47 and 0.60 µg/L or 0.44 and 0.61 mg/L respectively, impact of filtration and ingestion rate of <i>Daphnia magna</i> (Fernández-Casalderrey et al., 1994).</p> <p><b>Ketoprofen:</b> 2.5 µg/L, changes in Acyl CoA oxidase activity which catalyzes the first reaction of β-mitochondrial oxidation of fatty acids in <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Mezzelani et al., 2018b).</p> <p><b>Propranolol:</b> 147 µg/L, inhibition of feeding rate of <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Solé et al., 2010).</p> <p><b>Simazine or terbutryn:</b> 4, 20 and 50 µg/L or 0.2 and 2 µg/L, increase activity of transaminase enzymes and lactate dehydrogenase and increase blood glucose in <i>Cyprinus carpio</i> (Velisek et al., 2011, 2009).</p>
<p><b>Branched chain amino acids:</b> isoleucine, leucine.</p>	<p><b>Protein synthesis and immune system</b> Calder, 2006; Liu et al., 2014</p>	<p><b>Atrazine:</b> 4.6×10<sup>-5</sup> M, increase the death of hemocytes (mussel immune cell) of <i>Mytilus edulis</i> (Feng et al., 2017).</p> <p><b>Carbamazepine:</b> 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 µg/L, impact hemocytes of <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Tsiaka et al., 2013).</p> <p><b>Diazinon:</b> 7830 µg/L, cause immunotoxicity in <i>Oreochromis niloticus</i> (Girón-Pérez et al., 2007).</p> <p><b>Ibuprofen or ketoprofen:</b> 2.5 µg/L for both, decrease of granulocytes / hyalinocytes ratio and inhibition of phagocytosis capacity in <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Mezzelani et al., 2018b).</p>

**Table 3.3** (continued)

Impacted metabolites and metabolic pathways	Impacted metabolites are implied in these biological functions	Contaminants already reported as altering these biological functions
<p><b>Free amino acids:</b> isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, proline, tyrosine</p>	<p><b>Osmoregulation</b> Yancey et al., 1982</p>	<p><b>Clofibrac acid</b> or <b>diclofenac</b>: 1, 10 and 100 µg/L for both, disturbance of ionoregulatory responses of <i>Cirrhinus mrigala</i> (Saravanan and Ramesh, 2013).</p> <p><b>Diclofenac</b>: 10 and 100 ng/L, impairment of osmoregulatory ability of <i>Carcinus maenas</i> (Eades and Waring, 2010).</p> <p><b>Tributyltin oxide</b>: 100, 200, 300 and 400 µg/L, impact of osmoregulation of <i>Penaeus japonicus</i> (Lignot et al., 1998).</p>
<p><b>DOPA synthesis:</b> tyrosine, dopamine</p> <p><b>Collagen components:</b> proline</p>	<p><b>Byssus formation and adhesion</b> Silverman and Roberto, 2007; Lucas et al., 2002</p>	<p><b>Atrazine</b>: 1000 and 2000 µg/L, impact viability and formation of byssus thread of <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Karagiannis et al., 2011).</p> <p><b>Diclofenac, ibuprofen</b> or <b>propranolol</b>: 10.000 µg/L for each, lower strength and abundance of byssus thread of <i>Mytilus edulis trossulus</i> (Ericson et al., 2010).</p>
<p><b>Catecholamines and their precursors:</b> dopamine, norepinephrine sulfate, phenylalanine, tyrosine</p> <p><b>Serotonin metabolite:</b> 5-methoxyindoleacetate</p>	<p><b>Reproduction</b> Lafont and Mathieu, 2007</p>	<p><b>Atrazine</b>: <math>4.6 \times 10^{-7}</math> and <math>4.6 \times 10^{-5}</math> M, reduction of mussel sperm motility and down-regulation of androgen receptor expression in target Leydig cells (Feng et al., 2017).</p> <p><b>Carbamazepine</b>: 200 µg/L, decrease of the reproduction rate and of the number of molts in <i>Daphnia magna</i> (Oropesa et al., 2016).</p> <p><b>Diazinon</b>: 0.25 and 0.3 µ/L, disturbance of reproduction in <i>Daphnia magna</i> (Fernández-Casalderrey et al., 1995).</p> <p><b>Ibuprofen</b>: 250 ng/L, induction of reproductive biomarkers (vitellogenine, alkali-labile phosphates) in <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2012).</p> <p><b>Propranolol</b>: 100 and 250 µg/L, disturbance of reproduction in <i>Hyalella azteca</i> and <i>Ceriodaphnia dubia</i> (Huggett et al., 2002).</p>

Underlined contaminants refer to contaminants occurring in our WWTP effluent extract, while not underlined contaminants were not targeted in the analysis.

As highlighted by the PCA score plot (Figure 3.1), male mussels seem to respond differently to WWTP effluent exposure. We believe that the existence of two subgroups in the exposed group is the consequence of inter-individual variability. Although individuals were collected at the same location from a mussel culture, they were still wild organisms with perhaps different life history traits. It can have an incidence on their metabolome. This is a challenge to overcome in environmental metabolomics when working on wild organisms. However, those differences are not due to our experimental conditions during the dissection, sample preparation or analysis. Indeed, those exposed mussels were distributed in different glass aquaria during exposure, they were randomly dissected and the samples were also randomized for extraction as well as for analysis.

#### 2.4.1. Energy metabolism

In the light of our results, the WWTP effluent extract exposure could affect the energy metabolism. Two plausible hypotheses can be proposed to explain this perturbation. First, environmental stressors can result in elevated ATP demand to fulfil essential maintenance costs and ensure organism survival (e.g. cellular protective mechanisms, detoxification) (Sokolova et al., 2012). Our results highlighted up-modulations of adenine and adenosine. The latter is a constituent of both ADP and ATP, and its up-modulation may serve ATP synthesis. Furthermore, our analysis revealed a down-modulation of glucogenic and ketogenic amino acids (proline, methionine, tyrosine, phenylalanine, isoleucine and leucine). In normal circumstances lipids and carbohydrates are generally used in cellular energy metabolism, while proteins and these amino acids can be consumed extensively in invertebrates under energy deficient conditions (Moyes et al., 1990; Sokolova et al., 2012). Decreases of these amino acids could be due to their over-consumption as energy-generating substrates. Down-modulation of glucogenic and ketogenic amino acids was already observed by Jones et al. (2008) during 4-day exposure of *M. galloprovincialis* to nickel (0.77 mg/L) or chlorpyrifos (4.5 mg/L). Moreover, we observed down-modulation of malate and fumarate, two citric acid cycle intermediates. A change in the citric acid cycle may be consistent with the use of an alternative substrate to produce energy, e.g. amino acids. In response to stress, organisms are able to switch between different metabolic processes involved in energy acquisition and conversion (Sokolova et al., 2012).

A second hypothesis may also be put forward. Our study reveals a dopamine down-modulation and potential modulation of the serotonin pathway (down-modulation of a serotonin metabolite, i.e. 5-methoxyindoleacetate). Both dopamine and serotonin induce contraction or relaxation of the adductor muscles responsible for valves opening or closing (Gies, 1986). In addition, these two neurotransmitters also control siphon activity (Ram et al., 1999) and ciliary movement in various bivalves (Carroll and Catapane, 2007), used primarily for feeding activity. In response to pollution

stress, studies have already demonstrated a decrease of feeding activity or a valves closing, probably to avoid the entry of contaminants into the organism (Almeida et al., 2015, Almeida et al., 2014; Chen et al., 2014; Oliveira et al., 2017; Solé et al., 2010; Toro et al., 2003; Wang et al., 2005). For example, after 28 days of *M. galloprovincialis* exposure to different carbamazepine concentrations (0.3; 3; 6; 9 µg/L), Oliveira et al. (2017) observed a significantly lower condition index in exposed organisms compared to controls, while the bioaccumulation factor (BCF) showed a decreasing trend with increasing exposure concentrations. In light of the absence of a main carbamazepine metabolism in mussels, they suggested that the decrease in BCF could possibly be due to a decrease in the filter feeding capacity of the mussels at higher exposure concentrations. This means that *M. galloprovincialis* can maintain its valves closed to avoid contaminants bioaccumulation, thus limiting feeding activity. Another PhAC occurring in our WWTP effluent extract, namely propranolol, has also been reported to inhibit the feeding rate of *M. galloprovincialis* exposed for 10 days at 147 µg/L (Solé et al., 2010). Impairment of feeding activity could have repercussion on food intake and subsequently on the energy metabolism. In our study, the decrease in amino acids could also result from disturbed food intake under stress induction.

#### 2.4.2. Osmoregulation

In bivalves, free amino acids play a crucial role in the regulation of intracellular osmotic pressure to protect these organisms against extracellular osmolarity fluctuations in their environment (Viant et al., 2003; Yancey et al., 1982). As explain in the previous paragraph, the decrease in amino acids reported in our study is probably due to an over-consumption or inversely, a limited food intake. Hence, the unavailability of free amino acids could cause an osmotic pressure imbalance in male mussels. Similar results were also observed in marine green mussels (*Perna viridis*) after 4 weeks of 20 µg/L cadmium exposure (Wu and Wang, 2011). Other contaminants such as tributyltin oxide have an impact on the osmoregulation of the crustacean *Penaeus japonicus* after an exposure at 100–400 µg/L for 48 h (Lignot et al., 1998) (Table 3.3). In addition to free amino acids, cells use inorganic ions (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>) for intracellular osmotic pressure adjustment. In bivalve and crustacean gills, the Na influx was demonstrated to be under control of neurotransmitters such as dopamine and serotonin (Gardiner et al., 1991; Sommer and Mantel, 1988). The down-modulation of dopamine and potential disturbance of the serotonin pathway reported in this study thus may have a repercussion on osmoregulation. Hence, the neurotransmitter modulation associated with the decrease in free amino acids tends to reinforce the hypothesis of an impact of exposure to WWTP effluent on osmoregulation in *M. galloprovincialis*.

#### 2.4.3. DNA and RNA synthesis

Purine and pyrimidine metabolism were also altered by the WWTP effluent exposure, mainly with a change in levels of nucleic bases such as guanine, xanthine (guanine metabolite), adenine and uracil, and in the nucleosides deoxycytidine and deoxyuridine. Purine and pyrimidine bases are constituents of DNA and RNA. A decrease in these compounds could indicate restriction of substrates involved in DNA and RNA turnover and repair (Duan and Sadée, 1987). These results are in line with those of Gagné et al. (2011a). In a study conducted on freshwater mussels, they showed that PhACs that may occur in WWTP effluents act as inhibitors of key enzymes involved in purine and pyrimidine synthesis. Furthermore, others pollutants have already been reported to disturbed purine and pyrimidine metabolism in mussels and fish (Cappello et al., 2017; Fasulo et al., 2012; Jones et al., 2008; Song et al., 2018; Xu et al., 2015).

#### 2.4.4. Immune system

Our results show the down-modulation of the two BCAAs L-isoleucine and L-leucine. During protein synthesis in mammalian skeletal muscle, BCAAs play an important role of regulation (Yoshizawa, 2004). Moreover, BCAAs are incorporated into proteins essential for immune human cell lymphocytes, eosinophils and neutrophils (Calder, 2006). Although the role of BCAAs in mollusk remains to be investigated, exposures to the pathogen *Vibrio harveyi* resulted in an increase of BCAAs in hepatopancreas of mussels (Nguyen et al., 2018; Liu et al., 2014). These observations support a role of BCAAs in the immune system of mussels as it is the case in mammals. Hence, the down-modulation of BCAAs observed in our study could make the immune system deficient when challenged to a pathogen and reduce the survival of male Mediterranean mussels. Several contaminants present in our WWTP effluent extract have been reported to affect the immune system of *Mytilus* sp. (Table 3.3).

#### 2.4.5. Byssus formation and adhesion

Mussels are able to connect their soft tissues to marine surfaces *via* adhesive proteins present in their byssus threads. Our results reveal a down-modulation of proline. This amino acid is essential for generating collagen required for byssus formation (Silverman and Roberto, 2007). A decrease in proline could altered the byssus formation. This hypothesis could also be supported by the potential disturbance of L-dopa. Although it was not detected, it is an intermediate in tyrosine transformation into dopamine, both being down-modulated. L-dopa is a component of adhesive proteins contained in high proportion in byssus (Bandara et al., 2013; Lucas et al., 2002). Its modulation could lead to an impairment of the byssus adhesive properties. Our results coincided with observations of Ericson et al. (2010) and Karagiannis et al. (2011) (Table 3.3). After exposure to 1000 and 10.000 µg/L of diclofenac, ibuprofen and propranolol for 1–3 weeks, *Mytilus edulis trossulus* showed a decrease in byssus

strength and byssus thread abundance (Ericson et al., 2010). Similarly, Karagiannis et al. (2011) have shown the impact of atrazine (1000 µg/L) on viability and formation of byssus thread of *M. galloprovincialis* from the tenth day of exposure. Diclofenac, propranolol and atrazine were detected in our WWTP effluent extract. Moreover, another study revealed that *Mytilus trossulus* exposed to untreated sewage produced fewer byssus threads (Moles and Hale, 2003). Hence, the mussels exposure to a WWTP effluent can lead to an alteration of byssus formation and adhesion which would have harmful effects on mussel survival, movement and self-defense (Babarro and Reiriz, 2010).

#### 2.4.6. *Reproduction*

Down-modulation of L-phenylalanine and L-tyrosine, i.e. catecholamine precursors, may lead to the decrease in dopamine. In addition, the serotonergic pathway may have been impacted since 5-methoxyindoleacetate, a serotonin metabolite, was also down-modulated. Exposure to wastewater effluents was already reported to be able to disturb dopamine and serotonin levels in several studies conducted on freshwater *Elliptio complanata* mussels (Gagné et al., 2011c, Gagné et al., 2011b, Gagné et al., 2004; Gagné and Blaise, 2003). Similar results were as well highlighted by Bonnefille et al. (2018) in *M. galloprovincialis* exposed to 100 µg/L of diclofenac. In bivalves, dopamine (more generally catecholamines) and serotonin are involved in several reproductive functions. Both compounds play roles in sexual maturation, gamete multiplication and release (Gibbons and Castagna, 1984; Lafont and Mathieu, 2007; Martínez and Rivera, 1994). According to (Fong et al., 1993), spawning regulation in bivalves is dependent on the concentration of dopamine and serotonin, with dopamine inhibiting gamete release induced by serotonin. In view of their importance, a modulation of these compounds could significantly impair mussel reproduction.

#### 2.4.7. *Defense mechanisms*

Exposure of mussels to WWTP effluent extract induced defense mechanisms. Our analysis revealed a 34 % increase ( $p < 0.1$ ) in oxidized glutathione (GSSG) levels. GSSG up-modulation would indicate the presence of reactive oxygen species. Falfushynska et al. (2014) also revealed an elevated GSSG level in the digestive glands of freshwater mussels exposed to pharmaceutical and personal care products commonly found in WWTP effluents. Moreover, oxidative stress has already been noticed through different biomarkers analyzed in freshwater mussels after exposure to WWTP effluents (Gagné et al., 2011b; Goodchild et al., 2015). The occurrence of oxidative stress in digestive glands is not surprising regarding its functions. This organ accumulates contaminants and actively participates in the xenobiotic metabolism and detoxification (Faggio et al., 2018; Fernández et al., 2012; Porte et al., 2001).

Moreover, methionine acts as a precursor to glutathione (GSH) biosynthesis by providing sulfur atoms in cysteine synthesis (Stipanuk, 1986). The methionine down-modulation observed in this study could be explained by its use for the synthesis of GSH, which is then mobilized in oxidative stress defense, resulting in a GSSG elevation. Methionine can also serve as the principal methyl donor. Methylation is a conjugation pathway in xenobiotic metabolism, producing compounds with decreased biological activity (Silverman and Holladay, 2014).

## 2.5. Conclusion

Our non-targeted LC-HRMS metabolomics approach effectively highlighted the effects of a multi-contamination in a marine organism. The response of *M. galloprovincialis* to the WWTP effluents extract in this laboratory study was characterized by the presence of a high quantity of modulated metabolites, although only a few of them have been annotated or identified because of the current lack of knowledge on mussel metabolism. Among them, the main impacted metabolites belong to the metabolism of several amino acids, purine and pyrimidine metabolic pathway or citric acid cycle. According to the literature, molecular events observed in this study reflect potential disrupted biological processes such as energy metabolism, DNA and RNA synthesis, immune system, osmoregulation, byssus formation and adhesion, and reproduction. In addition to enriching knowledge about the impact of WWTP effluents in marine environment, our work then supports the relevance of metabolomics approach to highlight key molecular events triggered by chemical exposure, which could lead to negative impacts on individual fitness (growth, survival and reproduction). Metabolomics data, and more generally omics data (genomics, transcriptomics, proteomics), are very helpful in the characterization of contaminants' mode of action leading to an adverse outcome at the individual level. The integration of omics in a multilevel systems biology approach – combining molecular, cellular, tissue, individual and population level data – would represent a powerful and relevant approach, especially in ecological risk assessment. By reflecting specific responses of organisms to counteract potential toxic effects, metabolomics could offer useful information for further environmental monitoring and reveal which contaminant classes are exerting those effects (Jones et al., 2008; Van Aggelen Graham et al., 2010; Viant et al., 2003). Furthermore, effects-based monitoring may complement traditional methods based on chemical residue analysis, by hazard ranking of sites, effluents, etc., for prioritization of in-depth chemical analysis.

This study revealed the potential hazard of contaminants from medium to high polarity, discharged in coastal environment, on marine organisms. The first very promising results obtained in this laboratory study would deserve to be confirmed in a field study. Indeed, natural conditions can modulate some of the elements highlighted here depending on the trophic status of the environment and environmental conditions. Anyway, efforts must be focused on the removal of contaminants in

WWTPs to avoid ecotoxicological risks. Potential of metabolomics to predict adverse outcomes to individual could be exploited and integrated in ecological risk assessment and environmental monitoring.

### Aknowledgement & Funding

This research was funded by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of the Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (AMeCE 2015/1/091) and the Agence Nationale de la Recherche (IMAP ANR-16-CE34-0006-01). The doctoral fellowship of Thibaut Dumas was financially supported by the Agence Nationale de la Recherche (IMAP ANR-16-CE34-0006-01). The authors are grateful to Céline Roques and Bénédicte Marion (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, France) for their technical support.

### 2.6. References

- Almeida, A., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., **2014**. Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 156, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.002>.
- Almeida, Â., Freitas, R., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., **2015**. Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 172–173, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.004>.
- Babarro, J.M.F., Reiriz, M.J.F., **2010**. Secretion of byssal threads in *Mytilus galloprovincialis*: quantitative and qualitative values after spawning stress. *J. Comp. Physiol. B.* 180, 95–104. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0392-y>.
- Bandara, N., Zeng, H., Wu, J., **2013**. Marine mussel adhesion: biochemistry, mechanisms, and biomimetics. *J. Adhes. Sci. Technol.* 27, 2139–2162. <https://doi.org/10.1080/01694243.2012.697703>.
- Bebianno, M.J., Sroda, S., Gomes, T., Chan, P., Bonnafé, E., Budzinski, H., Geret, F., **2016**. Proteomic changes in *Corbicula fluminea* exposed to wastewater from a psychiatric hospital. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5046–5055. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5395-5>.
- Berlioz-Barbier, A., Buleté, A., Fildier, A., Garric, J., Vulliet, E., **2018**. Non-targeted investigation of benthic invertebrates (*Chironomus riparius*) exposed to wastewater treatment plant effluents using nanoliquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Chemosphere* 196, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.001>.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., **2009**. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239, 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>.
- Bonnefille, B., Gomez, E., Alali, M., Rosain, D., Fenet, H., Courant, F., **2018**. Metabolomics assessment of the effects of diclofenac exposure on *Mytilus galloprovincialis*: potential effects on osmoregulation and reproduction. *Sci. Total Environ.* 613–614, 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.146>.
- Bouchard, B., Gagné, F., Fortier, M., Fournier, M., **2009**. An in situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio*

- complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 150, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.002>.
- Boudah, S., Olivier, M.-F., Aros-Calt, S., Oliveira, L., Fenaille, F., Tabet, J.-C., Junot, C., **2014**. Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 966, 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.025>.
- Bundy, J.G., Davey, M.P., Viant, M.R., **2009**. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5, 3–21. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0152-0>.
- Calder, P.C., **2006**. Branched-chain amino acids and immunity. *J. Nutr.* 136. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.288S> 288S–93S.
- Cappello, T., Maisano, M., Mauceri, A., Fasulo, S., **2017**. 1 H NMR-based metabolomics investigation on the effects of petrochemical contamination in posterior adductor muscles of caged mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.040>.
- Carroll, M.A., Catapane, E.J., **2007**. The nervous system control of lateral ciliary activity of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 148, 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.06.003>.
- Chambers, M.C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D.L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T.A., Brusniak, M.-Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S.L., Nuwaysir, L.M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E.W., Moritz, R.L., Katz, J.E., Agus, D.B., Mac Coss, M., Tabb, D.L., Mallick, P., **2012**. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 30, 918–920. <https://doi.org/10.1038/nbt.2377>.
- Chen, H., Zha, J., Liang, X., Li, J., Wang, Z., **2014**. Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 155, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.001>.
- Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Antignac, J.-P., Bizec, B.L., **2009**. Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. *Analyst* 134, 1637–1646. <https://doi.org/10.1039/B901813A>.
- Courant, F., Antignac, J.-P., Dervilly-Pinel, G., Le Bizec, B., **2014**. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics* 14, 2369–2388. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400255>.
- Cruz, D., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., **2016**. Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. *Chemosphere* 160, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.068>.
- David, A., Lange, A., Abdul-Sada, A., Tyler, C.R., Hill, E.M., **2017**. Disruption of the prostaglandin metabolome and characterization of the pharmaceutical exposome in fish exposed to wastewater treatment works effluent as revealed by nanoflow-nanospray mass spectrometry-based metabolomics. *Environ. Sci. Technol.* 51, 616–624. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04365>.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., **2011**. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 442–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>.
- Dodder, N.G., Maruya, K.A., Lee Ferguson, P., Grace, R., Klosterhaus, S., La Guardia, M.J., Lauenstein, G.G., Ramirez, J., **2014**. Occurrence of contaminants of emerging concern in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast and the influence of land use, storm water discharge, and treated wastewater effluent. *Mar. Pollut. Bull.* 81, 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.041>.
- dos Santos, D.M., Buruaem, L., Gonçalves, R.M., Williams, M., Abessa, D.M.S., Kookana, R., de Marchi, M.R.R., **2018**. Multi-residue determination and predicted risk assessment of contaminants of

- emerging concern in marine sediments from the vicinities of submarine sewage outfalls. *Mar. Pollut. Bull.* 129, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.048>.
- Duan, D.S., Sadée, W., **1987**. Distinct effects of adenine and guanine starvation on DNA synthesis associated with different pool sizes of nucleotide precursors. *Cancer Res.* 47, 4047–4051.
- Eades, C., Waring, C.P., **2010**. The effects of diclofenac on the physiology of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Environ. Res.* 69 (Suppl), S46–S48. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.11.001>.
- Ericson, H., Thorsén, G., Kumblad, L., **2010**. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquat. Toxicol.* 99, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.017>.
- Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S., **2018**. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: an overview. *Sci. Total Environ.* 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>.
- Falfushynska, H.I., Gnatyshyna, L.L., Osadchuk, O.Y., Farkas, A., Vehovszky, A., Carpenter, D.O., Gyori, J., Stoliar, O.B., **2014**. Diversity of the molecular responses to separate wastewater effluents in freshwater mussels. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 164, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.04.007>.
- Farcy, E., Burgeot, T., Haberkorn, H., Auffret, M., Lagadic, L., Allenou, J.-P., Budzinski, H., Mazzella, N., Pete, R., Heydorff, M., Menard, D., Mondeguer, F., Caquet, T., **2013**. An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel *Mytilus edulis* in the Vilaine estuary, France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 630–650. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1316-z>.
- Fasulo, S., Iacono, F., Cappello, T., Corsaro, C., Maisano, M., D'Agata, A., Giannetto, A., De Domenico, E., Parrino, V., Lo Paro, G., Mauceri, A., **2012**. Metabolomic investigation of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) caged in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.001>.
- Feng, J., Liu, A., Zhu, W., **2017**. Toxic effects of atrazine on reproductive and immune systems in animal models. *Reprod. Syst. Sex. Disord.* 6. <https://doi.org/10.4172/2161-038X.1000208>.
- Fent, K., Weston, A., Caminada, D., **2006**. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>.
- Fernández, B., Campillo, J.A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J., **2012**. Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites. *Chemosphere* 87, 1235–1245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.024>.
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., **1994**. Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 27, 82–89.
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., **1995**. Chronic toxicity of diazinon to *Daphnia magna*: effects on survival, reproduction and growth. *Toxicol. Environ. Chem.* 49, 25–32. <https://doi.org/10.1080/02772249509358173>.
- Fong, P.P., Noordhuis, R., Ram, J.L., **1993**. Dopamine reduces intensity of serotonin induced spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (pallas). *J. Exp. Zool.* 266, 79–83.
- Freitas, R., Almeida, Â., Pires, A., Velez, C., Calisto, V., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Wrona, F.J., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., **2015**. The effects of carbamazepine on macro-invertebrate species: comparing bivalves and polychaetes biochemical responses. *Water Res.* 85, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.003>.
- Gagné, F., Blaise, C., **2003**. Effects of municipal effluents on serotonin and dopamine levels in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 136, 117–125. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00171-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00171-6).
- Gagné, F., Blaise, C., Hellou, J., **2004**. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year.

- Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 138, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.04.006>.
- Gagné, F., Cejka, P., André, C., Hausler, R., Blaise, C., **2007**. Neurotoxicological effects of a primary and ozonated treated wastewater on freshwater mussels exposed to an experimental flow-through system. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 460–470. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.006>.
- Gagné, F., André, C., Cejka, P., Hausler, R., Fournier, M., **2011a**. Alterations in DNA metabolism in *Elliptio complanata* mussels after exposure to municipal effluents. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 154, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.03.009>.
- Gagné, F., André, C., Cejka, P., Hausler, R., Fournier, M., **2011b**. Evidence of neuroendocrine disruption in freshwater mussels exposed to municipal wastewaters. *Sci. Total Environ.* 409, 3711–3718. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.037>.
- Gagné, F., Bouchard, B., André, C., Farcy, E., Fournier, M., **2011c**. Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 153, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.09.002>.
- Gardiner, D.B., Silverman, H., Dietz, T.H., **1991**. Musculature associated with the water canals in freshwater mussels and response to monoamines in vitro. *Biol. Bull.* 180, 453–465. <https://doi.org/10.2307/1542346>.
- Gibbons, M.C., Castagna, M., **1984**. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture* 40, 189–191. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90356-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90356-9).
- Gies, A., **1986**. Serotonin and dopamine as regulators of adenylate cyclase and relaxation in a smooth muscle of the mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 84, 61–66. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(86\)90165-9](https://doi.org/10.1016/0742-8413(86)90165-9).
- Gillis, P.L., Gagné, F., McInnis, R., Hooey, T.M., Choy, E.S., André, C., Hoque, M.E., Metcalfe, C.D., **2014**. The impact of municipal wastewater effluent on field-deployed freshwater mussels in the Grand River (Ontario, Canada). *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 134–143. <https://doi.org/10.1002/etc.2401>.
- Girón-Pérez, M.I., Santerre, A., Gonzalez-Jaime, F., Casas-Solis, J., Hernández-Coronado, M., Peregrina-Sandoval, J., Takemura, A., Zaitseva, G., **2007**. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish Shellfish Immunol* 23, 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.02.004>.
- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., **2012**. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.017>.
- Goodchild, C.G., Frederich, M., Zeeman, S.I., **2015**. AMP-activated protein kinase is a biomarker of energetic status in freshwater mussels exposed to municipal effluents. *Sci. Total Environ.* 512–513, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.065>.
- Graham, V.A., Ankley Gerald, T., Baldwin William, S., Bearden Daniel, W., Benson William, H., Kevin, C.J., Collette Tim, W., Craft John, A., Denslow Nancy, D., Embry Michael, R., Francesco, F., George Stephen, G., Helbing Caren, C., Hoekstra Paul, F., Taisen, I., Yoshi, K., Ioanna, K., Peter, K., Li, L., Lord Peter, G., Terry, M., Anne, O., Heather, O., Perkins Ed, J., Santos Eduarda, M., Skirrow Rachel, C., Snape Jason, R., Tyler Charles, R., Don, V., Viant Mark, R., Volz David, C., Williams Tim, D., Lorraine, Y., **2010**. Integrating Omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environ. Health Perspect.* 118, 1–5. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900985>.
- Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M., Schlenk, D., **2002**. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals ( $\beta$ -blockers) on aquatic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 229–235. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1182-7>.
- Ings, J.S., Servos, M.R., Vijayan, M.M., **2011**. Hepatic transcriptomics and protein expression in rainbow trout exposed to municipal wastewater effluent. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2368–2376. <https://doi.org/10.1021/es103122g>.

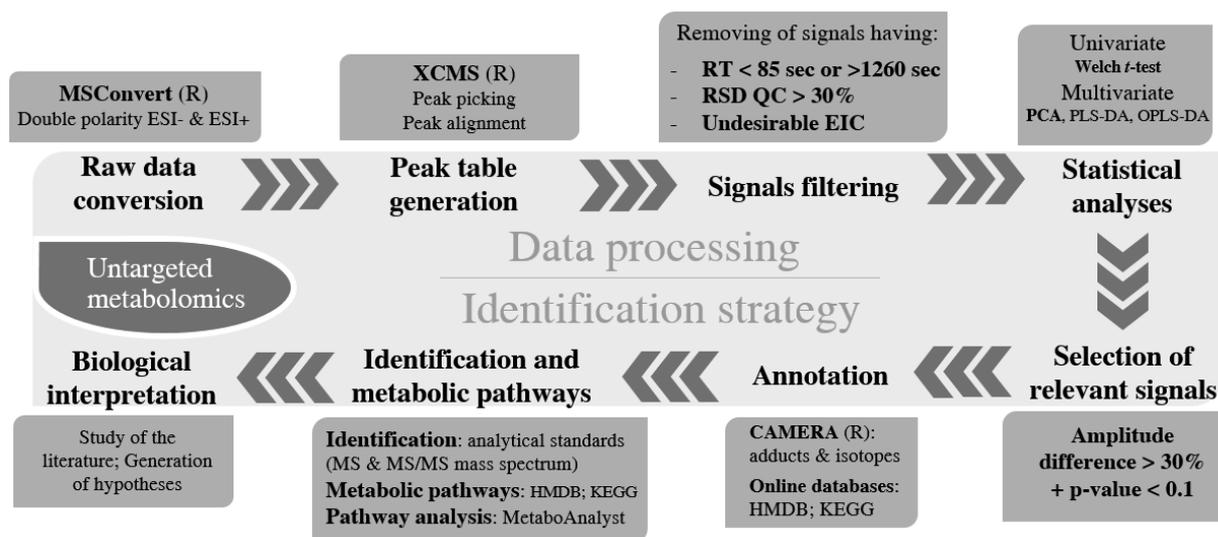
- Jones, O., Dondero, F., Viarengo, A., Griffin, J., **2008**. Metabolic profiling of *Mytilus galloprovincialis* and its potential applications for pollution assessment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 369, 169–179. <https://doi.org/10.3354/meps07654>.
- Karagiannis, D., Vatsos, I.N., Angelidis, P., **2011**. Effects of atrazine on the viability and the formation of byssus of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquac. Int.* 19, 103–110. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9344-5>.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, M.E., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., **2002**. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. <https://doi.org/10.1021/es011055j>.
- Lafont, R., Mathieu, M., **2007**. Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 16, 109–130. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0113-1>.
- Lankadurai, B.P., Nagato, E.G., Simpson, M.J., **2013**. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environ. Rev.* 21, 180–205. <https://doi.org/10.1139/er-2013-0011>.
- Lignot, J.-H., Pannier, F., Trilles, J.-P., Charmantier, G., **1998**. Effects of tributyltin oxide on survival and osmoregulation of the shrimp *Penaeus japonicus* (crustacea, decapoda). *Aquat. Toxicol.* 41, 277–299. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00088-X).
- Lin, C.Y., Viant, M.R., Tjeerdema, R.S., **2006**. Metabolomics: methodologies and applications in the environmental sciences. *J. Pestic. Sci.* 31, 245–251.
- Liu, X., Sun, H., Wang, Y., Ma, M., Zhang, Y., **2014**. Gender-specific metabolic responses in hepatopancreas of mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol* 40, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.002>.
- Loos, R., Carvalho, R., António, D.C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R.H., Schwesig, D., Gawlik, B.M., **2013**. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* 47, 6475–6487. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.024>.
- Lucas, J.M., Vaccaro, E., Waite, J.H., **2002**. A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Biol.* 205, 1807–1817.
- Martínez, G., Rivera, A., **1994**. Role of monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 25, 167–174. <https://doi.org/10.1080/07924259.1994.9672381>.
- Martyniuk, C.J., **2018**. Are we closer to the vision? A proposed framework for incorporating omics into environmental assessments. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 59, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.005>.
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F., **2018a**. Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar. Environ. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>.
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F., **2018b**. Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar. Environ. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>.
- Miller, M.G., **2007**. Environmental metabolomics: a SWOT analysis (strengths, weaknesses, opportunities, and threats). *J. Proteome Res.* 6, 540–545. <https://doi.org/10.1021/pr060623x>.
- Moles, A., Hale, N., **2003**. Use of physiological responses in *Mytilus trossulus* as integrative bioindicators of sewage pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 954–958. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00108-5).
- Moyes, C.D., Suarez, R.K., Hochachka, P.W., Ballantyne, J.S., **1990**. A comparison of fuel preferences of mitochondria from vertebrates and invertebrates. *Can. J. Zool.* 68, 1337–1349. <https://doi.org/10.1139/z90-201>.

- Nguyen, T.V., Alfaro, A.C., Merien, F., Young, T., Grandiosa, R., **2018**. Metabolic and immunological responses of male and female new Zealand Greenshell™ mussels (*Perna canaliculus*) infected with *Vibrio* sp. *J. Invertebr. Pathol.* 157, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.08.008>.
- Nobles, T., Zhang, Y., **2015**. Survival, growth and condition of freshwater mussels: effects of municipal wastewater effluent. *PLoS One* 10, e0128488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128488>.
- Oliveira, P., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., **2017**. Physiological and biochemical alterations induced in the mussel *Mytilus galloprovincialis* after short and long-term exposure to carbamazepine. *Water Res.* 117, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.052>.
- Oropesa, A.L., Floro, A.M., 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6907-7>.
- Picot Groz, M., Martinez Bueno, M.J., Rosain, D., Fenet, H., Casellas, C., Pereira, C., Maria, V., Bebianno, M.J., Gomez, E., **2014**. Detection of emerging contaminants (UV filters, UV stabilizers and musks) in marine mussels from Portuguese coast by QuEChERS extraction and GC–MS/MS. *Sci. Total Environ.* 493, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.062>.
- Porte, C., Solé, M., Borghi, V., Martinez, M., Chamorro, J., Torreblanca, A., Ortiz, M., Orbea, A., Soto, M., Cajaraville, M.P., **2001**. Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Spanish Mediterranean coast. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 6, 335–350. <https://doi.org/10.1080/13547500110044771>.
- Ram, J.L., Moore, D., Putchakayala, S., Paredes, A.A., Ma, D., Croll, R.P., **1999**. Serotonergic responses of the siphons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 124, 211–220.
- Sánchez-Avila, J., Tauler, R., Lacorte, S., **2012**. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: sources distribution and potential risk. *Environ. Int.* 46, 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.04.013>.
- Saravanan, M., Ramesh, M., **2013**. Short and long-term effects of clofibric acid and diclofenac on certain biochemical and ionoregulatory responses in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Chemosphere* 93, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.015>.
- Sato, T., Qadir, M., Yamamoto, S., Endo, T., Zahoor, A., **2013**. Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use. *Agric. Water Manag.* 130, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.08.007>.
- Serrano, F.S.J., López, J.S., Martín, L.O.G., **1995**. Caffeine inhibition of glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle tissue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 911–916. [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(95\)00058-W](https://doi.org/10.1016/1357-2725(95)00058-W).
- Silverman, R.B., Holladay, M.W., **2014**. Chapter 8- drug metabolism. In: Silverman, R.B., Holladay, M.W. (Eds.), *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Third edition *Academic Press, Boston*, pp. 357–422. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382030-3.00008-8>.
- Silverman, H.G., Roberto, F.F., **2007**. Understanding marine mussel adhesion. *Mar. Biotechnol.* N. Y. N 9, 661–681. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9053-x>.
- Simmons, D.B.D., Miller, J., Clarence, S., McCallum, E.S., Balshine, S., Chandramouli, B., Cosgrove, J., Sherry, J.P., **2017**. Altered expression of metabolites and proteins in wild and caged fish exposed to wastewater effluents *in situ*. *Sci. Rep.* 7, 17000. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12473-6>.
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., **2006**. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using non-linear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., **2012**. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>.
- Solé, M., Shaw, J.P., Frickers, P.E., Readman, J.W., Hutchinson, T.H., **2010**. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and

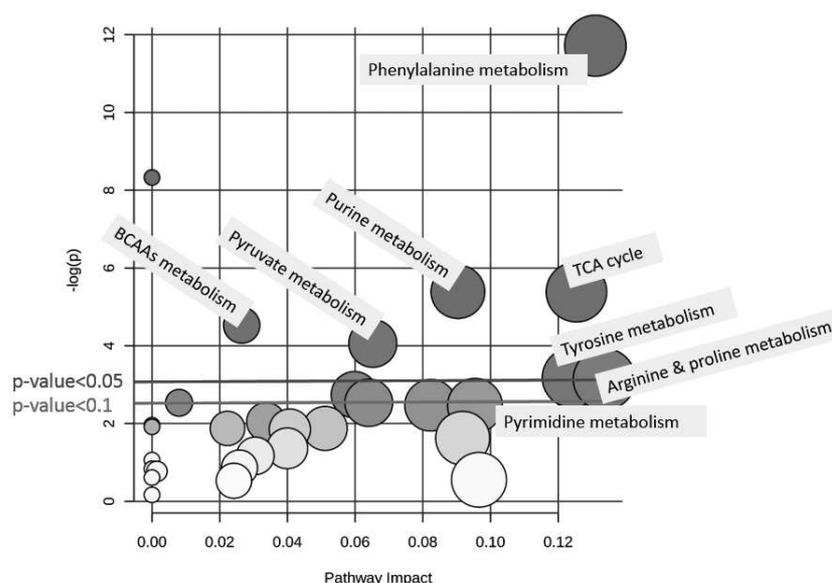
- acetaminophen. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 649–656. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3182-1>.
- Sommer, M.J., Mantel, L.H., **1988**. Effect of dopamine, cyclic AMP, and pericardial organs on sodium uptake and Na/K-ATPase activity in gills of the green crab *Carcinus maenas* (L). *J. Exp. Zool.* 248, 272–277. <https://doi.org/10.1002/jez.1402480305>.
- Song, Y., Chai, T., Yin, Z., Zhang, X., Zhang, W., Qian, Y., Qiu, J., **2018**. Stereoselective effects of ibuprofen in adult zebrafish (*Danio rerio*) using UPLC-TOF/MS-based metabolomics. *Environ. Pollut.* 241, 730–739. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.009>.
- Stipanuk, M.H., **1986**. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu. Rev. Nutr.* 6, 179–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.001143>.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reilly, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., **2007**. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>.
- Toro, B., Navarro, J.M., Palma-Fleming, H., **2003**. Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant mussel, *Choromytilus chorus* (Mollusca: Mytilidae). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 63, 257–269.
- Tsiaka, P., Tsalpali, V., Ntaikou, I., Kostopoulou, M.N., Lyberatos, G., Dailianis, S., **2013**. Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology* 22, 1208–1220. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1108-3>.
- Velisek, J., Stastna, K., Sudova, E., Turek, J., Svobodova, Z., **2009**. Effects of subchronic simazine exposure on some biometric, biochemical, hematological and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Neuro Endocrinol. Lett.* 30 (Suppl. 1), 236–241.
- Velisek, J., Stara, A., Kolarova, J., Svobodova, Z., **2011**. Biochemical, physiological and morphological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.05.004>.
- Viant, M.R., Rosenblum, E.S., Tierdema, R.S., **2003**. NMR-based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4982–4989.
- Vidal-Dorsch, D.E., Bay, S.M., Maruya, K., Snyder, S.A., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., **2012**. Contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents and marine receiving water. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2674–2682. <https://doi.org/10.1002/etc.2004>.
- Wang, S., Hong, H., Wang, X., **2005**. Bioenergetic responses in green lipped mussels (*Perna viridis*) as indicators of pollution stress in Xiamen coastal waters, China. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 738–743. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.024>.
- Want, E.J., Masson, P., Michopoulos, F., Wilson, I.D., Theodoridis, G., Plumb, R.S., Shockcor, J., Loftus, N., Holmes, E., Nicholson, J.K., **2013**. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat. Protoc.* 8, 17–32. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.135>.
- Wu, H., Wang, W.-X., **2011**. Tissue-specific toxicological effects of cadmium in green mussels (*Perna viridis*): nuclear magnetic resonance-based metabolomics study. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 806–812. <https://doi.org/10.1002/etc.446>.
- Xia, J., Wishart, D.S., **2010**. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2342–2344. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq418>.
- Xu, H.-D., Wang, J.-S., Li, M.-H., Liu, Y., Chen, T., Jia, A.-Q., **2015**. <sup>1</sup>H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 159, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.020>.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N., **1982**. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214–1222.

Yoshizawa, F., 2004. Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun., Branched Chain Amino Acids* 313, 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.07.013>.

## 2.7. Supplementary data



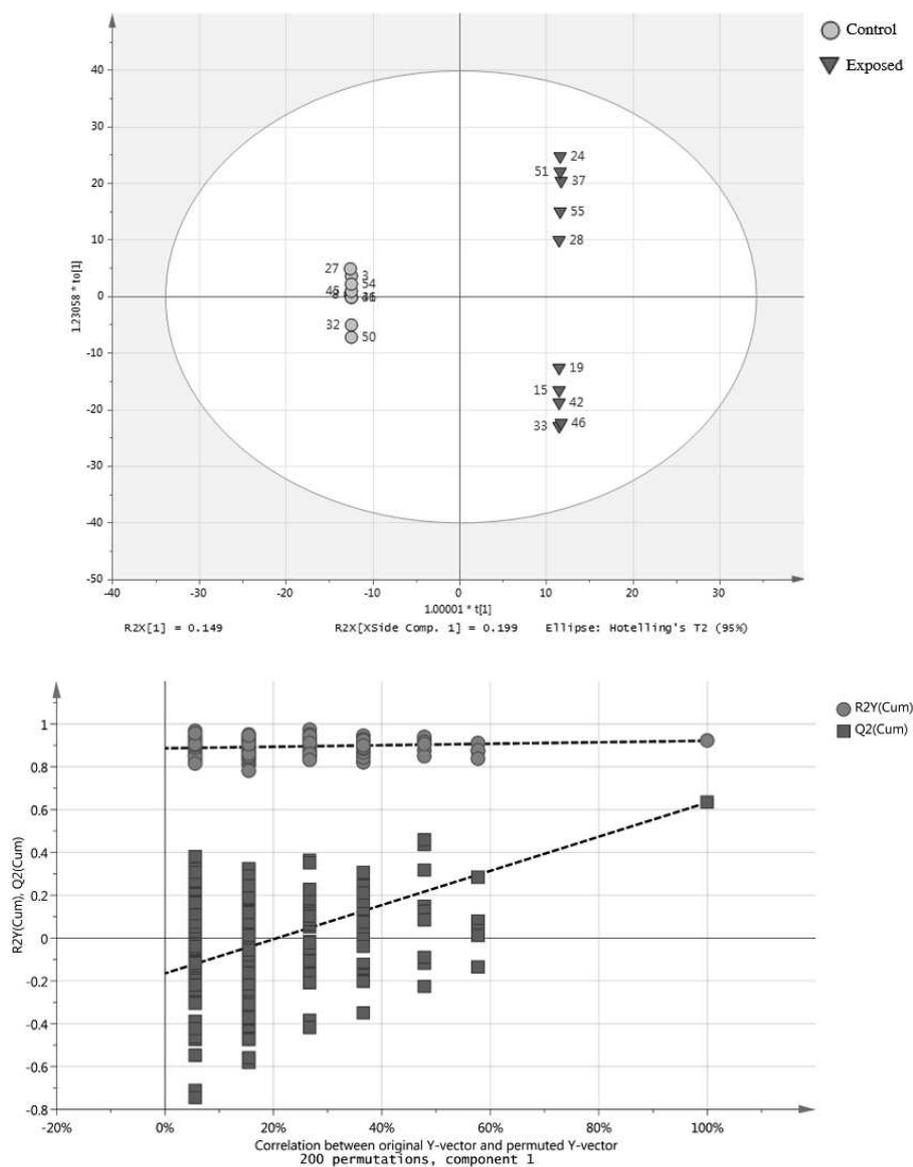
**Figure S1:** Workflow of data processing and identification strategy used for the identification of metabolites impacted by a WWTP effluent extract exposure in *Mytilus galloprovincialis*.



Pathway Name	Match Status	p	$-\log(p)$	Holm p	FDR	Impact	Details
<a href="#">Phenylalanine metabolism</a>	<a href="#">7/45</a>	8.1509E-6	11.717	6.5207E-4	6.5207E-4	0.13099	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Aminoacyl-tRNA biosynthesis</a>	<a href="#">7/75</a>	2.4179E-4	8.3274	0.019101	0.0096716	0.0	<a href="#">KEGG</a>
<a href="#">Purine metabolism</a>	<a href="#">6/92</a>	0.0045676	5.3888	0.35627	0.091649	0.09039	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Citrate cycle (TCA cycle)</a>	<a href="#">3/20</a>	0.0045825	5.3855	0.35627	0.091649	0.1254	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Valine, leucine and isoleucine biosynthesis</a>	<a href="#">3/27</a>	0.010802	4.528	0.82093	0.17283	0.0265	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Pyruvate metabolism</a>	<a href="#">3/32</a>	0.017244	4.0603	1.0	0.22992	0.06524	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Tyrosine metabolism</a>	<a href="#">4/76</a>	0.041485	3.1824	1.0	0.43215	0.12422	<a href="#">KEGG SMP SMP</a>
<a href="#">Arginine and proline metabolism</a>	<a href="#">4/77</a>	0.043215	3.1416	1.0	0.43215	0.13363	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Alanine, aspartate and glutamate metabolism</a>	<a href="#">2/24</a>	0.064403	2.7426	1.0	0.52398	0.05983	<a href="#">KEGG SMP SMP SMP</a>
<a href="#">Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis</a>	<a href="#">2/27</a>	0.079279	2.5348	1.0	0.52398	0.008	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Pantothenate and CoA biosynthesis</a>	<a href="#">2/27</a>	0.079279	2.5348	1.0	0.52398	0.06405	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">beta-Alanine metabolism</a>	<a href="#">2/28</a>	0.084458	2.4715	1.0	0.52398	0.08236	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Pyrimidine metabolism</a>	<a href="#">3/60</a>	0.085146	2.4634	1.0	0.52398	0.09541	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis</a>	<a href="#">2/36</a>	0.12915	2.0468	1.0	0.66272	0.0337	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Glutathione metabolism</a>	<a href="#">2/38</a>	0.14106	1.9586	1.0	0.66272	0.0	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Nitrogen metabolism</a>	<a href="#">2/39</a>	0.14711	1.9166	1.0	0.66272	0.0	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Valine, leucine and isoleucine degradation</a>	<a href="#">2/40</a>	0.15321	1.876	1.0	0.66272	0.02232	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Butanoate metabolism</a>	<a href="#">2/40</a>	0.15321	1.876	1.0	0.66272	0.05114	<a href="#">KEGG SMP</a>
<a href="#">Tryptophan metabolism</a>	<a href="#">3/79</a>	0.1574	1.849	1.0	0.66272	0.04072	<a href="#">KEGG SMP</a>

**Figure S2:** Pathway analysis of annotated and identified metabolites performed with MetaboAnalyst 4.0 (Xia and Wishart, 2010)

The Pathway Analysis (Figure S2) associated with the table output was performed with the following algorithms: hypergeometric test for the over representation analysis and relative-betweenness centrality concerning the pathway topology analysis (that calculate the pathway impact). As no metabolome of any bivalves is available neither on MetaboAnalyst nor in literature, we have selected the human metabolome as reference.



**Figure S3:** OPLS-DA score plot (1 predictive component and 1 orthogonal component;  $R2X = 0.367$ ,  $R2Y = 0.912$ ,  $Q2 = 0.63$ ) of metabolic fingerprints from control (green circle) and exposed (red triangle) mussels, validated with cross-validation (leave-one-out). The numbers represent the injection order.

**Table S1:** Screening of 80 pharmaceutically active compounds, pesticides and, their metabolites suspected in the WWTP effluent extract.

Class	Compounds	Elemental composition	Standard retention time (min)	Occurrence in WWTP effluent extract
<b>Analgesic</b>	4-acetylaminoantipyrine (Noramidopyrine metabolite)	C13H15N3O2	5.72	Confirmed
	4-aminoantipyrine (Noramidopyrine metabolite)	C11H13N3O	3.24	Rejected
	4-formylaminoantipyrine (Noramidopyrine metabolite)	C12H13N3O2	5.76	Confirmed
	4-methylaminoantipyrine (Noramidopyrine metabolite)	C12H15N3O	3.01	Rejected
	Acetaminophen	C8H9NO2	3.55	Confirmed
	Antipyrine	C11H12N2O	6.78	Confirmed
	Codeine	C18H21NO3	3.86	Confirmed
	Indomethacin	C19H16ClNO4	10.71	Rejected
	Ketoprofen	C16H14O3	9.8	Confirmed
	Ketorolac	C15H13NO3	9.08	Rejected
	Mefenamic acid	C15H15NO2	11.52	Confirmed
	Naproxen	C14H14O3	9.73	Rejected
	Propyphenazone	C14H18N2O	9.25	Rejected
<b>Anesthetics</b>	Mepivacaine	C15H22N2O	6.29	Confirmed
<b>Anthelmintics</b>	Albendazole	C12H15N3O2S	8.17	Rejected
	Dichlorvos	C4H7Cl2O4P	9.03	Rejected
<b>Antibiotic</b>	Amoxicillin	C16H19N3O5S	6.19	Confirmed
	Ciprofloxacin	C17H18FN3O3	6.05	Rejected
	Enrofloxacin	C19H22FN3O3	6.27	Rejected
	Flumequine	C14H12NFO3	9.02	Confirmed
	Metronidazole	C6H9N3O3	3.7	Confirmed
	Norfloxacin	C16H18FN3O3	5.93	Rejected
	Ofloxacin	C18H20FN3O4	5.94	Confirmed
	Oxolinic acid	C13H11NO5	7.96	Rejected
	Sulfadiazine	C10H10N4O2S	5.35	Rejected
	Sulfamethazine	C12H14N4O2S	6.76	Rejected
	Sulfamethoxazole	C10H11N3O3S	7.91	Confirmed
	Sulfapyridine	C11H11N3O2S	5.98	Confirmed
	Trimethoprim	C14H18N4O3	5.82	Confirmed
<b>Antineoplastic agents</b>	Cyclophosphamide	C7H15Cl2N2O2P	7.89	Confirmed
	Ifosfamide	C7H15Cl2N2O2P	7.78	Confirmed
<b>Antiseptic</b>	Clotrimazole	C22H17ClN2	8.56	Rejected
<b>Benzodiazepine</b>	Oxazepam	C15H11ClN2O2	8.94	Confirmed

Table S1 (continued)

Class	Compounds	Elemental composition	Standard retention time (min)	Occurrence in WWTP effluent extract
<b>Beta-Blockers</b>	Atenolol	C14H22N2O3	2.31	Confirmed
	Metoprolol	C15H25NO3	6.62	Confirmed
	Nadolol	C17H27NO4	5.55	Confirmed
	Propranolol	C16H21NO2	7.5	Confirmed
	Sotalol	C12H20N2O3S	2.66	Confirmed
<b>Bronchodilators</b>	Salbutamol	C13H21NO3	2.24	Confirmed
	Terbutaline	C12H19NO3	2.31	Rejected
<b>Corticosteroids</b>	Methylprednisolone	C22H30O5	8.5	Confirmed
<b>Lipid regulators</b>	Fenofibrate	C20H21ClO4	12.89	Rejected
	Fenofibric acid	C17H15ClO4	10.83	Confirmed
<b>Non-steroidal anti-inflammatory drug</b>	Diclofenac	C14H11Cl2NO2	10.86	Confirmed
<b>Psychiatrics-Drug</b>	10,11-epoxycarbamazepine (Carbamazepine metabolite)	C15H12N2O2	7.9	Confirmed
	Amitriptyline	C20H23N	8.27	Confirmed
	Carbamazepine	C15H12N2O	8.7	Confirmed
	Citalopram	C20H21FN2O	7.78	Confirmed
	Clomipramine hydrochloride	C19H23ClN2	8.54	Rejected
	Fluoxetine	C17H18F3NO	8.44	Rejected
	Paroxetine	C19H20FNO3	8.03	Rejected
	Primidone	C12H14N2O2	6.89	Confirmed
	Venlafaxine	C17H27NO2	7.19	Confirmed
<b>Selective estrogen receptor modulators</b>	Tamoxifen	C26H29NO	9.54	Rejected
<b>Stimulants</b>	Caffeine	C8H10N4O2	5.25	Confirmed
	Cotinine (Nicotine metabolite)	C10H12N2O	1.57	Rejected
	Nicotine	C10H14N2	1.46	Confirmed
	Paraxanthine (Caffeine metabolite)	C7H8N4O2	3.29	Confirmed
<b>Ulcer healings</b>	Famotidine	C8H15N7O2S3	1.58	Rejected
	Lansoprazole	C16H14F3N3O2S	7.98	Rejected
	Loratadine	C22H23ClN2O2	8.73	Rejected
	Omeprazole	C17H19N3O3S	6.95	Confirmed
	Ranitidine	C13H22N4O3S	2.46	Confirmed
<b>Algicides</b>	Irgarol	C11H19N5S	9.38	Rejected
<b>Antioxidant</b>	Ethoxyquine	C14H19NO	9.06	Rejected

Table S1 (continued)

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

Class	Compounds	Elemental composition	Standard retention time (min)	Occurrence in WWTP effluent extract
<b>Fungicides</b>	Leucomalachite green (Malachite green metabolite)	C23H26N2	8.9	Rejected
	Malachite green (Benzothiazol-2-ylthio)methyl thiocyanate (TCMTB)	C23H24N2	8.8	Rejected
		C9H6N2S3	10.92	Rejected
<b>Herbicides</b>	Atrazine	C8H14ClN5	9.64	Confirmed
	Isoproturon	C12H18N2O	9.64	Rejected
	Simazine	C7H12ClN5	8.79	Confirmed
	Terbutryn	C10H19N5S	9.1	Confirmed
	Trifluralin	C13H16F3N3O4	13.04	Rejected
<b>Insecticides</b>	Carbaryl	C12H11NO2	9.54	Rejected
	Chlorfenvinphos	C12H14Cl3O4P	11.57	Rejected
	Chlorpyrifos-methyl	C7H7Cl3NO3PS	12.18	Rejected
	Diiflubenzuron	C14H9ClF2N2O2	11.02	Rejected
	Diphenyl sulfone	C12H10O2S	10.11	Rejected
	Fipronil	C12H4Cl2F6N4OS	11.61	Confirmed
	Teflubenzuron	C14H6Cl2F4N2O2	12.04	Rejected

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2:** Summary of the differential features with  $p < 0.05$  modulated by exposure to wastewater treatment plant effluent extract in mussel digestive glands. When a putative annotation based on the accurate measured monoisotopic masses is possible, it is reported in the "putative annotation" part of the table.

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
+	131.0814	3.00	↓	-59	0.0004	1-pyrroline-5-carboxylic acid or 1-pyrroline-2-carboxylic acid	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	131.0815	1	Arginine and proline metabolism
-	94.0283	1.55	↓	-70	0.0174		[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	94.0293	11	
-	98.0598	1.68	↓	-40	0.0267	5-aminopentanoic acid	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	98.0606	8	
-	201.1347	2.88	↓	-64	0.0001	Asymmetric dimethylarginine	[M-H] <sup>-</sup>	201.1357	5	
+	203.1499	2.85	↓	-68	0.0024		[M+H] <sup>+</sup>	203.1503	2	
-	257.0774	2.43	↓	-52	0.0030	Pyrroline hydroxycarboxylic acid	[2M-H] <sup>-</sup>	257.0779	2	
-	135.0284	1.43	↑	+134	0.0221	Hydroxypropionic acid	[M+FA-H] <sup>-</sup>	135.0299	11	Beta-alanine metabolism
-	298.0697	7.20	↑	+177	0.0279	D-4'-phosphopantothenate	[M-H] <sup>-</sup>	298.0697	0	
+	205.1179	4.70	↓	-57	0.0343	2-keto-6-acetamidocaproate	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	205.1183	2	Lysine degradation
-	101.0229	1.45	↓	-49	0.0375	Succinic acid semialdehyde	[M-H] <sup>-</sup>	101.0244	15	Gutamate metabolism
-	247.0930	2.40	↓	-62	0.0034	1-aminocyclopropanecarboxylic acid	[2M+FA-H] <sup>-</sup>	247.0936	2	
-	216.1344	4.38	↓	-37	0.0363	Beta-alanyl-l-lysine or Gamma-glutamyl-l-putrescine	[M-H] <sup>-</sup>	216.1354	5	
-	83.0124	1.67	↑	+61	0.0398	Succinic acid semialdehyde or (s)-methylmalonic acid semialdehyde or 2-methyl-3-oxopropanoic acid	[M-H <sub>2</sub> O-H] <sup>-</sup>	83.0133	11	
-	295.0325	6.95	↓	-45	0.0009	2-oxo-4-methylthiobutanoic acid or 5'-phosphoribosyl-n-formylglycinamide	[2M-H] <sup>-</sup>	295.0316	3	

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	57.9743	3.12	↓	-62	0.0244					
+	105.0699	10.91	↓	-81	0.0148					
-	112.022	1.73	↓	-57	0.0017					
+	116.5739	3.03	↓	-51	0.0325					
+	123.0996	10.90	↓	-72	0.0356					
+	129.576	3.03	↓	-67	0.0003					
+	136.0213	10.99	↓	-59	0.0001					
+	137.0247	10.99	↓	-74	0.0000					
+	143.1177	8.62	↓	-54	0.0147					
-	165.0656	9.12	↓	-50	0.0361					
+	174.1274	14.74	↓	-65	0.0002					
-	187.0966	8.63	↓	-71	0.0048					
-	188.111	8.64	↓	-64	0.0165					
-	188.111	9.15	↓	-53	0.0051					
+	192.0837	13.79	↓	-65	0.0010					
-	203.0175	1.92	↓	-65	0.0151					
-	203.1026	4.70	↓	-53	0.0416					
+	203.1387	9.22	↓	-54	0.0053					
-	205.0643	5.99	↓	-56	0.0097					
-	211.1078	4.70	↓	-69	0.0008					
-	212.0517	3.36	↑	+147	0.0448					
+	213.1229	4.73	↓	-76	0.0001					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	213.1235	7.64	↓	-50	0.0142					
-	214.0535	7.72	↑	+373	0.0273					
-	216.0302	2.54	↓	-50	0.0068					
-	216.1232	8.32	↓	-73	0.0107					
-	217.0033	4.37	↓	-60	0.0011					
-	217.0362	8.03	↑	+151	0.0383					
-	217.1184	5.34	↓	-67	0.0179					
-	217.1184	8.76	↓	-53	0.0054					
+	219.1335	8.76	↓	-53	0.0056					
-	222.0955	10.14	↓	-57	0.0067					
-	223.1079	2.99	↓	-62	0.0182					
+	226.0818	2.92	↓	-61	0.0070					
-	227.1029	5.48	↓	-72	0.0150					
-	227.1393	9.24	↓	-51	0.0134					
-	229.155	9.95	↓	-56	0.0032					
-	229.155	10.61	↓	-54	0.0061					
-	230.1138	5.05	↓	-65	0.0205					
-	230.1249	3.03	↓	-52	0.0102					
-	231.1342	4.92	↓	-51	0.0310					
+	231.1698	9.92	↓	-55	0.0070					
+	231.1698	10.59	↓	-55	0.0034					
+	233.149	9.08	↓	-57	0.0042					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	234.9845	7.96	↓	-57	0.0130					
-	237.0873	7.84	↓	-58	0.0040					
+	237.1229	10.39	↓	-54	0.0015					
+	239.1022	7.82	↓	-58	0.0035					
-	241.1186	9.37	↓	-59	0.0012					
-	241.1187	8.30	↓	-68	0.0020					
+	243.1333	9.36	↓	-68	0.0013					
-	244.1295	8.41	↓	-59	0.0481					
-	244.1296	8.88	↓	-61	0.0063					
-	245.1136	5.66	↓	-66	0.0042					
-	245.1136	4.72	↓	-62	0.0032					
-	245.1137	4.32	↓	-52	0.0029					
+	245.1855	12.84	↓	-56	0.0080					
-	248.0286	3.36	↑	+153	0.0223					
-	249.0909	6.35	↓	-55	0.0117					
-	251.1031	9.84	↓	-51	0.0099					
+	252.1954	11.57	↓	-54	0.0115					
+	252.6412	14.61	↓	-56	0.0015					
-	258.0576	3.36	↑	+146	0.0386					
-	258.1454	8.95	↓	-54	0.0062					
-	259.0592	3.36	↑	+155	0.0377					
-	259.1293	9.38	↓	-65	0.0012					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	259.1293	5.66	↓	-63	0.0057					
-	259.1293	6.42	↓	-55	0.0156					
-	259.1405	3.00	↓	-53	0.0009					
-	260.0548	3.36	↑	+154	0.0431					
-	260.1038	11.42	↓	-75	0.0107					
-	260.1329	9.38	↓	-63	0.0015					
+	260.16	8.93	↓	-53	0.0108					
+	261.1436	5.67	↓	-61	0.0055					
+	261.1438	9.36	↓	-67	0.0008					
+	262.1869	2.58	↑	+61	0.0025					
-	265.1189	10.21	↓	-51	0.0055					
+	265.154	11.90	↓	-57	0.0033					
+	267.1335	10.18	↓	-60	0.0074					
+	267.1361	13.41	↓	-55	0.0354					
+	273.1546	14.60	↓	-55	0.0021					
-	274.1404	9.23	↓	-51	0.0195					
-	275.1034	8.97	↓	-56	0.0015					
-	277.0858	4.84	↓	-67	0.0000					
-	278.1142	9.93	↓	-50	0.0080					
+	281.1523	14.26	↓	-53	0.0048					
-	285.1396	4.36	↓	-53	0.0282					
-	288.156	9.27	↓	-63	0.0032					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	292.2279	11.06	↓	-56	0.0090					
-	292.9875	1.88	↓	-59	0.0344					
-	293.1504	10.51	↓	-67	0.0022					
-	297.0659	7.22	↑	+178	0.0206					
-	302.0655	3.30	↑	+149	0.0482					
-	304.0624	3.30	↑	+134	0.0451					
-	304.1219	10.35	↑	+627	0.0405					
-	304.122	9.86	↑	+494	0.0404					
-	304.1914	13.65	↑	+192	0.0363					
-	315.1961	14.58	↓	-61	0.0015					
-	316.1085	4.36	↓	-60	0.0010					
-	316.1508	8.29	↓	-55	0.0058					
-	317.0267	9.14	↓	-71	0.0082					
-	317.0662	8.64	↓	-67	0.0083					
-	317.112	4.37	↓	-58	0.0035					
-	318.1376	10.87	↑	+554	0.0195					
-	328.151	8.12	↓	-78	0.0001					
-	335.2338	10.26	↓	-53	0.0140					
-	336.1201	9.17	↓	-62	0.0083					
-	336.2176	11.05	↓	-53	0.0110					
-	337.0772	1.44	↓	-70	0.0001					
-	342.1665	9.36	↓	-66	0.0015					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	342.1666	7.97	↓	-65	0.0118					
-	342.1666	9.77	↓	-57	0.0355					
-	346.1615	9.32	↓	-61	0.0043					
-	353.0781	4.38	↓	-57	0.0037					
-	356.1458	10.99	↓	-65	0.0001					
-	358.1033	4.37	↓	-61	0.0012					
-	359.1566	8.39	↓	-67	0.0054					
-	360.0986	4.37	↓	-60	0.0010					
-	360.1408	7.27	↓	-69	0.0232					
-	360.1408	8.76	↓	-66	0.0005					
-	361.1051	4.36	↓	-57	0.0007					
-	362.0092	3.36	↑	+148	0.0321					
-	367.2119	12.69	↓	-53	0.0133					
-	372.0379	3.36	↑	+137	0.0493					
-	373.0393	3.36	↑	+149	0.0445					
-	373.1723	8.68	↓	-60	0.0018					
-	374.1564	7.33	↓	-65	0.0024					
-	374.1565	9.24	↓	-64	0.0001					
-	374.1565	7.86	↓	-61	0.0030					
-	375.1599	9.25	↓	-60	0.0000					
+	376.1709	9.24	↓	-68	0.0008					
+	383.3299	18.38	↓	-62	0.0378					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	388.1723	9.70	↓	-69	0.0008					
-	394.125	8.80	↓	-68	0.0056					
-	406.1038	4.37	↓	-59	0.0013					
-	407.1073	4.37	↓	-60	0.0015					
-	408.1409	9.05	↓	-63	0.0088					
-	408.2517	12.88	↓	-67	0.0045					
-	409.2554	12.88	↓	-63	0.0057					
-	412.0594	4.38	↓	-54	0.0018					
-	418.03824	6.93	↓	-71	0.0063					
-	419.1838	12.44	↓	-50	0.0169					
-	424.2467	12.62	↓	-57	0.0101					
-	425.25	12.62	↓	-53	0.0141					
+	426.261	12.61	↓	-58	0.0149					
-	428.0668	6.92	↓	-62	0.0004					
-	429.1256	1.99	↓	-60	0.0009					
-	430.1292	1.99	↓	-64	0.0016					
-	431.0754	6.93	↓	-61	0.0003					
+	433.9988	1.86	↓	-52	0.0019					
-	434.267	13.15	↓	-62	0.0099					
-	436.2827	13.70	↓	-57	0.0081					
-	437.0864	7.47	↑	+315	0.0230					
-	437.2861	13.70	↓	-57	0.0079					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	438.2883	13.71	↓	-62	0.0062					
+	438.297	13.70	↓	-56	0.0091					
+	439.3007	13.72	↓	-55	0.0080					
-	447.1913	8.13	↓	-62	0.0017					
+	449.9726	1.87	↓	-55	0.0005					
-	450.2622	12.88	↓	-62	0.0082					
-	450.2983	14.14	↓	-51	0.0082					
-	451.3018	14.14	↓	-51	0.0083					
-	452.2775	13.40	↓	-51	0.0295					
+	452.3127	14.14	↓	-51	0.0078					
-	453.2809	13.40	↓	-51	0.0313					
+	453.3161	14.15	↓	-56	0.0053					
-	454.2837	13.41	↓	-51	0.0310					
+	454.2921	13.40	↓	-51	0.0383					
-	458.2667	13.07	↓	-56	0.0183					
-	460.2826	13.48	↓	-64	0.0100					
-	461.2864	13.49	↓	-63	0.0101					
-	462.2398	4.37	↓	-57	0.0315					
-	462.2985	13.96	↓	-55	0.0118					
-	463.2433	4.37	↓	-61	0.0248					
-	463.302	13.95	↓	-55	0.0129					
+	464.3128	13.96	↓	-58	0.0108					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	464.3138	14.60	↓	-55	0.0051					
+	465.3161	13.96	↓	-59	0.0096					
-	465.3172	14.61	↓	-56	0.0050					
-	466.2932	13.82	↓	-54	0.0034					
-	466.3196	14.61	↓	-58	0.0055					
+	466.3283	14.60	↓	-57	0.0077					
-	467.2965	13.82	↓	-54	0.0040					
-	467.323	14.61	↓	-56	0.0180					
+	467.3316	14.60	↓	-56	0.0083					
-	468.2988	13.83	↓	-57	0.0038					
+	468.3076	13.82	↓	-55	0.0032					
+	468.3343	14.62	↓	-60	0.0067					
+	468.344	13.46	↑	+67	0.0420					
+	469.0956	1.97	↓	-63	0.0004					
+	469.3111	13.84	↓	-59	0.0042					
-	470.2248	7.44	↓	-63	0.0069					
-	474.0724	6.93	↓	-62	0.0004					
-	478.293	13.65	↓	-56	0.0200					
-	479.2968	13.65	↓	-56	0.0192					
-	480.309	14.28	↓	-57	0.0034					
+	480.3439	13.31	↑	+63	0.0455					
-	481.3124	14.27	↓	-58	0.0038					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	482.3151	14.27	↓	-59	0.0032					
+	482.3234	14.27	↓	-57	0.0029					
+	483.3268	14.27	↓	-56	0.0028					
-	488.2909	13.02	↑	+137	0.0455					
-	488.3137	14.26	↓	-57	0.0201					
-	489.2942	13.02	↑	+183	0.0384					
-	490.0717	16.37	↓	-63	0.0253					
-	490.3298	14.80	↓	-53	0.0042					
-	491.3332	14.81	↓	-57	0.0024					
-	492.1962	4.37	↓	-69	0.0030					
-	492.3355	14.81	↓	-58	0.0057					
+	492.3441	14.81	↓	-53	0.0093					
-	492.345	15.56	↓	-55	0.0186					
+	493.3472	14.81	↓	-59	0.0038					
-	497.1016	1.70	↓	-56	0.0009					
-	504.2706	13.72	↓	-54	0.0068					
-	505.3408	12.57	↑	+121	0.0426					
+	512.3703	13.47	↑	+66	0.0401					
+	513.3735	13.47	↑	+70	0.0496					
-	516.3221	13.97	↑	+168	0.0408					
-	521.2694	13.42	↓	-56	0.0175					
-	532.3015	14.60	↓	-52	0.0020					

Chapitre 3 : Evaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule *Mytilus galloprovincialis* : étude de l'endo-métabolome, en relation avec la caractérisation de l'exposition

**Table S2** (continued)

Ionisation mode	Observed mass	Retention time (min)	Trend ↑ ↓	Difference amplitude %	p-value	Putative annotation				
						Annotation	Molecular ion species detected	Calculated mass	Mass difference (ppm)	Metabolic pathway
-	534.2802	13.83	↓	-56	0.0033					
-	540.366	14.48	↑	+282	0.0455					
-	542.3461	12.90	↑	+156	0.0337					
-	546.3333	13.47	↑	+207	0.0434					
-	547.2784	9.01	↓	-68	0.0001					
-	548.2765	14.61	↓	-56	0.0093					
-	548.2961	14.28	↓	-57	0.0022					
-	549.2997	14.28	↓	-58	0.0041					
+	551.3893	14.85	↓	-51	0.0099					
-	556.3611	13.47	↑	+164	0.0444					
-	557.3646	13.47	↑	+167	0.0453					
-	564.2397	14.61	↓	-56	0.0029					
-	579.349	13.95	↓	-58	0.0263					
-	594.273	14.60	↓	-58	0.0020					
-	698.3367	9.95	↓	-57	0.0037					

<sup>a</sup> Based on the work of Sumner et al. (2007).

Annotation level 2: putative annotation, based on the use of public databases.

### 3. Discussion & Conclusion

A travers l'approche métabolomique, cette étude a pu mettre en évidence les effets d'une exposition représentative d'une contamination environnementale, tel qu'un rejet de STEP, sur le métabolisme de l'organisme marin *M. galloprovincialis*, et plus particulièrement des individus mâles, malgré une variabilité inter-individuelle importante. Ces perturbations métaboliques concernent principalement le métabolisme des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques ainsi que du cycle de l'acide citrique. D'après la littérature, ces métabolites et voies métaboliques sont impliqués dans de nombreux processus biologiques qui, dans notre cas, pourraient être altérés, comme par exemple le métabolisme énergétique, la synthèse de l'ADN et des ARN, le système immunitaire, l'osmorégulation, la reproduction, ou encore la formation du byssus. La caractérisation de l'effluent de STEP a permis la détection de 38 PP et métabolites ainsi que 4 pesticides. En se basant sur la littérature, une relation de cause à effet hypothétique a pu être établie entre les contaminants détectés et les effets observés, appuyant l'interprétation de nos résultats.

Afin d'approfondir ces résultats et améliorer la compréhension des altérations métaboliques sur l'organisme suite à cette exposition, il serait pertinent de procéder à :

- une élucidation structurale plus poussée des signaux significativement impactés par l'exposition mais non-annotés (Tableau S2), par exemple à l'aide de données MS/MS combinées à des réseaux de similarités spectrales ;
- une étude des effets sur l'endo-métabolome d'autres organes que la glande digestive, tels que les branchies, le manteau et les gonades (si présentes) afin d'obtenir une vision globale des perturbations métaboliques sur l'organisme.

L'une des problématiques rencontrées dans cette étude, et en écotoxicologie d'une manière générale dès lors que l'on travaille sur un organisme sauvage, est la variabilité biologique inter-individuelle mesurée en réponse à l'exposition. Malgré la sélection d'individus d'une même espèce, de même sexe et de taille homogène, d'autres facteurs physiologiques peuvent influencer la réponse à l'exposition, comme par exemple l'âge ou le stade de maturité sexuelle (non mesurés dans notre cas). L'intégration de ces facteurs biologiques dans le design expérimental, complétée par une analyse statistique multifactorielle, permettrait d'expliquer davantage une telle variabilité biologique.

# Chapitre 4

---

Importance du design expérimental : prise en compte du facteur sexe en réponse à l'exposition au rejet de STEP – Application d'une analyse statistique multifactorielle sur les données métabolomiques

## 1. Introduction et présentation de l'article n°3

L'un des challenges en métabolomique environnementale est de mieux relier la variabilité observée à ses différentes origines, afin de correctement interpréter la réponse biologique au(x) stress étudié(s). En effet, cette variabilité n'est pas seulement la conséquence du facteur d'étude mais celle en majeure partie d'une multitude de facteurs intrinsèques à l'organisme et à son environnement. Dans des conditions environnementales, il peut être difficile d'établir une relation de cause à effet entre l'exposition à un ou plusieurs contaminants et la variabilité métabolique induite par celle-ci. Lorsqu'une expérimentation est conduite en laboratoire, il est plus facile de contrôler les facteurs environnementaux et ainsi de limiter leurs effets sur la réponse de l'organisme au(x) contaminant(s). Naturellement, ces conditions contrôlées n'empêchent pas les facteurs intrinsèques à l'organisme d'agir sur la réponse biologique, d'autant plus si les organismes sont sauvages (diversité biologique plus importante au sein d'une même population en comparaison à des organismes modèles). Ainsi, le sexe, l'âge, le stade de maturité sexuelle, le statut physiologique, les traits d'histoire de vie de l'individu, etc., sont autant de sources de variabilité capables de moduler la réponse à un contaminant. Par conséquent, intégrer ces facteurs au design expérimental permettrait d'identifier leur part de variabilité dans la variabilité globale observée. Afin d'optimiser le bénéfice d'un design expérimental bien structuré, il est essentiel que celui-ci réponde à la stratégie de traitement statistique envisagée.

La présente étude a ainsi pour objectif de comprendre le rôle de l'un de ces facteurs intrinsèques à l'organisme, le sexe, sur la variabilité des données métabolomiques en réponse à l'exposition au rejet de STEP réalisée précédemment. L'intégration du facteur sexe (mâle et femelle) dans le design expérimental, en plus du facteur exposition (exposé et contrôle), a nécessité un travail collaboratif avec Julien Boccard, biostatisticien à l'Institut des Sciences Pharmaceutiques à l'Université de Genève. L'approche statistique *Analyse of variance Multiblock Orthogonal Partial Least Square* (AMOPLS), développée par Boccard & Rudaz (2016), a ainsi été appliquée à notre jeu de données. L'approche AMOPLS, permettant la décomposition de la variabilité selon les deux facteurs *sexe* et *exposition* ainsi que de l'interaction *sexe* × *exposition*, est capable de quantifier la part de chaque facteur et de leur interaction sur la variabilité totale observée, mais également d'identifier les métabolites contribuant le plus à l'effet de ces facteurs sur la variabilité des données métabolomiques. Cette approche est donc pertinente pour comprendre le rôle du sexe dans la réponse à l'exposition car elle permet dans un premier temps de faire ressortir les métabolites modulés de la même façon chez les mâles et les femelles (i.e., réponse à l'exposition sexe-indépendante) et, dans un second temps, de mettre en évidence les métabolites dont la modulation est spécifique aux mâles ou aux femelles (i.e., réponse à l'exposition sexe-dépendante). L'AMOPLS étant appliquée pour la première fois dans

Chapitre 4 : Importance du design expérimental : prise en compte du facteur sexe en réponse à l'exposition au rejet de STEP – Application d'une analyse statistique multifactorielle sur les données métabolomiques

l'analyse de données de métabolomique environnementale, les nouvelles perspectives qu'offre cette approche dans le domaine de l'écotoxicologie ont été discutées dans cet article.

2. Article n°3

**Multifactorial analysis of environmental metabolomic data in ecotoxicology: wild marine mussel exposed to WWTP effluent as a case study**

Thibaut Dumas <sup>a,\*</sup>, Julien Boccard <sup>b,c</sup>, Elena Gomez <sup>a</sup>,  
Hélène Fenet <sup>a</sup>, Frédérique Courant <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hydrosiences Montpellier, University of Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France

<sup>b</sup> Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland

<sup>c</sup> School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, 1211 Geneva, Switzerland

□ Corresponding author at: HydroSciences Montpellier, IRD, CNRS, University of Montpellier, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier, France. E-mail address: thibaut.dumas@umontpellier.fr

Published in *Metabolites*, 29 June 2020, 10, pp. 269 (Impact Factor: 4.097)

Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo10070269>

Abstract

Environmental metabolomics is a powerful approach to investigate the response of organisms to contaminant exposure at a molecular scale. However, metabolomic responses to realistic environmental conditions can be hindered by factors intrinsic to the environment and the organism. Hence, a well-designed experimental exposure associated with adequate statistical analysis could be helpful to better characterize and relate the observed variability to its different origins. In the current study, we applied a multifactorial experiment combined to Analysis of variance Multiblock Orthogonal Partial Least Squares (AMOPLS), to assess the metabolic response of wild marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to a wastewater treatment plant effluent, considering gender as an experimental factor. First, the total observed variability was decomposed to highlight the contribution of each effect related to the experimental factors. Both the exposure and the interaction gender × exposure had a statistically significant impact on the observed metabolic alteration. Then, these metabolic patterns were further characterized by analyzing the individual variable contributions to each effect. A main change in glycerophospholipid levels was highlighted in both males and females as a common response, possibly caused by oxidative stress, which could lead to reproductive disorders, whereas metabolic alterations in some polar lipids and kynurenine pathway were rather gender-specific. This may indicate a disturbance in the energy metabolism and immune system only in males. Finally, AMOPLS is a useful tool facilitating the interpretation of complex metabolomic data and is expected to have a broad application in the field of ecotoxicology.

## 2.1. Introduction

Coastal areas around the world are subjected to multiple pressures, including an increase of submarine sewage outfalls. Conventional wastewater treatment plants (WWTPs) continuously release a wide diversity of contaminants in aquatic environments (Fent et al., 2006; Kolpin et al., 2002; Loos et al., 2013). Even at low environmental concentrations (ng–µg/L), those contaminants pose a threat to marine organisms, especially sessile ones (Arpin-Pont et al., 2016; Dodder et al., 2014; Mezzelani et al., 2018; Picot Groz et al., 2014; Sánchez-Avila et al., 2012). As little is known about how WWTP effluents affect those organisms, investigation at a molecular level could be useful to predict the effect at a higher level of biological organization. Approaches helping to characterize the response of marine organisms to such multi-contamination without preconception are key for understanding the impact of WWTP effluents on coastal areas.

Omics approaches now make it possible to obtain considerably more complete and specific information on the biochemical response of organisms to a stress. More recently, environmental metabolomics has been commonly and efficiently applied to investigate more deeply mechanisms and modes of action of single contaminants or mixtures (Lankadurai et al., 2013; Lin et al., 2006; Miller, 2007). This approach is based on the identification of low molecular weight metabolites (50–1500 Da) whose production and levels vary with the physiological, developmental, or pathological state of cells, tissues, organs, or whole organisms (Courant et al., 2014; Lin et al., 2006). It must be noted that mass spectrometry-based metabolomics is a holistic approach and provides a huge amount of data that reflects also metabolic changes related to factors intrinsic to the environment (i.e., temperature, pH, predation, food availability, etc.) and the organism (i.e., gender, age, size, genetic, etc.). Hence, it can be difficult to unravel the response of wild organisms to contaminant exposure that can be mixed with variations generated from those factors (Adams, 2003). In this way, integrating multiple factors to an adapted experimental design could be an efficient methodology to better understand the role of those factors in the response of wild organisms to contaminants by being closer to the reality of complex phenomena.

Gender has long been considered to be a confounding factor in response to environmental stressors and, as such, was often excluded from experimental design because of the time, cost, and difficulty of its determination (Burger, 2007; Liang et al., 2018). However, gender can be a factor of primary importance since it plays a role in the genetics, physiology, morphology, and behavior of organisms and thus influences the uptake, fate, and toxicity of contaminants in organisms (Burger, 2007). In recent decades, the awareness of gender as an experimental factor has increased with the emphasis on endocrine active chemicals, underscoring biochemical and physiological differences

between the sexes (McClellan-Green et al., 2007). Currently, omics approaches fully contribute to highlighting the gender-specific response to contaminant exposure (Liang et al., 2018; Rietjens et al., 2018), including in invertebrates. Indeed, Ji et al. (2013) observed a gender-specific metabolic response of mussel *Mytilus galloprovincialis* to the flame retardant BDE 47. Impacted metabolites in male mussels (e.g., threonine, glutamate, lysine, and histidine) suggest a change in energy metabolism, while a disturbance of both osmoregulation and energy metabolism is rather demonstrated in females (modulation of the osmolytes betaine and hypotaurine, ATP elevation). Other studies in environmental metabolomics also demonstrated the gender-specific response of mussels exposed to the pesticide triazophos (Zhang et al., 2017), the flame retardant tetrabromobisphenol A (Ji et al., 2016), bisphenol A (Ji et al., 2014), and the pharmaceutical active compound fadrozole hydrochloride (Leonard et al., 2014), or challenged by pathogens (Liu et al., 2014; Nguyen et al., 2018). However, those studies did not fully take advantage of the multifactorial experimental structure of the data to characterize both exposure effects and gender-specific responses and to relate the observed variability (metabolic changes) to the main factors or their interaction in a multivariate context.

One of the challenges in environmental metabolomics is to better characterize and relate the observed variability to its different origins in order to correctly interpret biological responses to environmental stressors (Simmons et al., 2015). This could be overcome thanks to well-designed experimental exposure associated with dedicated statistical analysis, as discussed in Simmons et al. (2015). However, when multiple influences come into play, it becomes challenging to relate metabolic alterations to specific factors. In that context, systematic strategies taking advantage of experimental design become crucial to plan the experiments and analyze the data generated in an adequate manner. Design of experiments aims to rationally structure the different levels (e.g., male/female or control/exposed) taken by the experimental factors (e.g., gender or exposure) to efficiently distinguish the different effects leading to specific variations in the measured data but occurring simultaneously. Dedicated statistical data analysis approaches are then required to account explicitly for the experimental setup and assess the respective effects and potential interactions between experimental factors. Analysis of variance (ANOVA) offers a classical statistical framework to separate the different sources of variability. However, its application becomes limited when a large number of signals are measured to characterize observations, as is the case in metabolomics. It should be noted that metabolomic data can be investigated using both univariate and multivariate techniques. While the former are based on standard one-variable-at-a-time analysis, they remain a classical solution to estimate the statistical merit of a given metabolite. Because the latter allow global metabolic patterns to be considered in the model, they have the capacity to uncover relationships between subsets of metabolites carrying common information, which could be overlooked otherwise. They are therefore

especially well-suited to the analysis of untargeted metabolomic datasets. In this context, the combination of multivariate methods and experimental design theory has led to the development of new methods. Among the various solutions developed to address this problem, the combination of ANOVA decomposition and projection methods such as principal component analysis (PCA), simultaneous component analysis (SCA), or partial least squares (PLS) regression has been shown to be a relevant approach (Boccard and Rudaz, 2014). These tools allow the different trends associated with each effect to be efficiently summarized using a limited number of mutually orthogonal latent variables (or components). Recently, a method integrating ANOVA-based submatrices associated with each effect/interaction into a single multiblock orthogonal PLS model (ANOVA multiblock OPLS (AMOPLS) Boccard and Rudaz, 2016) has been shown to be very effective in distinguishing multiple metabolic alterations and facilitating interpretation. In the same way as standard factorial models, interpretation can be done on the basis of score and loading plots to assess the distribution of observations and the contributions of the variables, respectively. As all experimental effects are integrated into a single multiblock model, this technique provides an objective evaluation of multiple factors potentially influencing metabolites in a concurrent manner. The computation of distinct variable importance in the projection (VIP) values related separately to each effect provides a relevant strategy to decompose the contribution of the variables to the model. Finally, the statistical significance of each effect can be empirically estimated using permutation tests.

In a previous study (Dumas et al. 2020), we demonstrated the deleterious metabolic effects of a WWTP effluent extract in digestive glands of male *Mytilus galloprovincialis* mussels. Here, we propose to apply the AMOPLS method for the first time in environmental metabolomics in order to (i) bring out metabolites modulated in the same way in male and female mussels (i.e., gender-independent response caused by the WWTP effluent exposure), and (ii) gain insight into how gender influences responses to exposure (qualitatively and quantitatively). The experimental design was conducted in controlled laboratory conditions to simplify environmental exposure, limiting as much as possible the variation generated by confounding factors, and to better characterize the response of marine mussels to WWTP effluents. Finally, we further discuss the new perspectives offered by AMOPLS for the analysis of environmental metabolomics in the field of ecotoxicology.

## 2.2. Materials & Methods

### 2.2.1. Chemicals

Pesticide analytical-grade solvents (methanol, dichloromethane, and ethanol) and LC/MS grade solvents (water, acetonitrile, formic acid 99%) were obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Ultrapure water was generated by a Simplicity UV system from Millipore (Bedford, MA, USA)

with a specific resistance of 18.2 M $\Omega$ .cm at 25 °C. Analytically pure standards used for identification at level one (Sumner et al., 2007) were purchased from the following suppliers: Sigma-Aldrich (now part of Merck), Santa Cruz Biotechnology, Toronto Research Chemicals, and LGC Standards.

#### 2.2.2. *WWTP effluent extract preparation*

The WWTP effluent preparation was followed by a Solid Phase Extraction (SPE), previously detailed by Dumas et al. (2020). Briefly, effluent (15 L) was first filtered through GF/C filters (1.2  $\mu$ m). The conditioning of cartridges (Oasis HLB 500 mg, 6 cc) was carried out first with 5 mL of methanol and then 5 mL of distilled water. Afterwards, the WWTP effluent sample (500 mL) was passed through 30 cartridges under vacuum. After washing with 5 mL of Milli Q water, the cartridges were dried. Then, elution of the cartridges was carried out with 2  $\times$  5 mL of methanol. Finally, the eluate of all cartridges was evaporated in order to obtain 3 mL of concentrated extract.

The solution used to spike glass aquaria during the exposure period was prepared extemporaneously every day. In a glass tube, 20  $\mu$ L of concentrated extract was added to 80  $\mu$ L of methanol. A final WWTP effluent extract dilution of 5 % was reached in the aquarium by spiking the seawater (2 L) with 100  $\mu$ L of the solution.

#### 2.2.3. *Animals and experimental design*

The detailed experimental design was described by Dumas et al. (2020). Briefly, 50 *Mytilus galloprovincialis* mussels (5.3–7.5 cm shell length), purchased from a Mediterranean Sea mussel culture (Bouziques, France), were distributed into different glass aquaria (2 L filtered seawater) with 5 individuals *per* aquarium and 5 aquaria *per* treatment (25 individuals *per* treatment). Seawater was kept under continuous aeration and renewed daily (static renewal), and physicochemical parameters (temperature, pH, salinity, and oxygen concentration) were checked throughout the experiment. Following a 7-day acclimatization period, mussels underwent two different treatments: either exposure to the solvent control (SC, 100  $\mu$ L absolute methanol) or exposure to the WWTP solution (cf. Section 2.2.2). After the 7-day exposure period (no dead mussels), individuals were dissected for digestive gland collection (frozen at -80 °C) and sex microscopy determination. This work was conducted on 19 males (SC exposure n = 9 and WWTP effluent exposure n = 10) and 20 females (SC exposure n = 10 and WWTP effluent exposure n = 10).

#### 2.2.4. *Tissue sample preparation*

The solvent system of methanol/dichloromethane/water (16/16/13; v/v/v) was used to extract metabolites from digestive glands of male and female mussels, as presented in previous works (Bonfille et al., 2018; Dumas et al., 2020). Briefly, the tissues (30 mg dry weight  $\pm$  0.25 mg) were

homogenized and extracted in a first step with 240  $\mu\text{L}$  of methanol and 75  $\mu\text{L}$  of water and vortexed for 60 s. In a second step, tissues were then extracted with 240  $\mu\text{L}$  of dichloromethane and 120  $\mu\text{L}$  of water and vortexed for 60 s. Following a 15 min rest at 4 °C, the samples were vortexed again and then centrifuged for 15 min at 2000 $\times g$  and 4 °C. The methanol/water phase (50  $\mu\text{L}$ ) was transferred to a glass tube and dried under a nitrogen stream. The extracts were re-suspended in 200  $\mu\text{L}$  of acetonitrile/water (5/95; v/v). Afterwards, the extracts were filtered using a 0.20  $\mu\text{m}$  PTFE syringe filter (Minisart SRP 4, Sartorius, Stonehouse, England) into vials prior to liquid chromatography—high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analysis.

#### 2.2.5. *Metabolic fingerprint LC-HRMS analysis*

The metabolic fingerprints were generated on an Exactive Orbitrap HRMS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) coupled to an LC system (Accela 600 pump, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). A reversed phase pentafluorophenylpropyl (PFPP) analytical column (100  $\times$  2.1 mm; 3  $\mu\text{m}$  particle size; Sigma Aldrich, PA, Bellefonte, USA) was used for the LC separation method. The injection volume of samples was 5  $\mu\text{L}$  using full loop injection. The mobile phase was constituted of the two separate solvents water/acetonitrile both modified with 0.1 % formic acid. The elution gradient (water/acetonitrile) was as follows: 95/5 from 0 to 3 min, 60/40 at 8 min, 50/50 at 9 min, 30/70 at 13 min, 5/95 from 15 to 18 min, and a re-equilibration period from 21 to 31 min at 95/5. The elution flow rate was fixed at 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

The HRMS was equipped with a heated electrospray ionization probe (HESI) source. Both ionization modes positive (ESI+) and negative (ESI-) were applied with the following parameters (ESI+/ESI-): spray voltage was set at |3.5|/|3.40| kV, capillary voltage at 45/-50 V, tube lens voltage at 90/-120 V, and skimmer voltage at 26/-25 V. The capillary and heater temperature was set at 250 °C. HRMS acquisitions were done in a full scan mode with a mass spectrum range of  $m/z$  50–1000 at a mass resolution of 50,000 (FWHM,  $m/z$  200).

In order to assess the analytical repeatability and sensitivity of acquisitions, a quality control (QC) sample was injected at regular intervals throughout the sequence. The QC sample was prepared by pooling 10  $\mu\text{L}$  of each injected sample extract.

It has to be noted that a randomization procedure was set up during several experimental steps to avoid any bias and to reduce the influence of potential confounding factors. This includes the randomization of (i) mussel distribution in different glass aquaria before exposure, (ii) dissection, (iii) extraction, and (iv) LC–HRMS analysis.

### 2.2.6. *Data processing and statistical analysis*

#### 2.2.6.1. Data processing

Different steps for data processing were already presented by Dumas et al. (2020). Briefly, the raw data were converted into mzXML files with MSConvert freeware (ProteoWizard 3.0, Chambers et al., 2012). A multi-step strategy was applied for processing ESI+ and ESI- acquisitions separately using the XCMS package (Smith et al., 2006) in the R environment. XCMS returned results as a peak table containing variable identity (i.e., m/z and retention time) and feature abundances (i.e., peak area). After visual inspection of each extracted ion chromatogram, all features corresponding to baseline drift or background noise were discarded from the peak table. In addition, the Bioconductor package CAMERA (Kuhl et al., 2012) was used to remove isotopes, adducts, and fragments from the peak table, thus avoiding information redundancy. The analytical repeatability was assessed by calculating the relative standard deviation (RSD) for each features detected in QC samples. A controlled analytical variability was set such that 70 % of features would have an RSD < 30 % (Want et al., 2013). Features with an RSD > 30 % were excluded for statistical analysis.

#### 2.2.6.2. Analysis of variance Multiblock Orthogonal Partial Least Squares (AMOPLS)

The fusion of the data obtained from both ionization modes, i.e., ESI+ and ESI-, was carried out by concatenation after autoscaling and a normalization step based on the Frobenius norm of each dataset. AMOPLS was computed under the MATLAB® 8 environment (The MathWorks, Natick, MA, USA). To avoid detrimental effects on interpretation due to unbalanced groups, a stratified subsampling strategy without replacement was carried out. Differences between glass aquaria were considered negligible, while the combination of gender and exposure experimental factors was used for the random selection of 9 mussels in each experimental group (i.e., the smallest size of exchangeable units). By these means, a population of  $10^3$  balanced AMOPLS models was generated and parameters, including sum-of-squares, scores, and loadings, were then investigated to offer robust ensemble-based estimates. Additional details about this procedure can be found in Boccard et al. (2019).

#### 2.2.6.3. Multivariate metabolite selection and univariate statistical evaluation

Squared variable importance in the projection (VIP<sup>2</sup>) values were then calculated for both ESI+ and ESI- modes. VIP<sup>2</sup> values are considered to be the quantitative measure of the contribution of all modelled effects coming from a single variable (Gonzalez-Ruiz et al., 2017). By using the effect-specific VIP<sup>2</sup>, the total contributions to the model can easily be split into contributions through the different

experimental factors, allowing the importance of each metabolite in separate significant effects to be evaluated (i.e., exposure, gender, and their interaction) (Gonzalez-Ruiz et al., 2017).

Then, the 50 highest ranked metabolites according to their effect-specific VIP<sup>2</sup> related to each factors were selected for annotation. Two-way ANOVA tests in conjunction with Tukey's multiple comparison test were then performed on metabolite relative abundances with high effect-specific VIP<sup>2</sup> in order to establish significant modulation. The false discovery rate was controlled using the Benjamini–Hochberg FDR correction (Benjamini and Hochberg, 1995). Metabolites with a significant modulation higher than 30 % (q-value < 0.05) were considered biologically relevant.

#### 2.2.7. *Metabolite annotation and identification*

The annotation step was performed using the public databases Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>) and LipidMaps (<https://lipidmaps.org/>). A mass precision was fixed at 0.001 Da. In line with the work of Sumner et al. (2007), the levels of confidence for the annotation were defined as follows: (i) level 1 was characterized by unambiguous identification based on the accurate mass and retention time of the corresponding analytical standard injected under the same analytical conditions, and (ii) level 2 corresponded to putative annotation based upon physicochemical properties and/or spectral similarity with public databases.

## 2.3. Results & Discussion

### 2.3.1. General overview of the dataset

LC-HRMS analysis of digestive glands collected from mussels exposed either to solvent control (SC,  $n = 9$  males and  $n = 10$  females) or WWTP effluent extract ( $n = 10$  males and  $n = 10$  females) was carried out in both ESI+ and ESI- modes. Metabolic fingerprints composed of 3338 features detected in ESI- and 1460 features in ESI+ were obtained after cleaning the datasets, as described in Section 2.2.6.1. Analytical repeatability was acceptable as the percentages of features with as RSD < 30 % in ESI- and ESI+ were 68 % and 65 %, respectively.

### 2.3.2. Contribution of experimental factors to the total variability

The experimental design involved two factors, namely *Exposure* (two levels: SC or WWTP exposure) and *Gender* (two levels: male or female). The main effects contributions to the total observed variability of the *Gender* factor, *Exposure* factor, as well as their interaction *Gender* × *Exposure*, were evaluated using the AMOPLS approach (Table 4.1).

The *Gender* main effect (differences between male and female on average) contributed only to a small fraction of the total variability (3.6 %). This contribution was deemed statistically non-significant based on permutation tests ( $p > 0.05$ ), leading to the hypothesis that differences between males and females on average (i.e., independently of *Exposure* factor) could be considered negligible. On the other hand, the *Exposure* main effect (WWTP vs. SC) accounted for 7.5 % of the total variability and was found to be highly significant ( $p < 0.01$ ), demonstrating that WWTP effluent extract had an impact on the metabolism of mussels whatever the gender.

The *Gender* × *Exposure* interaction, related to the gender-specific response to WWTP effluent extract, explained 3.9 % of the total variation and was also found to be significant ( $p < 0.05$ ). Although differences between genders (on average) did not cause a significant impact on metabolomic patterns, this result suggests that mussels may respond differently to the exposure according to gender.

The residuals constituted the remaining 85.0 % of the total observed variability that could not be related to the experimental factors. This unexplained part therefore accounts for most of the variation observed in the dataset, showing that other sources influenced the variability of the metabolomic profiles, whether analytical or biological. Although individuals were collected at the same location of the mussel culture, they were still wild organisms with potentially different life history traits and/or a different physiological status, thus leading to important variations in their metabolism and response to WWTP effluent extract exposure.

An AMOPLS model with three predictive (tp) and one orthogonal (to) components was found optimal using permutation tests ( $R^2 = 0.92$ ,  $p < 0.01$ ). Model interpretation was then based on the predictive components associated with *Exposure* (tp1), *Gender × Exposure* (tp2), and *Gender* (tp3), as illustrated by the block contributions summarized in Table 4.1. The orthogonal component related to the unexplained part of variability, i.e., residuals, was not further investigated.  $VIP^2$  values were computed for all variables to rank ion features according to their importance for each specific predictive component. By these means, subsets of metabolite candidates potentially associated with each effect could be highlighted.

**Table 4.1:** Relative variability and block contributions of the AMOPLS analysis of metabolomic data acquired from digestive glands of male and female mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to WWTP effluent extract.

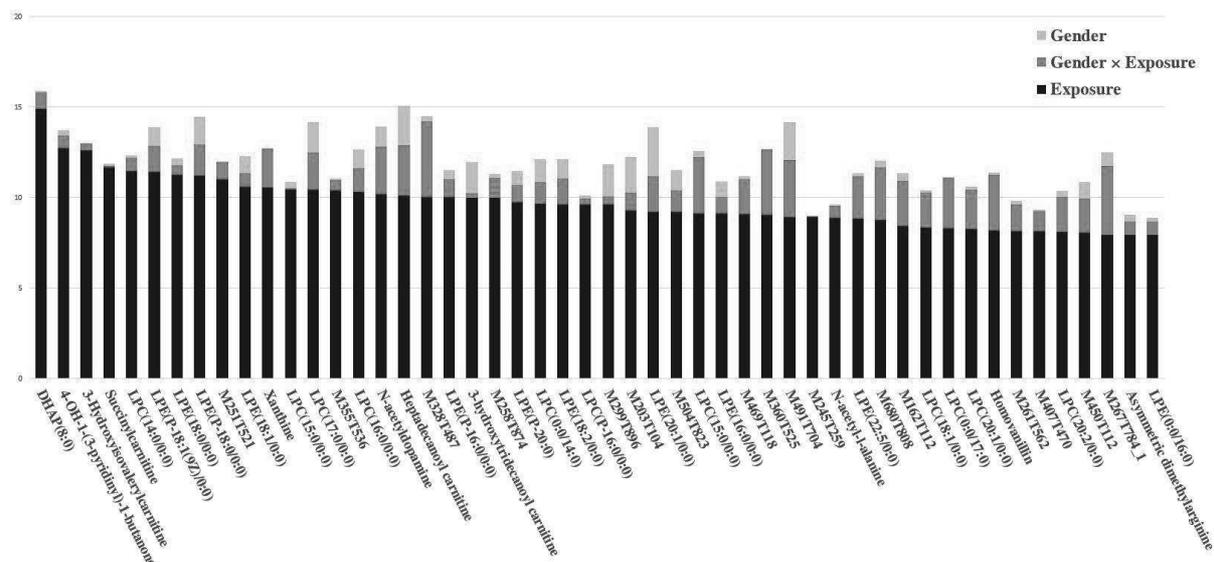
Factor	RSS	p-value	Block Contributions			
			tp1	tp2	tp3	to
<i>Gender</i>	3.6%	>0.05	3.6%	7.3%	<b>84.1%</b>	25.5%
<i>Exposure</i>	7.5%	<0.01	<b>89.2%</b>	6.1%	4.9%	23.2%
<i>Gender × Exposure</i>	3.9%	<0.05	3.5%	<b>78.7%</b>	5.4%	25.1%
<i>Residuals</i>	85.0%	N/A	3.7%	6.9%	5.5%	<b>26.2%</b>

RSS: Relative sum of squares, tp1-3: predictive components, to: orthogonal component. The highest contribution for each component is reported in bold.

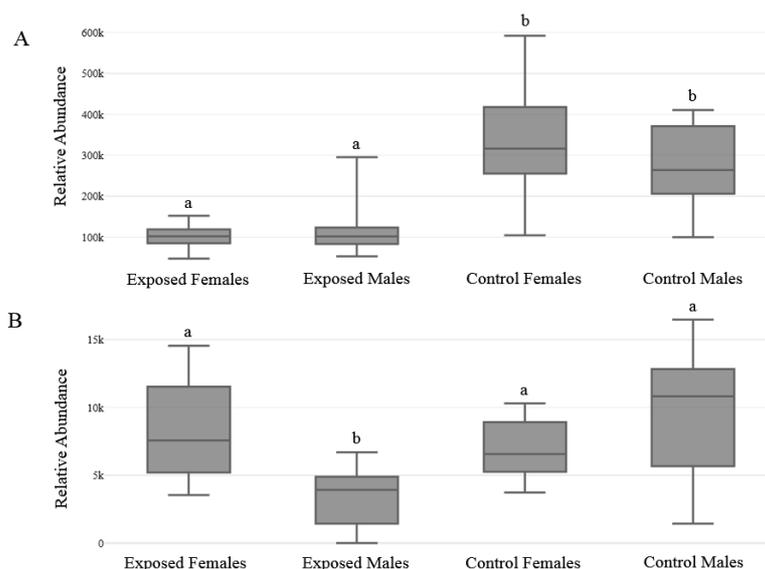
### 2.3.3. Impact of exposure

The top 50 values of effect-specific  $VIP^2$  related to *Exposure* were selected to find the most relevant metabolites contributing to differences between WWTP and solvent control (SC) exposed groups (Figure 4.1). Then, relative abundances of these metabolites were compared across the different samples, to determine whether they were down or up-modulated in response to WWTP exposure (Supplementary Data Table S1). Most of them followed the same pattern and were significantly down-modulated in both male and female exposed organisms, as illustrated with the boxplot of lysophosphocholine (14:0/0:0) (Figure 4.2A). Interestingly, the similar modulations observed in the two genders validates the relevance of results provided by tp1 for exposure. Indeed, tp1 aims to highlight metabolites whose modulation is explained by the *Exposure* factor, independently of others factors such as gender.

Chapitre 4 : Importance du design expérimental : prise en compte du facteur sexe en réponse à l'exposition au rejet de STEP – Application d'une analyse statistique multifactorielle sur les données métabolomiques



**Figure 4.1:** Effect-specific variable importance in the projection ( $VIP^2$ ) values for the 50 highest ranked metabolites according to the impact of the Exposure factor.



**Figure 4.2:** Boxplots illustrating an exposure-specific modulation of LPC (14:0/0:0) in both male and female mussels (A) and a gender-specific modulation of 1-pentadecanoyl-glycero-3-phosphate only in males (B). Different letters (a and b) mean significant difference ( $q$ -value < 0.05) between relative abundances.

As reported in Table S1 in the Supplementary Data, most of the metabolites were annotated at level 2 ( $n = 31$ ), while others remained still unknown (level 4;  $n = 17$ ) or have been confirmed (level 1;  $n = 2$ ). This raised the difficulty of identifying these metabolites and the lack of available information concerning the metabolism of bivalve mollusks. However, a great majority seemed to be part of polar lipid metabolism, belonging to the class of glycerophospholipids such as lysophosphatidylcholines (LPCs) and lysophosphatidylethanolamines (LPEs), and also acyl carnitines and aryl alkyl ketones compounds. Some of those LPCs (e.g., 14:0/0:0; 15:0/0:0; 17:0/0:0; 18:1/0:0; 20:1/0:0) and LPEs (e.g.,

P-16:0/0:0; P-18:1(9Z)/0:0; P-18:0/0:0; 18:0/0:0) have already been identified in *M. galloprovincialis*, which reinforces these annotation hypotheses (Donato et al., 2018; Facchini et al., 2016).

Changes in polar lipids underlined by the AMOPLS model may indicate a crucial role of lipids in response to WWTP effluent exposure in both male and female mussels. In bivalves, lipids exert several roles. They are important structural components of biological membranes, energy reserves, precursors of secondary messengers and transcription factors, act in reproduction and sexual maturation, and are active in immunological response and environmental adaptation (Laudicella et al., 2019). More specifically, glycerophospholipids such as glycerophosphocholines (PCs) and glycerophosphoethanolamines (PEs), are the main lipid components of biological membranes and ensure the required fluidity of the lipid bilayer for the normal functioning of membrane bound proteins, ion channels, and receptors (Fokina et al., 2014). In our study, most of the impacted metabolites belong to the class of glycerophospholipids. LPC and LPE, derived from PC and PE respectively, correspond to the loss of an acyl chain, resulting in the release of fatty acid from the sn-2 or sn-1 position, caused respectively by the phospholipase A2 (PLA2) or A1 activity (Makide et al., 2009). Hence, this gain in polarity made possible the observation of LPC and LPE, consistence with our extraction and analysis method, while PC and PE may also be disturbed but are less polar and cannot be observed in this study. However, little is known about the role of LPC and LPE in mussels. Partly present in biological membranes, they may increase membrane polarity, leading to a decrease in membrane fluidity and permeability, or be involved in reactions with amino compounds and DNA bases, interfering with the functional integrity of the cell membranes (Sergent et al., 1999).

Although several sources may vary the lipid content and composition in mussels (i.e., food availability, temperature, salinity, animal life cycle, sex, and spawning), changes in lipid metabolism are also known to be a biochemical response to pollutant exposure in *Mytilus* spp. (Albergamo et al., 2016; Cappello et al., 2017; Fokina et al., 2013; Peteiro et al., 2007; Signa et al., 2015). Recently, Cappello et al. (2017) observed a depletion of glycerophospholipids in *M. galloprovincialis* after a 7-day exposure to the pharmaceutical active compound drospirenone (10 µg/L). This may be suggestive of oxidative stress, since PCs are one of the degraded components of biological membranes during lipid peroxidation. Oxidative stress induced by this WWTP effluent exposure can also be supported with an increase of oxidized glutathione in males (trend, q-value = 0.095) and also in females (significant, q-value = 0.024) (results not shown), that may explain in this study the alteration of glycerophospholipids. Furthermore, LPCs are recognized to activate multiple signaling pathways, through the G protein-coupled receptor, involved in oxidative stress and inflammatory responses (Law et al., 2019). As mentioned above, hydrolysis of PC by PLA2 produces LPC and free fatty acid. The latter is frequently arachidonic acid, the precursor of the eicosanoid family of potent inflammatory

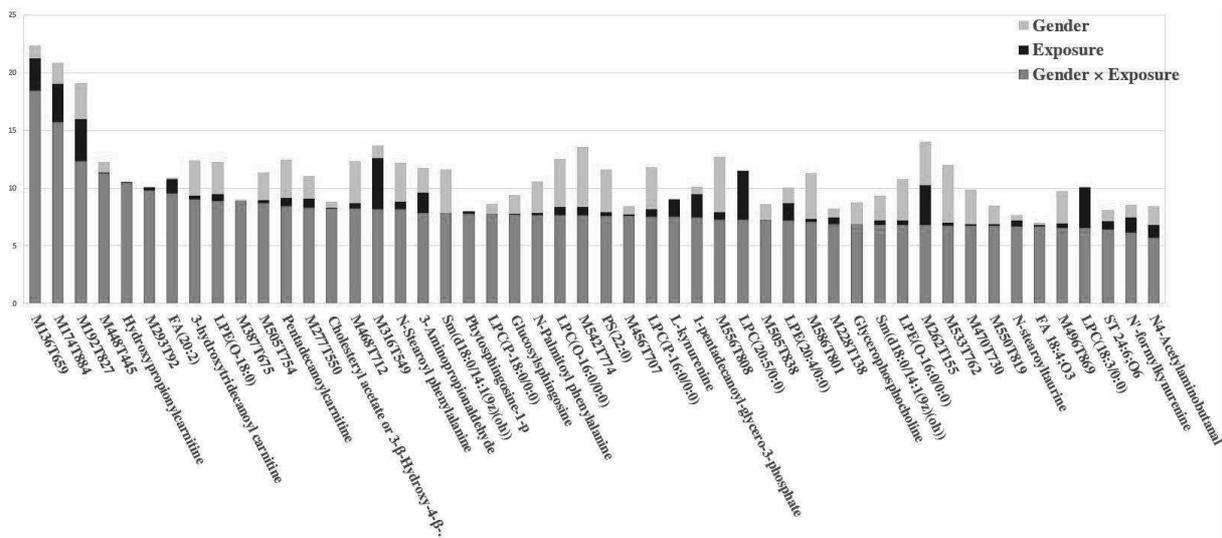
mediators including prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes (Balsinde et al., 2002). Worthy of note, eicosanoids are thought to play a role in the reproductive physiology of bivalve mollusks during both gametogenesis and spawning (Deridovich and Reunova, 1993), which corroborates a potential ecotoxicity on these organisms.

According to the crucial role of lipids in response to WWTP effluent exposure in both male and female mussels, a lipidomics study would be suitable for a better understanding on the impact of lipid metabolism and consequences on the organisms, since they are involved in essential functions.

In this study, the first aim was to bring out a common response caused by WWTP effluent exposure in wild marine mussels collected directly from the environment, which were homogenous in appearance (i.e., same species and same shell size) but finally physiologically heterogeneous (i.e., difference of gender and probably other parameters not measured, such as stage of sexual maturation, age, etc.). Despite an important biological variability, the AMOPLS method allowed the proportionally small part of meaningful information to be efficiently extracted. In this way, a common response to exposure was highlighted in mussels, independently of gender or other physiological differences. Hence, the predictive component related to *Exposure* could be helpful in the case of biomarker discovery, as it can serve as a basis to highlight the metabolites that respond the most to exposure and not to confounding factors that can bias the interpretation of the observed variation.

#### 2.3.4. *Impact of the interaction exposure × gender*

The AMOPLS model also revealed a significant effect of the interaction between the two factors *Exposure* and *Gender*. To facilitate interpretation, effect-specific VIP<sup>2</sup> computed for tp2 allowed us to highlight the most important metabolites influenced by the gender-specific response to WWTP effluent exposure (Figure 4.3). Interestingly, this variable subset included metabolites modulated in an opposite way between male and female mussels or only in one sex (Supplementary Data Table S1). An example of a gender-specific response is illustrated in Figure 4.2B. However, the pairwise multiple comparison of those modulations indicated only slightly significant differences when exposed males or females were compared to their respective controls. Nevertheless, other statistical comparisons given in Supplementary Data Table S2 showed significant differences between exposed males and females, while no differences were observed between controls. Hence, the gender-specific response could be observed in different ways, depending of the group comparisons and the direction of modulation.



**Figure 4.3:** Effect-specific variable importance in the projection (VIP<sup>2</sup>) values for the 50 highest ranked metabolites according to the impact of the interaction Gender × Exposure.

As in the case of the *Exposure* effect, a majority of gender-specific impacted metabolites were annotated (level 2) as polar lipids belonging to the class of glycerophospholipids (i.e., LPC, LPE, and phosphatidylserines), sphingolipids and glycosphingolipids, sterol lipids, acyl carnitines, fatty amides, and also fatty acyls compounds. A general trend showed an up-modulation of those compounds in male mussels, while a down-modulation was rather observed in females. Although the glycerophospholipids class was impacted in both male and female mussels, the modulation of some LPCs and LPEs seemed to be gender-specific. Due to the lack of information about many of these metabolites in mussels, the interpretation of the gender-specific response remained quite limited. However, differences in phospholipid and triacylglycerid content between male and female *M. galloprovincialis* mussels have already been related to the gametogenic cycle (Martínez-Pita et al., 2012). They play important roles in the reproductive process. In females, triacylglycerides are very important energy reserves in the oocytes, assuring the viability of larvae, while male spermatozoa do not accumulate triacylglycerid reserves, but lipids mainly incorporate into membranes as phospholipids. These differences of lipid contents and use indicate intrinsic biological differences between male and female mussels. This could therefore explain partially the gender-specific responses of *M. galloprovincialis* to WWTP effluent exposure.

A down-modulation of L-kynurenine and N'-formylkynurenine involved in the gender-specific response to WWTP effluent exposure could also be highlighted based on the AMOPLS model. Interestingly, thanks to the experimentation setup implemented in this study, this alteration of the kynurenine pathway was shown to be specific to male mussels. In humans, the kynurenine pathway has received increasing attention because of its connection to the immune system and the *de novo* synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), which plays a critical role in many enzymatic

redox reactions and in mitochondrial energy production (Castro-Portuguez and Sutphin, 2020). A potential toxicity of the WWTP effluent on the immune system and energy metabolism on male mussels was also demonstrated in our previous study (Dumas et al., 2020). However, further studies are needed to confirm the role of the kynurenine pathway in marine mussels.

The second aim of this study was to determine quantitatively and qualitatively how gender influences the response of marine mussels to WWTP effluent exposure. Despite the fact that metabolic alterations associated with this effect represented less than 4 % of the total variability, the AMOPLS method revealed a significant impact of the interaction *Gender* × *Exposure*, and highlighted specific metabolites modulated either in males or in females, or both, but in opposite ways. Because of its limited magnitude, it is important to validate the relevance of these results biologically by linking the highlighted metabolites to physiological processes that may differ between male and female mussels. However, further studies are required to confirm the structural annotation of these metabolites (Supplementary Data Table S1) and examine their role in mussel response to contaminants.

#### 2.3.5. *Perspective of environmental metabolomics in ecotoxicology based on multifactorial experiments*

The complexity and heterogeneity of biological and environmental systems can influence the uptake, fate, and toxicity of contaminants in organisms. Hence, understanding these phenomena has become one of the main challenges in ecotoxicology. In the same way, this complexity has an amplified impact on environmental metabolomics, since the sensitivity of this approach, when performed with mass spectrometry, allows very subtle metabolic changes that are not always related to the studied factors to be monitored. To overcome this issue, dedicated chemometric tools accounting explicitly for the experimental factors, such as AMOPLS, can relate the observed variation to their main effects and interactions in a single model, and then facilitate the interpretation of the complex dataset obtained from multifactor experimental design. In this way, the AMOPLS method, taking advantage of experimental design, is expected to have a broad application in the field of ecotoxicology.

In this study, we demonstrated the ability of AMOPLS to bring out relevant information related to WWTP exposure despite the large part of unexplained variability, resulting probably from the biological diversity of wild marine mussels. As a consequence, AMOPLS could be a suitable screening step in biomarker discovery for environmental monitoring, as it can select specific metabolites related to exposure from a complex dataset. In another way, it could also be possible to reduce the unexplained variability (i.e., residuals) by accounting for additional physiological factors in the analysis (e.g., age, stage of sexual maturity, etc.). In addition, this method, combined with environmental

metabolomics, could provide new insights into the influence of physiological parameters of organisms in response to contaminants.

It has to be noted that AMOPLS can be applied to any fixed-effects multifactorial experimental design. For instance, both dose and time factors are very important in ecotoxicology as they define contaminant toxicity. González-Ruiz et al. (2017) already asserted the efficiency of the method for such a structure of experimental design in human toxicology. They demonstrated a dose effect (0, 0.5, and 1  $\mu\text{M}$ ) and a time effect (24 h and 10 days) of trimethyltin on neural cells, thanks to a simplified interpretation of metabolite variations. Another application of AMOPLS could be the use of experimental design integrating environmental factors (e.g., changes in temperature, salinity, pH, etc.), that can influence the uptake, fate, and toxicity of contaminants in organisms. These kinds of experimental designs are largely widespread in the field of ecotoxicology in the context of climate change. Moreover, multifactorial experiments involving different biological layers, i.e., multi-omics approaches, constitute a very promising area of research to offer a more integrative view of the impact of contaminant exposure on sentinel species.

By gradually integrating the complexity and heterogeneity of organisms and environments into the experimental design, the shift of environmental metabolomics studies from laboratory to the field would be more feasible. However, some limitations may be encountered. The addition of supplementary factors to the experimental design requires balanced groups with a sufficient number of individuals to be maintained; although the analysis of unbalanced designs is possible, more sophisticated approaches to variance decomposition are needed in that case (Boccard and Rudaz, 2016).

It must be kept in mind that the proposed applications in ecotoxicology are not exhaustive and not limited to this field of research. Because it can be applied to all kinds of data generated from an experimental design, such methods are expected to have a broad field of application.

## 2.4. Conclusion

Multifactor data analysis was demonstrated as a relevant method to characterize and relate the observed variability from structured metabolomic data to the studied factors. It provides an efficient quantification of the importance of their main effects and interactions, and highlights the contribution of metabolites with respect to each individual effect, all in a single model. This ability thus facilitates the interpretation of environmental metabolomic results, providing in our case meaningful information on the impact of WWTP effluent exposure in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Despite the high biological variability encountered in this study, a common response of both male and female mussels was first assessed with a main change in glycerophospholipid levels (e.g., LPC and LPE). This probably reflects an alteration of biological membranes caused by oxidative stress. In addition, LPC can also be related to the synthesis of arachidonic acid, a precursor of eicosanoids. The latter are involved in reproductive processes of mussels that may be disturbed by WWTP effluent exposure. As reproductive processes do not involve the same content and use of lipids between male and female mussels, a gender-specific response of several polar lipids was also highlighted. Furthermore, a specific modulation of the kynurenine pathway in male mussels may indicate a disturbance in energy metabolism and immune system, while these alterations were not observed in female mussels. In this way, our study also supports the importance of considering gender as an experimental factor. This current approach is expected to have broad application in the field of ecotoxicology.

## Acknowledgement & Funding

This research was funded by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement, et du Travail (AMeCE 2015/1/091) and the Agence Nationale de la Recherche (IMAP ANR-16-CE34-0006-01). The doctoral fellowship of Thibaut Dumas was financially supported by the Agence Nationale de la Recherche (IMAP ANR-16-CE34-0006-01). The authors are grateful to Céline Roques and Bénédicte Marion (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, France) for their technical support.

## 2.5. References

- Adams, S.M. Establishing Causality between Environmental Stressors and Effects on Aquatic Ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* **2003**, 9, 17–35, doi:10.1080/713609850.
- Albergamo, A.; Rigano, F.; Purcaro, G.; Mauceri, A.; Fasulo, S.; Mondello, L. Free fatty acid profiling of marine sentinels by nanoLC-ESI-MS for the assessment of environmental pollution effects. *Sci. Total Environ.* **2016**, 571, 955–962, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.082.
- Arpin-Pont, L.; Bueno, M.J.M.; Gomez, E.; Fenet, H. Occurrence of PPCPs in the marine environment: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, 23, 4978–4991, doi:10.1007/s11356-014-3617-x.
- Balsinde, J.; Winstead, M.V.; Dennis, E.A. Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* **2002**, 531, 2–6, doi:10.1016/S0014-5793(02)03413-0.
- Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* **1995**, 57, 289–300, doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
- Boccard, J.; Rudaz, S. Exploring Omics data from designed experiments using analysis of variance multiblock Orthogonal Partial Least Squares. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 920, 18–28, doi:10.1016/j.aca.2016.03.042.
- Boccard, J.; Rudaz, S. Harnessing the complexity of metabolomic data with chemometrics. *J. Chemom.* **2014**, 28, 1–9, doi:10.1002/cem.2567.
- Boccard, J.; Tonoli, D.; Strajhar, P.; Jeanneret, F.; Odermatt, A.; Rudaz, S. Removal of batch effects using stratified subsampling of metabolomic data for in vitro endocrine disruptors screening. *Talanta* **2019**, 195, 77–86, doi:10.1016/j.talanta.2018.11.019.
- Bonnefille, B.; Gomez, E.; Alali, M.; Rosain, D.; Fenet, H.; Courant, F. Metabolomics assessment of the effects of diclofenac exposure on *Mytilus galloprovincialis*: Potential effects on osmoregulation and reproduction. *Sci. Total Environ.* **2018**, 613–614, 611–618, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.146.
- Burger, J. A framework and methods for incorporating gender-related issues in wildlife risk assessment: gender-related differences in metal levels and other contaminants as a case study. *Environ. Res.* **2007**, 104, 153–162, doi:10.1016/j.envres.2006.08.001.
- Cappello, T.; Fernandes, D.; Maisano, M.; Casano, A.; Bonastre, M.; Bebianno, M.J.; Mauceri, A.; Fasulo, S.; Porte, C. Sex steroids and metabolic responses in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to drospirenone. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2017**, 143, 166–172, doi:10.1016/j.ecoenv.2017.05.031.
- Castro-Portuguez, R.; Sutphin, G.L. Kynurenine pathway, NAD<sup>+</sup> synthesis, and mitochondrial function: Targeting tryptophan metabolism to promote longevity and healthspan. *Exp. Gerontol.* **2020**, 132, 110841, doi:10.1016/j.exger.2020.110841.
- Chambers, M.C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D.L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 918–920, doi:10.1038/nbt.2377.
- Courant, F.; Antignac, J.-P.; Dervilly-Pinel, G.; Le Bizec, B. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics* **2014**, 14, 2369–2388, doi:10.1002/pmic.201400255.
- Deridovich, I.I.; Reunova, O.V. Prostaglandins: Reproduction control in bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **1993**, 104, 23–27, doi:10.1016/0300-9629(93)90003-M.
- Dodder, N.G.; Maruya, K.A.; Lee Ferguson, P.; Grace, R.; Klosterhaus, S.; La Guardia, M.J.; Lauenstein, G.G.; Ramirez, J. Occurrence of contaminants of emerging concern in mussels (*Mytilus* spp.) along the California coast and the influence of land use, storm water discharge, and treated wastewater effluent. *Mar. Pollut. Bull.* **2014**, 81, 340–346, doi:10.1016/j.marpolbul.2013.06.041.
- Donato, P.; Micalizzi, G.; Oteri, M.; Rigano, F.; Sciarrone, D.; Dugo, P.; Mondello, L. Comprehensive lipid profiling in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) using hyphenated and multidimensional chromatography techniques coupled to mass spectrometry detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410, 3297–3313, doi:10.1007/s00216-018-1045-3.

- Dumas, T.; Bonnefille, B.; Gomez, E.; Boccard, J.; Castro, N.A.; Fenet, H.; Courant, F. Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to a WWTP effluent extract. *Sci. Total Environ.* **2020**, 712, 136551, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136551.
- Facchini, L.; Losito, I.; Cianci, C.; Cataldi, T.R.I.; Palmisano, F. Structural characterization and profiling of lyso-phospholipids in fresh and in thermally stressed mussels by hydrophilic interaction liquid chromatography—electrospray ionization—Fourier transform mass spectrometry. *Electrophoresis* **2016**, 37, 1823–1838, doi:10.1002/elps.201500514.
- Fent, K.; Weston, A.; Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **2006**, 76, 122–159, doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009.
- Fokina, N.N.; Ruokolainen, T.R.; Bakhmet, I.N.; Nemova, N.N. Role of lipids in adaptation of mussels *Mytilus edulis* L. of the White Sea to rapid changes in temperature. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2014**, 457, 155–157, doi:10.1134/S1607672914040103.
- Fokina, N.N.; Ruokolainen, T.R.; Nemova, N.N.; Bakhmet, I.N. Changes of Blue Mussels *Mytilus edulis* L. Lipid Composition Under Cadmium and Copper Toxic Effect. *Biol. Trace Elem. Res.* **2013**, 154, 217–225, doi:10.1007/s12011-013-9727-3.
- González-Ruiz, V.; Pezzatti, J.; Roux, A.; Stoppini, L.; Boccard, J.; Rudaz, S. Unravelling the effects of multiple experimental factors in metabolomics, analysis of human neural cells with hydrophilic interaction liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1527, 53–60, doi:10.1016/j.chroma.2017.10.055.
- Ji, C.; Li, F.; Wang, Q.; Zhao, J.; Sun, Z.; Wu, H. An integrated proteomic and metabolomic study on the gender-specific responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* to tetrabromobisphenol A (TBBPA). *Chemosphere* **2016**, 144, 527–539, doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.052.
- Ji, C.; Wei, L.; Zhao, J.; Wu, H. Metabolomic analysis revealed that female mussel *Mytilus galloprovincialis* was sensitive to bisphenol A exposures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, 37, 844–849, doi:10.1016/j.etap.2014.02.015.
- Ji, C.; Wu, H.; Wei, L.; Zhao, J.; Yu, J. Proteomic and metabolomic analysis reveal gender-specific responses of mussel *Mytilus galloprovincialis* to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE 47). *Aquat. Toxicol.* **2013**, 140–141, 449–457, doi:10.1016/j.aquatox.2013.07.009.
- Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, M.E.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1202–1211, doi:10.1021/es011055j.
- Kuhl, C.; Tautenhahn, R.; Böttcher, C.; Larson, T.R.; Neumann, S. CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 283–289, doi:10.1021/ac202450g.
- Lankadurai, B.P.; Nagato, E.G.; Simpson, M.J. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environ. Rev.* **2013**, 21, 180–205, doi:10.1139/er-2013-0011.
- Laudicella, V.A.; Whitfield, P.D.; Carboni, S.; Doherty, M.K.; Hughes, A.D. Application of lipidomics in bivalve aquaculture, a review. *Rev. Aquac.* **2019**, 1–25, doi:10.1111/raq.12346.
- Law, S.-H.; Chan, M.-L.; Marathe, G.K.; Parveen, F.; Chen, C.-H.; Ke, L.-Y. An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 1149, doi:10.3390/ijms20051149.
- Leonard, J.A.; Cope, W.G.; Barnhart, M.C.; Bringolf, R.B. Metabolomic, behavioral, and reproductive effects of the aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride on the unionid mussel *Lampsilis fasciola*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2014**, 206, 213–226, doi:10.1016/j.ygcen.2014.07.019.
- Liang, X.; Feswick, A.; Simmons, D.; Martyniuk, C.J. Environmental toxicology and omics: A question of sex. *J. Proteomics* **2018**, 172, 152–164, doi:10.1016/j.jprot.2017.09.010.

- Lin, C.Y.; Viant, M.R.; Tjeerdema, R.S. Metabolomics: methodologies and applications in the environmental sciences. *J. Pestic. Sci.* **2006**, *31*, 245–251.
- Liu, X.; Sun, H.; Wang, Y.; Ma, M.; Zhang, Y. Gender-specific metabolic responses in hepatopancreas of mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol.* **2014**, *40*, 407–413, doi:10.1016/j.fsi.2014.08.002.
- Loos, R.; Carvalho, R.; António, D.C.; Comero, S.; Locoro, G.; Tavazzi, S.; Paracchini, B.; Ghiani, M.; Lettieri, T.; Blaha, L.; et al. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* **2013**, *47*, 6475–6487, doi:10.1016/j.watres.2013.08.024.
- Makide, K.; Kitamura, H.; Sato, Y.; Okutani, M.; Aoki, J. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2009**, *89*, 135–139, doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.04.009.
- Martínez-Pita, I.; Sánchez-Lazo, C.; Ruíz-Jarabo, I.; Herrera, M.; Mancera, J.M. Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual hormones in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain. *Aquaculture* **2012**, *358–359*, 274–283, doi:10.1016/j.aquaculture.2012.06.003.
- McClellan-Green, P.; Romano, J.; Oberdörster, E. Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. *Environ. Res.* **2007**, *104*, 183–191, doi:10.1016/j.envres.2006.09.008.
- Mezzelani, M.; Gorbi, S.; Regoli, F. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar. Environ. Res.* **2018**, doi:10.1016/j.marenvres.2018.05.001.
- Miller, M.G. Environmental Metabolomics: A SWOT Analysis (Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats). *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 540–545, doi:10.1021/pr060623x.
- Nguyen, T.V.; Alfaro, A.C.; Merien, F.; Young, T.; Grandiosa, R. Metabolic and immunological responses of male and female New Zealand Greenshell™ mussels (*Perna canaliculus*) infected with *Vibrio* sp. *J. Invertebr. Pathol.* **2018**, *157*, 80–89, doi:10.1016/j.jip.2018.08.008.
- Peteiro, L.G.; Labarta, U.; Fernández-Reiriz, M.J. Variability in biochemical components of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) cultured after Prestige oil spill. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *145*, 588–594, doi:10.1016/j.cbpc.2007.02.006.
- Picot Groz, M.; Martínez Bueno, M.J.; Rosain, D.; Fenet, H.; Casellas, C.; Pereira, C.; Maria, V.; Bebianno, M.J.; Gomez, E. Detection of emerging contaminants (UV filters, UV stabilizers and musks) in marine mussels from Portuguese coast by QuEChERS extraction and GC–MS/MS. *Sci. Total Environ.* **2014**, *493*, 162–169, doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.062.
- Rietjens, I.M.C.M.; Vervoort, J.; Masłowska-Górnica, A.; Van den Brink, N.; Beekmann, K. Use of proteomics to detect sex-related differences in effects of toxicants: implications for using proteomics in toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* **2018**, 1–16, doi:10.1080/10408444.2018.1509941.
- Sánchez-Avila, J.; Tauler, R.; Lacorte, S. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk. *Environ. Int.* **2012**, *46*, 50–62, doi:10.1016/j.envint.2012.04.013.
- Sergent, O.; Morel, I.; Cillard, J. Involvement of metal ions in lipid peroxidation: biological implications. *Met. Ions Biol. Syst.* **1999**, *36*, 251–287.
- Signa, G.; Di Leonardo, R.; Vaccaro, A.; Tramati, C.D.; Mazzola, A.; Vizzini, S. Lipid and fatty acid biomarkers as proxies for environmental contamination in caged mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Ecol. Indic.* **2015**, *57*, 384–394, doi:10.1016/j.ecolind.2015.05.002.
- Simmons, D.B.D.; Benskin, J.P.; Cosgrove, J.R.; Duncker, B.P.; Ekman, D.R.; Martyniuk, C.J.; Sherry, J.P. Omics for aquatic ecotoxicology: Control of extraneous variability to enhance the analysis of environmental effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **2015**, *34*, 1693–1704, doi:10.1002/etc.3002.

- Smith, C.A.; Want, E.J.; O'Maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 779–787, doi:10.1021/ac051437y.
- Sumner, L.W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M.H.; Beger, R.; Daykin, C.A.; Fan, T.W.-M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J.L.; et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* **2007**, *3*, 211–221, doi:10.1007/s11306-007-0082-2.
- Want, E.J.; Masson, P.; Michopoulos, F.; Wilson, I.D.; Theodoridis, G.; Plumb, R.S.; Shockcor, J.; Loftus, N.; Holmes, E.; Nicholson, J.K. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 17–32, doi:10.1038/nprot.2012.135.
- Zhang, L.; Sun, W.; Zhang, Z.; Chen, H.; Jia, X.; Cai, W. Gender-specific metabolic responses in gonad of mussel *Perna viridis* to triazophos. *Mar. Pollut. Bull.* **2017**, *123*, 39–46, doi:10.1016/j.marpolbul.2017.09.032.

## 2.6. Supplementary data

The following are available online at <https://www.mdpi.com/2218-1989/10/7/269/s1>, Table S1: Annotation and identification of metabolites with high effect-specific VIP<sup>2</sup> value, according to the impact of the *Exposure* factor or to the *Exposure* × *Gender* interaction; Table S2: Two-way ANOVA tests in conjunction with Tukey's multiple comparison test, followed by the Benjamini–Hochberg FDR correction.

### 3. Discussion & Conclusion

En combinant la structure du design expérimental et l'analyse multifactorielle des données par l'approche AMOPLS, cet article met en évidence l'intérêt d'une telle stratégie pour traiter et interpréter les données métabolomiques dans un contexte écotoxicologique. En suivant cette stratégie, nous avons pu déterminer l'implication du facteur sexe en réponse à l'exposition au rejet de STEP, en distinguant la réponse commune liée uniquement à l'exposition et la réponse spécifique des moules mâles et femelles. Comme observé dans cette étude, l'information d'intérêt pour répondre à notre question de recherche est portée par une faible part de la variabilité globale mesurée, bien que non négligeable. Dans cette situation, l'approche AMOPLS s'est révélée être d'une aide précieuse pour mettre en évidence la part subtile de variabilité en lien avec nos facteurs d'études malgré une part majeure de variabilité non expliquée. Ainsi, cette approche est d'autant plus pertinente lorsque l'organisme d'étude est une espèce sauvage dont la variabilité biologique inter-individuelle élevée pourrait masquer la réponse à l'exposition.

L'un des faits mentionné dans cette étude mais peu discuté, concerne l'effet du facteur sexe sur la variabilité observée, sans considérer le facteur exposition. Dans notre cas, le facteur sexe à un effet non significatif sur la variabilité observée, ce qui signifie que la différence entre les empreintes métaboliques issues des glandes digestives de moules mâles et femelles est négligeable. D'après la littérature, des différences mâle/femelle au niveau du métabolome de différents tissus (manteau, gonades, branchies) ont toutefois été décrites chez le genre *Mytilus* (Ellis et al., 2014; Hines et al., 2007b; Ji et al., 2016). Afin de différencier le sexe des moules *Mytilus edulis* par des marqueurs métaboliques, Ellis et al. (2014) ont identifié 25 métabolites dans le manteau responsable d'au moins 50 % de la variabilité différenciant les mâles des femelles. Au regard du rôle que joue le manteau dans la gamétogénèse (Lowe et al., 1982), il n'est pas surprenant d'observer une telle différence entre les sexes. Concernant la différence mâle/femelle au niveau du métabolome de la glande digestive des moules *Mytilus* spp, moins de données sont disponibles. Cependant, une équipe de chercheurs a étudié la divergence des transcrits des glandes digestives des moules *Mytilus galloprovincialis* entre les mâles et les femelles durant les différentes étapes du développement des gonades (Banni et al., 2011). Une analyse génomique fonctionnelle basée sur les statistiques d'enrichissement des termes GO (*Gene Ontology*) a ainsi révélé les processus biologiques différentielles entre mâles et femelles au cours du développement des gonades. Contrairement aux résultats attendus, l'analyse des termes GO n'a pas mis en évidence des processus ou des fonctions moléculaires liés aux voies spécifiques du développement gonadique mais plutôt des différences au niveau de processus cataboliques et biosynthétiques ou encore du processus métabolique des glucides. Ces différences mâles/femelles

observées dans la littérature semblent masquées par d'autres facteurs non identifiés dans notre étude. En revanche, notre étude témoigne bien d'une implication biologique différente de plusieurs métabolites entre mâles et femelles, traduit par une modulation sexe-dépendante de ces métabolites en réponse à l'exposition au rejet de STEP.

La compréhension des spécificités du métabolome de chaque sexe constitue la clé pour interpréter correctement la réponse des organismes mâles et femelles suite à une exposition à des contaminants (Hines et al., 2007a). Davantage de recherches devraient s'orienter dans ce sens afin de mieux caractériser les métabolites différentiels entre les sexes ainsi que leurs implications biologiques.

Les deux études conduites sur l'évaluation des effets d'un effluent de STEP sur la moule méditerranéenne (Chapitre 3 et 4) ont révélé différents résultats selon la stratégie appliquée pour le traitement des données métabolomiques (analyse univariée ou multivariée). Concernant le Chapitre 3, la sélection des variables mettant en évidence les métabolites significativement modulés chez les organismes mâles en réponse à l'effluent s'est basée sur une analyse différentielle univariée. Cette stratégie fait donc ressortir l'ensemble des signaux dont l'abondance est significativement différente d'une condition d'exposition à l'autre. Le nombre de signaux significativement modulés mis en évidence par cette stratégie pouvant générer une quantité extrêmement importante d'annotations, il est nécessaire par la suite d'appliquer une méthode pour prioriser les annotations biologiquement pertinentes (et en cohérence avec leurs propriétés physico-chimiques et leur temps de rétention). Cela a impliqué l'utilisation de l'outil *Pathways analysis* de MetaboAnalyst 4.0 afin de faire ressortir les voies métaboliques potentiellement les plus impactées et ainsi prioriser la confirmation des annotations de ces voies (confirmation par injection du standard analytique correspondant). Ainsi, nous avons identifié principalement des métabolites issus du métabolisme des acides aminés ainsi que des bases puriques et pyrimidiques modulés par l'exposition. Toutefois, cette stratégie omet la considération des corrélations entre les variables, à la différence d'une approche multivariée. Cette dernière a été appliquée à travers l'approche AMOPLS afin d'évaluer le rôle du sexe dans la réponse à cette même exposition (Chapitre 4). L'AMOPLS a permis de classer l'ensemble des variables selon leur contribution dans le modèle, c'est-à-dire selon la part de variabilité pouvant être expliquée par les facteurs exposition et sexe (et leur interaction). Ainsi, un nombre plus restreint de variables est ressorti de cette approche, comptant parmi les plus impliquées dans la réponse des individus mâles et/ou femelles à l'exposition, dont plusieurs semblent également très corrélées entre elles. En appliquant la même méthode d'annotation que l'étude précédente (i.e. annotation *via* la base de données HMDB puis priorisation des annotations grâce à une analyse des voies métaboliques pour confirmation) peu de ces variables ont pu être annotées (peu sont communes avec l'étude précédente excepté pour la

xanthine, la N-acetyl-L-alanine, la N'-formylkynurénine et la L-kynurénine chez les mâles). En utilisant toutefois une autre base de données, LipidMaps, nous avons révélé une perturbation du métabolisme des lipides (ex. acides gras, acyl carnitines, lysophosphatidylcholines, lysophosphatidyléthanolamines, etc.), précédemment non mise en évidence n'ayant pas utilisé cette base de données dans nos recherches.

Cette comparaison entre les deux études montre l'intérêt de chaque stratégie de sélection des variables et supporte l'importance de combiner les analyses statistiques univariées et multivariées, toutes deux porteuses d'informations complémentaires (et non contradictoires).

# Discussion générale

---

Les activités anthropiques altèrent la santé des écosystèmes avec des conséquences visibles à court terme : la destruction des habitats et la disparition d'espèces avec un constat alarmant de déclin de la biodiversité (Bongaarts, 2019; Chase et al., 2020). Une autre conséquence constatée de nos activités à court terme est l'accélération du réchauffement climatique et les changements globaux sur notre planète (Field et al., 2014). Cela se traduit par une augmentation de la fréquence et de la violence d'évènements naturels extrêmes (ex. sécheresse, canicule, inondation, ouragan). Par ailleurs, les changements globaux induisent progressivement une modification des conditions environnementales (ex. température, pH, salinité) dans lesquelles évoluent les êtres vivants. Les conséquences de ces modifications sont en revanche plus difficiles à évaluer à court terme et à prédire sur le long terme (Bulling et al., 2010; Thuiller, 2004). En parallèle, les activités humaines rejettent en continu un nombre croissant de contaminants (Noguera-Oviedo and Aga, 2016). Bien que la prise de conscience des problèmes liés aux contaminants émergents, comme les PP, soit de plus en plus importante, nous manquons cruellement de données sur l'ampleur et la portée du problème, et donc d'éléments probants sur leurs impacts (Damania et al., 2019). En effet, les contaminants représentent une menace invisible dont la réelle étendue des conséquences sur les écosystèmes, difficiles à évaluer à l'heure actuelle, pourraient se révéler sur le long terme. De plus, le devenir et le comportement des contaminants dans l'environnement, et par conséquent leurs effets sur les organismes, sont susceptibles d'évoluer conjointement avec les modifications des conditions environnementales causées par les changements globaux (Schiedek et al., 2007). L'un des challenges de l'écotoxicologie est donc d'évaluer, ou plutôt d'estimer, l'impact des PP et des contaminants dans leur ensemble, sur le long terme, dans un monde en constante évolution.

Des verrous méthodologiques et scientifiques ont été identifiés en vue d'étudier les effets de contaminants présents à de faibles concentrations et en mélange dans le milieu. Les approches – omiques nous sont apparues comme des approches pertinentes pour relever ce défi. Nous verrons ainsi au cours de cette discussion comment les approches – omiques, et principalement la métabolomique, peuvent jouer un rôle important en nous appuyant à la fois sur la littérature et sur les études réalisées dans cette thèse.

Nous verrons également que d'autres questions émergent de ce travail notamment sur l'applicabilité de l'approche métabolomique : *Quel est l'intérêt de déterminer des marqueurs de ces effets à court terme ? A quelle durée d'exposition se placer pour investiguer les effets des PP présents à de faibles doses et en mélange ? Les modifications ou marqueurs observés à l'échelle moléculaire peuvent-ils engendrer à terme des effets néfastes pour les organismes ? La métabolomique peut-elle être appliquée à des études in situ ? Comment la métabolomique peut-elle devenir un outil de biosurveillance ?*

***Comment étudier les effets de contaminants présents à de faibles concentrations et en mélange dans le milieu ?***

*Quel est l'intérêt de déterminer des marqueurs de ces effets à court terme ?*

Dans l'environnement les PP sont des contaminants présents à de faibles (ng-µg/L) voire très faibles (pg-ng/L) concentrations. Leur détection et quantification dans le milieu est un défi, tout comme la mise en évidence de leurs effets sur les organismes. La mise en évidence d'effets est souvent confrontée aux limites imposées par les paramètres biologiques mesurés (souvent à l'échelle de l'individu) et limitée à une durée d'exposition donnée. Les approches -omiques représentent une alternative aux études fondées sur des hypothèses, afin de détecter des effets à l'échelle moléculaire, et ce sans hypothèse préalable des résultats attendus. Se positionner à l'échelle moléculaire ouvre la possibilité d'observer des modifications à court terme, même à de faibles concentrations d'exposition. L'approche métabolomique ayant l'avantage d'étudier les modifications métaboliques au plus proche de la condition physiologique de l'organisme, il convenait (au début de ce travail de thèse) d'étudier les possibilités qu'elle offre pour proposer des hypothèses sur des effets néfastes susceptibles de se produire dans le futur. Nous avons suggéré qu'en étudiant des effets sur le métabolome à court terme, l'approche métabolomique permettrait d'orienter les effets à investiguer à plus long terme, à des niveaux d'organisation biologique supérieurs.

*A quelle durée d'exposition se placer pour investiguer les effets des PP présents à de faibles doses et en mélange ?*

Un contaminant est susceptible d'induire différents effets, au niveau sub-individuel par exemple, selon la durée d'exposition (Eggen et al., 2004). Ainsi, le choix de la durée d'exposition sera déterminant sur les effets observés. La durée d'exposition est un paramètre primordial à considérer lors de la construction du design expérimental, qui dépend essentiellement de la question de recherche définie. Selon le temps d'exposition fixé, l'approche métabolomique nous permet d'observer l'état du métabolome à cet instant *t* seulement. Mais la réponse biologique peut ne pas être permanente, en particulier si la réponse est compensatoire ou adaptative (Simmons et al., 2015). Cela représente un défi considérable. En effet, une réponse pourrait être entièrement manquée si l'échantillonnage se produit à un moment inapproprié. En se reportant au concept de l'*Adverse Outcome Pathway* (AOP ; Chapitre 1), pour l'exposition à une molécule seule, cet instant *t* peut se situer avant (si trop tôt) ou après l'évènement moléculaire initiateur (MIE), ou pendant l'un des évènements clés (KE) conduisant à un effet néfaste (AO). Si la question de recherche est d'étudier le mécanisme d'action d'une molécule (i.e. quelles interactions avec quelles cibles biologiques), il serait donc plus pertinent de choisir un temps d'exposition compatible avec le MIE. Le temps nécessaire pour

déclencher un MIE est dépendant de la toxicocinétique (i.e. distribution dans l'organisme, métabolisation et élimination) d'un contaminant donné, à une dose donnée, pour un organisme donné. Par exemple, il est connu chez l'être humain qu'à court ou long terme, la toxicocinétique de la CBZ est différente, pouvant conduire à différents MIE (connaissances encore incomplètes) et KE. Après l'administration d'une dose orale unique de CBZ, l'absorption est assez complète et la demi-vie d'élimination est d'environ 35 heures, tandis qu'après de multiples doses administrées la demi-vie est réduite à 10-20 heures, en raison de l'auto-induction de son métabolisme par oxydation (Bertilsson, 1978). La principale voie d'oxydation implique la formation d'un métabolite actif, la carbamazépine-10,11-époxyde, qui possède des propriétés anticonvulsives similaires à celles de la CBZ. A des doses thérapeutiques, la CBZ peut à court terme affecter le système nerveux central et le système gastro-intestinal, provoquant sédation, ataxie, vertiges, nausées, vomissements, constipation et diarrhée (Albani et al., 1995). Un traitement sur le long terme est susceptible de surcroît de modifier les lipides plasmatiques, moduler la concentration des hormones sexuelles, produire une hyponatrémie, augmenter l'appétit et provoquer une prise de poids, ou encore réduire le nombre de globules blancs et induire plusieurs réactions allergiques. Ainsi, les MIE et KE peuvent différer après l'administration d'une dose unique ou répétée, ou encore suite à une exposition à un contaminant à court ou long terme. Connaître les propriétés toxicocinétiques d'un contaminant en amont de toutes études toxicodynamiques est donc nécessaire pour définir un temps d'exposition adapté à sa question de recherche. Par ailleurs, si l'objectif n'est pas d'étudier le mécanisme d'action d'un contaminant mais plutôt ses effets néfastes sur l'organisme, il est préférable d'adapter le temps d'exposition selon sa pertinence environnementale (ou sanitaire, dans l'exemple cité ci-dessus). Dans certains scénarios, tels que l'exposition d'organismes aquatiques à des eaux de ruissellement agricoles, étudier la réponse à court terme serait le plus adapté. Dans de nombreux autres scénarios, tels que l'exposition à des sédiments historiquement contaminés ou à des rejets continus de STEP, l'étude des conséquences de cette exposition chronique sur le long terme serait la plus pertinente. De toute évidence, il est nécessaire de tester plusieurs durées d'exposition afin de suivre l'évolution de la réponse biologique, tout en adaptant les paramètres biologiques mesurés. Notre expérience montre qu'un temps, relativement court, de 3 jours d'exposition à la CBZ suffit à la mise en évidence d'une perturbation au niveau moléculaire. Il serait donc intéressant de tester les effets de la CBZ, toujours à la faible et forte concentration, sur une durée plus longue afin d'étudier l'évolution de la signature métabolique de la CBZ, si elle tend comme pour le rejet de STEP vers une perturbation plus générale de l'organisme. De plus, cela permettrait de vérifier si les effets observés à la faible concentration (moins marqués après 3 jours d'exposition qu'à la forte concentration) atteindraient ceux de la forte concentration observés après 3 jours d'exposition.

Dans l'environnement, un PP n'est pas seul et co-existe avec de multiples contaminants. Même à de (très) faibles concentrations, l'incidence d'un mélange de contaminants sur l'organisme peut être très différente de celle d'une molécule seule. Comme le montrent ces travaux de thèse, une telle différence pourrait être observée à court terme par l'approche métabolomique. En effet, une différence marquée a été observée entre les résultats métabolomiques obtenus selon l'exposition à une molécule seule, la CBZ, ou l'exposition à un mélange complexe de contaminants (incluant la CBZ), l'effluent de STEP. Chacune des empreintes métaboliques générées se distingue tant sur le nombre de signaux modulés<sup>4</sup> (moins de 200 signaux pour l'exposition à la CBZ à la faible ou forte dose, contre plus de 600 signaux pour l'exposition au rejet de STEP) que sur la qualité des métabolites annotés/identifiés (i.e. la fonction biologique connue de ces métabolites). En effet, l'exposition à la CBZ a principalement révélé des métabolites qui sembleraient être des marqueurs d'un stress au niveau cellulaire (appuyé par les données protéomiques), tandis que l'exposition à l'effluent de STEP a mis en évidence davantage de métabolites liés à une perturbation générale de l'organisme (ex. métabolisme énergétique, osmorégulation), dont les rôles biologiques connus cibleraient des fonctions importantes de l'organisme (ex. reproduction, formation du byssus, système immunitaire). Ces deux expérimentations se distinguent par la composition de l'exposition<sup>5</sup>. Il est donc cohérent d'observer des modifications beaucoup plus importantes quand plusieurs contaminants composent l'exposition. Comme il a été décrit en Chapitre 1, les effets des différents contaminants peuvent être additifs ou synergiques, c'est-à-dire que l'effet global observé peut être égal à la somme des effets individuels de chaque contaminant ou bien supérieur à la somme de ces effets. L'action des contaminants sur différentes cibles moléculaires, et à différents moments, peut se traduire, lors de l'observation d'un effet, par une synergie ou un antagonisme. Dans une telle situation (i.e. avec autant de contaminants présents), nous pouvons nous demander si les effets antagonistes pourraient être négligeables sur l'effet global observé. Cela démontre l'intérêt de considérer la contamination dans sa globalité afin de ne pas sous-estimer le risque que représentent de tels rejets dans l'environnement.

---

<sup>4</sup> Sur la base d'un test univarié, considérant une modulation significative quand l'amplitude est > 30 % et la *p-value* < 0,05.

<sup>5</sup> Nous laissons volontairement à ce stade de côté la différence du temps d'exposition entre le travail sur la CBZ – 3 jours – et celui sur l'effluent de STEP – 7 jours.

***Les modifications et marqueurs observés à l'échelle moléculaire peuvent-ils engendrer à terme des effets néfastes pour les organismes ?***

Les modifications induites par les contaminants à l'échelle moléculaire sont l'expression d'une réponse précoce de l'organisme (Depledge and Fossi, 1994). A l'issue des expérimentations conduites dans cette thèse, de nombreuses modifications métaboliques ont été mesurées en réponse aux contaminants, traduisant un effet de ces derniers sur l'organisme. Néanmoins, il est nécessaire de se demander si ces modifications métaboliques traduisent réellement un effet néfaste sur l'organisme, à court comme à long terme. Si ce stress venait à s'interrompre, les capacités de résilience du système biologique seraient-elles suffisantes pour restaurer le bon état physiologique de l'organisme ? Ou bien pas assez pour réparer des dommages irréversibles, susceptibles d'entraîner un dysfonctionnement de certaines fonctions biologiques (ex. reproduction, filtration, abondance et solidité du byssus, etc.). Dans l'autre cas de figure, si ce stress venait à persister dans le temps, les modifications métaboliques seraient-elles maintenues ou accompagnées par de nouvelles modifications causant des dommages irréversibles, ou bien une adaptation de l'organisme serait-elle envisageable ? Les limites de la tolérance physiologique des organismes à un stress sont donc déterminantes du devenir de l'organisme (Amiard-Triquet et al., 2011).

L'un des atouts de l'approche métabolomique, est sa capacité de générer des hypothèses quant aux effets néfastes susceptibles d'être engendrés selon les métabolites perturbés et les fonctions biologiques dans lesquels ils interviennent (Hines et al., 2010; van Ravenzwaay et al., 2007). En testant et validant ces hypothèses, il serait alors possible de faire le lien entre une réponse moléculaire précoce, et des effets transposables à des niveaux d'organisation biologique supérieurs et écologiquement plus pertinent (concept de l'AOP). Cependant, très peu d'études ont établi de tels liens. Par exemple, Hines et al. (2010) ont fait le lien entre la modulation de certains métabolites chez *M. edulis* et une diminution du biomarqueur *scope for growth* (bilan énergétique entre les aliments absorbés moins la dépense énergétique), une mesure physiologique de la *fitness* d'un organisme. De même, Taylor et al. (2018) ont découvert des métabolites prédictifs d'une baisse de la production de progéniture chez *Daphnia magna* après une exposition chronique à des contaminants. Il est donc nécessaire de disposer de preuves empiriques supplémentaires pour déterminer les modifications métaboliques qui génèrent des effets néfastes pour l'organisme et pertinents sur le plan écologique (atteinte de la *fitness*, i.e. croissance, reproduction ou survie) (Pomfret et al., 2019). En démontrant la capacité de l'approche métabolomique à établir empiriquement un lien entre le métabolome et la *fitness* des individus, cela supporterait l'utilisation du métabolome en tant que bioindicateur dans des études menées sur le terrain (Pomfret et al., 2019).

### ***La métabolomique peut-elle être appliquée à des études in situ ?***

Tendre progressivement vers des études conduites sur le terrain après des études en conditions contrôlées de laboratoire est indispensable pour évaluer les effets réels des contaminants sur les organismes dans l'environnement (Simões et al., 2019). Plusieurs études en métabolomique ont déjà réussi à distinguer des modifications du métabolome entre des organismes prélevés dans des sites impactés par des activités humaines et des sites de référence peu impactés. Par exemple, des altérations significatives du métabolome ont été démontrées chez des moules *M. galloprovincialis* encagées sur un site industriel pétrochimique par comparaison avec des moules encagées sur un site de référence (Cappello et al., 2013; Fasulo et al., 2012). De cette manière, le métabolome pourrait être un bioindicateur de l'impact des activités anthropiques (Pomfret et al., 2019). Toutefois, la transition des études en laboratoire vers des études *in situ* fait face à certaines difficultés. En effet, en plus des liens à établir entre les modifications métaboliques et des effets physiologiques néfastes, l'un des challenges de l'approche métabolomique appliquée *in situ* est de pouvoir discriminer les facteurs de stress responsables des modifications métaboliques observées, dans un environnement où les stress sont multiples (ex. divers contaminants, prédation, disponibilité des ressources, pathogènes, variation de température, etc.). Pour être en mesure de réaliser ces distinctions, il est d'abord nécessaire de démontrer des signatures métaboliques spécifiques de ces différents facteurs stress. Comme nous l'avons vu en Chapitre 3, il n'est pas évident d'avancer avec certitude des liens de causalités entre les modifications métaboliques observés et les contaminants détectés dans l'effluent de STEP, sans connaître au préalable la signature métabolique spécifique des différents contaminants (qui peut ne pas être la même en présence d'autres contaminants). Néanmoins, des études métabolomiques conduites en laboratoire ont tout de même démontré une spécificité de la réponse métabolique selon différents facteurs stress étudiés. Des signatures métaboliques distinctes entre le plomb et le cadmium ont par exemple été reportées chez le poisson *Carassius auratus gibelio*, montrant par la suite un effet additif après une exposition simultanée à ces deux métaux (Khan et al., 2016). Par ailleurs, Izral et al. (2018) ont été capables avec l'approche métabolomique de distinguer et diagnostiquer chez l'écrevisse de Louisiane (*Procambarus clarkii*) un stress lié à la disponibilité en nourriture ou à la quantité en oxygène. Bien que ces études démontrent les capacités prometteuses de diagnostic de l'approche métabolomique, davantage de recherches sont nécessaires pour conclure que des signatures métaboliques permettraient de diagnostiquer des facteurs de stress spécifiques (Pomfret et al., 2019).

Dans l'environnement, il est en revanche possible que les signatures métaboliques spécifiques de contaminants soient masquées par la variabilité biologique, d'où l'importance d'établir des plans d'expériences robustes (Adams, 2003; Simmons et al., 2015). Naturellement, la variabilité du métabolome est supposée élevée entre les espèces d'une même population vivant à l'état sauvage,

en raison de multiples facteurs internes (biologiques) et externes (environnementaux) à l'organisme. En effet, au cours de leur cycle de vie, les moules du genre *Mytilus*, par exemple, sont soumises à de nombreuses fluctuations des conditions environnementales, concernant la température, la salinité, le pH, l'hypoxie ou encore la disponibilité en nutriments (Tomanek, 2012). Face à ces fluctuations, considérées comme des facteurs stress, ces organismes ont développé au cours de leur évolution de nombreux processus adaptatifs, leur permettant de maintenir ou rétablir l'homéostasie et de réparer les dommages macromoléculaires, dans les limites de leur tolérance physiologique (Tomanek, 2012). En plus de ces facteurs externes, d'autres facteurs biologiques, intrinsèques à chaque individu, occasionnent une variabilité du métabolome. Nous avons vu en Chapitre 4 par exemple que le facteur sexe est capable d'expliquer une certaine part de la variabilité des données métabolomiques en réponse à une exposition, mais qu'une part majeure de la variabilité reste inexpliquée par les facteurs d'études. D'autres facteurs peuvent être impliqués dans cette variabilité comme l'âge, le stade de reproduction, le statut physiologique de l'organisme, la diversité génétique, etc. Cela souligne l'importance de caractériser cette variabilité biologique, dans des conditions normales de laboratoire dans un premier temps, ainsi que de déterminer comment cette variabilité peut impacter notre capacité à détecter dans l'environnement des signatures métaboliques spécifiques de contaminants (Martyniuk, 2018). Plusieurs auteurs suggèrent donc l'intérêt de collecter de nombreuses données décrivant l'ampleur de la variabilité du métabolome et les facteurs associés chez différentes espèces (Hines et al., 2007a; Martyniuk, 2018; Morrison et al., 2007; Peñuelas and Sardans, 2009; Viant, 2007). Des approches statistiques multifactorielles, comme l'AMOPLS appliquée dans le Chapitre 4, seraient pertinentes pour investiguer la variabilité du métabolome selon différents facteurs environnementaux ou biologiques, dans des conditions contrôlées de laboratoire dans un premier temps.

### ***Comment la métabolomique peut-elle devenir un outil de biosurveillance ?***

Afin d'obtenir une vision globale de l'impact des PP et de la contamination en générale sur les écosystèmes, il est nécessaire de mener des investigations à plus grande échelle avec un suivi répété dans le temps (ex. programme de biosurveillance) (Pomfret et al., 2019). Elargir l'application de l'approche métabolomique à des études spatio-temporelles plus étendues nécessite la génération de données comparables au sein et entre les laboratoires (i.e. intra- et inter-laboratoires). De telles comparaisons sont challengées par la variabilité des données qui peut intervenir à trois niveaux : (i) la variabilité biologique intra- et inter-population, (ii) la variabilité spatio-temporelle des conditions environnementales, et (iii) la variabilité pre-analytique (i.e. échantillonnage, stockage, préparation des échantillons), analytique et post-analytique (i.e. prétraitement des données).

Comme mentionné plus haut, le métabolome des moules *Mytilus* spp. au sein d'une même population varie dans le temps, selon la période de l'année, et ce de manière variable pour chaque individu (selon l'âge, le sexe, le stade de reproduction, le statut physiologique, la génétique, etc.). Cette variabilité est également accentuée entre des populations implantées sur des sites différents. En effet, la différence d'habitat et des traits d'histoire de vie entre deux populations a pu aboutir à différentes adaptations génétiques, bien que les voies métaboliques devraient globalement être conservées dans l'espace selon Pomfret et al. (2019). Cette théorie reste cependant à démontrer. De plus, les conditions environnementales évoluent dans le temps comme dans l'espace, et génèrent donc des variations métaboliques intra- et inter-populations. S'ajoute à la variabilité biologique et environnementale, une variabilité des protocoles d'échantillonnages (ex. choix de la date d'échantillonnage, choix de la taille des organismes, du sexe, de l'organe prélevé, etc.), de préparation des échantillons (ex. différents protocoles d'extraction des métabolites ne permettent pas le même recouvrement du métabolome), d'analyse des échantillons (ex. différentes plateformes analytiques avec différents instruments [LC/GC-MS, RMN], technologies [analyseur : Orbitrap, TOF ; source d'ionisation : ESI, APPI] et paramétrages, génèrent différentes empreintes métaboliques), et de prétraitement des données (ex. différentes manières d'extraire l'information des données brutes, de trier puis de normaliser les signaux analytiques, peuvent aboutir à des jeux de données différents) (Villas-Bôas et al., 2007). Cette variabilité qui relève du design expérimental et du *workflow* de l'approche métabolomique peut différer au sein d'un même laboratoire et le plus souvent entre les laboratoires. Pour faire face à l'ensemble de ces variabilités, le respect de bonnes pratiques et de certaines normes permettrait de réduire et d'uniformiser la variabilité des données générées, rendant la comparaison des données au sein et entre les laboratoires plus pertinente.

Cela commence par la stratégie d'échantillonnage qui doit prendre en compte les facteurs de variabilités biologiques et environnementales. Afin d'atténuer la variabilité biologique, il est donc préférable d'échantillonner des organismes physiologiquement comparables, c'est-à-dire de taille, de sexe, d'âge (si définissable) mais également d'indices physiologiques similaires. Chez les bivalves, il est par exemple possible de calculer un indice de condition (i.e. rapport entre la masse sèche des tissus et la masse sèche de la coquille), indicateur nutritionnel et donc de l'état physiologique général de l'organisme (Irisarri et al., 2015), ou encore un indice de condition gonadique (i.e. rapport entre la masse du manteau, envahie par les gonades, et la masse totale des tissus) en lien étroit avec le stade de reproduction (la gamétogénèse) (Suárez et al., 2005). Fournir l'ensemble de ces informations permettrait donc de savoir si la comparaison des résultats entre différentes études serait pertinente d'un point de vue de la variabilité biologique. Concernant la variabilité des conditions environnementales entre plusieurs sites, Bahamonde et al. (2016) suggèrent de mesurer et renseigner les paramètres physico-chimiques des milieux dans lesquels les organismes ont été collectés, y compris

la période de l'année, comme par exemple la température, le pH, la salinité, la turbidité, l'oxygène dissous ou encore la matière organique, autant de paramètres susceptibles d'influencer le métabolome des organismes et d'être des facteurs confondants. Par la suite, plusieurs recommandations ont été faites pour identifier et limiter les facteurs de variabilité lors des étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques, incitant les chercheurs à renseigner rigoureusement les détails des protocoles appliqués pour une meilleure reproductibilité et comparaison des données (Dunn et al., 2011; Haug et al., 2013; Lindon et al., 2005; Salek et al., 2015; Sumner et al., 2007). Compte tenu de la diversité des applications de l'approche métabolomique et des diverses technologies analytiques utilisées, il est cependant plus important de disposer de méthodes fiables « adaptées à l'usage », intégrant des procédures rigoureuses de contrôle de la qualité, que des protocoles standardisés (Villas-Bôas et al., 2007). Par exemple, Martin et al. (2015) ont montré qu'à partir de différents instruments analytiques (combinant 5 instruments RMN relativement similaires et 11 LC-MS de technologies différentes), il est possible d'obtenir des résultats cohérents à partir d'un même échantillon, sans procédure de standardisation préalable. Cette étude conclue sur la possibilité de fusionner des données acquises entre différentes plateformes analytiques utilisant des technologies et protocoles variés, et préconise une stratégie de fusion *high level* s'appuyant sur les métabolites identifiés ou les signaux annotés. Dans ce contexte, le partage d'échantillons de contrôle qualité communs, dédiés à une matrice biologique donnée, permettrait une normalisation entre les différentes plateformes analytiques (Dunn et al., 2011). Une fois la mise en place de bonnes pratiques et la définition de certaines normes, des expérimentations intra- et inter-laboratoires seront nécessaires pour déterminer la reproductibilité et la cohérence de la réponse moléculaire mesurée chez une même espèce soumise au même facteur stress (Martyniuk, 2018).

La métabolomique (de surcroît quand combinée à d'autres -omiques), est une approche pertinente pour se confronter à la problématique émergente des PP dans l'environnement. Elle présente l'avantage de mesurer des effets précoces des PP, même à des concentrations environnementales. Cette approche est également capable de déterminer des signatures métaboliques spécifiques d'un stress, et pourrait aider à faire le lien entre des modifications métaboliques et des effets transposables à des niveaux d'organisation biologique supérieurs. La métabolomique est donc une approche prometteuse pour être intégrée dans des études de terrain comme dans des programmes de biosurveillance, par exemple. De nombreux efforts sont encore à fournir avant de pouvoir utiliser en routine l'approche métabolomique comme un outil fiable dans l'enrichissement du savoir sur l'impact des PP et des contaminants sur les écosystèmes.

# Conclusion générale

---

Ces travaux de thèse ont contribué à l'enrichissement des connaissances sur les relations de cause à effet entre l'exposition à un ou plusieurs contaminants et la réponse de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*, à l'aide des approches -omiques. Ces approches offrent une vision intégrative des processus moléculaires interagissant à différents niveaux : le génome, le transcriptome, le protéome et le métabolome. L'approche métabolomique a été retenue ici pour sa capacité à fournir des informations sur l'abondance des produits finaux des processus de régulation, les métabolites, étroitement liés à la condition biologique de l'organisme. De plus, cette approche permet à la fois d'accéder à l'endo-métabolome (i.e. métabolites endogènes, produits naturellement par l'organisme) et au xéno-métabolome (i.e. xénobiotiques et leurs produits de biotransformation) ou à l'exposome, idéal pour établir des liens de causalité. L'espèce *M. galloprovincialis* a été choisie comme organisme d'étude en raison des trois intérêts qu'elle cumule : écologique (espèce clé dans le réseau trophique), scientifique (espèce sentinelle, largement impliquée dans des programmes de biosurveillance) et économique (conchyliculture).

*Chapitre 1* – L'étude de la bibliographie a permis, dans un premier temps, de dresser l'état de l'art de la contamination du milieu marin par les produits pharmaceutiques (PP) et le risque qu'ils représentent pour les organismes. Sur cette base, nous nous sommes intéressés à l'antiépileptique carbamazépine (CBZ) décrit comme préoccupant pour l'environnement à cause de sa forte persistance dans le milieu, sa détection fréquente dans les eaux marines et les tissus d'organismes (notamment ceux de *M. galloprovincialis*) et ses effets néfastes avérés sur le vivant. Les mécanismes d'action de la CBZ, pourtant essentiels pour comprendre les effets toxiques observés à un niveau d'organisation biologique supérieur sur les organismes non cibles, sont peu renseignés dans la littérature. L'étude de la relation de cause à effet entre une exposition à la CBZ et la réponse de la moule *M. galloprovincialis*, ainsi que l'étude des métabolites de la CBZ dans les tissus de cet organisme, a constitué le **premier objectif** de cette thèse (abordé dans le Chapitre 2). Dans un second temps, la synthèse bibliographique a permis de mettre en évidence la problématique des expositions multiples. En effet, dans l'environnement un PP ne se trouve pas seul mais co-existe avec d'autres PP ainsi qu'une multitude de contaminants de nature variée. Intégrer progressivement cette complexité dans les études expérimentales apparaît indispensable pour aboutir à une vision de plus en plus réaliste de l'impact des contaminants sur le milieu marin, PP y compris. De telles études étant peu nombreuses sur les organismes marins, le **second objectif** a été d'investiguer les liens de causalité entre l'exposition à un mélange se rapprochant des conditions de contamination environnementale, un effluent de station d'épuration (STEP), et la réponse biologique de la moule *M. galloprovincialis* (abordé dans le Chapitre 3). Enfin, le **troisième objectif** de cette thèse a été d'améliorer la connaissance de l'implication du facteur sexe de *M. galloprovincialis* dans la réponse à une exposition environnementale représentée par l'effluent de STEP (abordé dans le Chapitre 4). Ces organismes étant collectés à l'état sauvage

(nombreux facteurs biologiques inconnus), la variabilité biologique intra-spécifique est élevée, ce qui représente un challenge tant pour le design expérimental de l'exposition que dans l'approche d'analyse des données à mettre en œuvre.

*Chapitre 2* – Afin d'étudier les liens de causalité entre l'exposition à la CBZ et la réponse de la moule *M. galloprovincialis*, une exposition à une concentration environnementale (80 ng/L ; dose faible) et à une concentration plus élevée (8 µg/L ; dose forte) ont été réalisées pendant 3 jours. Pour obtenir une vision plus précise des mécanismes d'action de la CBZ, l'approche métabolomique a été combinée avec une autre approche non-ciblée, sans hypothèse préalable sur les résultats attendus, la protéomique. Cette dernière est capable de renseigner les modifications sous-jacentes, au niveau des protéines, et donc de justifier les modifications observées au niveau des métabolites et des processus cellulaires affectés. Les analyses métabolomiques et protéomiques étant toutes deux effectuées sur les mêmes échantillons, des glandes digestives de moules mâles, une stratégie de fusion des données s'est avérée très pertinente. En effet, les approches statistiques MCUVE-PLS et consensus OPLS-DA ont permis de mettre en évidence des corrélations entre les signatures métaboliques et protéiques à la dose faible comme à la dose forte. A travers ces analyses et différents outils de bioinformatiques (ex. classifications basées sur l'ontologie des gènes ou les bases de données KEGG Pathway et KEGG BRTE, sur-représentation des voies métaboliques), nous avons pu détailler différents processus cellulaires et métaboliques altérés par l'exposition. Cela concerne l'augmentation de la synthèse des protéines, de la dégradation des lipides, des processus de transport et de catabolisme, et une modification du métabolisme des acides aminés et des glucides. La sur-régulation d'enzymes lysosomales comme les cathépsines ou la  $\beta$ -glucuronidase suggère une perturbation des lysosomes et plus particulièrement une modification de la stabilité des membranes lysosomales. Ces résultats sont en accord avec la littérature, dont certaines études ont directement mesuré une altération de la stabilité des membranes lysosomales d'hémocytes prélevés chez *M. galloprovincialis* exposée à la CBZ. Une telle altération pourrait entraîner une libération des enzymes lysosomales hydrolytiques dans le cytosol et induire un stress oxydant, voire la mort cellulaire. Nos résultats suggèrent également une sur-régulation des enzymes peroxysomales et mitochondriales impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras (ex. l'acyl-CoA oxydase, long-chain acyl-CoA synthetase). Si la sur-régulation de ces enzymes se traduit par une augmentation de leur activité, cela pourrait engendrer une prolifération des peroxysomes et générer une quantité trop importante de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ; espèce réactive de l'oxygène). Un tel phénomène inhibe généralement les défenses anti-oxydantes, conduisant à des dégâts des membranes cellulaires, jusqu'à induire la mort cellulaire programmée (apoptose). Nos résultats vont dans ce sens, suite à l'observation d'une sur-modulation de marqueurs

de la peroxydation des lipides membranaires (ex. 4-hydroxynonéal) mais également d'enzymes impliquées dans l'induction de l'apoptose (ex. TNF ligand-like 1, caspase 2, cathepsine B, mitogen-activated protein kinase kinase 1). A notre connaissance, notre étude est la première à avancer des preuves d'une éventuelle prolifération des peroxysomes induites par la CBZ chez des invertébrés. Ces résultats démontrent un état de stress général des cellules de la glande digestive des moules *M. galloprovincialis* induit par la CBZ aux deux doses d'exposition, mais de manière plus marquée à la forte dose. Cela se traduit par une perturbation de l'homéostasie des protéines et des lipides et par l'induction d'un stress oxydant, pouvant engendrer une mort cellulaire programmée. A ce stade d'interprétation des résultats, il est difficile de déterminer un mécanisme d'action spécifique de la CBZ. Cette étude supporte toutefois l'intérêt de combiner les approches métabolomique et protéomique afin de bénéficier de leur complémentarité pour une meilleure compréhension des effets causés par les PP.

*Chapitre 3* – Les résultats présentés dans ce chapitre supportent l'intérêt prometteur de l'approche métabolomique pour étudier les liens de cause à effet entre l'exposition à un mélange complexe de contaminants, représentatif d'une exposition environnementale, et la réponse d'un organisme marin. Un effluent de STEP a été sélectionné, car considéré comme la voie d'entrée principale de nombreux contaminants dans le milieu marin, y compris des PP. Les moules *M. galloprovincialis* ont été exposées 7 jours à l'effluent de STEP, dilué au 1/20<sup>ème</sup> pour se rapprocher des conditions d'exposition environnementales, et préalablement purifié afin de retenir principalement des contaminants organiques, dont les PP, tout en simplifiant l'exposition (exclusion des nutriments et métaux). Dans un premier temps, l'investigation des effets causés par l'effluent de STEP dans la glande digestive des moules mâles a révélé une quantité importante de modifications métaboliques. L'identification de nombreux métabolites a permis de démontrer une altération du métabolisme des acides aminés, des bases puriques et pyrimidiques, du cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs) et de la dopamine, une neurohormone ayant plusieurs fonctions biologiques clés chez les bivalves. Une étude approfondie de la littérature nous a permis de décrire plusieurs processus et fonctions biologiques qui pourraient être altérés par cette exposition suite à la perturbation de ces métabolites et voies métaboliques mises en évidence. Les perturbations concernent le métabolisme énergétique, la synthèse de l'ADN et des ARN, le système immunitaire, l'osmorégulation, la reproduction, ou encore la formation du byssus. Dans un second temps, la composition de l'effluent de STEP a été analysée afin de caractériser l'exposition (ou l'exposome). Nous avons mis en évidence la présence de 38 PP (et certains de leurs métabolites) de classes thérapeutiques variées ainsi que 4 pesticides. De cette manière, nous avons pu émettre des hypothèses quant aux liens entre les effets observés et des contaminants détectés dans l'effluent dont des effets similaires ont été reportés dans la littérature.

Ces hypothèses n'ont pas pu tenir compte, en l'occurrence, des effets synergiques, additifs ou antagonistes susceptibles d'intervenir. Au delà d'apporter des éléments précis sur le risque que représente la contamination du milieu marin par les effluents de STEP, cette étude permet de conclure sur l'intérêt d'inclure l'approche métabolomique dans des programmes de biosurveillance grâce à sa capacité de révéler à la fois des effets toxiques sur les organismes (étude de l'endo-métabolome) et les contaminants exerçant ces effets (étude du xéno-métabolome ou de l'exposome).

*Chapitre 4* – En lien avec l'étude précédente, le quatrième chapitre de cette thèse a été l'opportunité de présenter une stratégie statistique originale, et inédite dans le domaine de l'écotoxicologie, afin de déterminer la contribution du facteur sexe chez *M. galloprovincialis* dans la variabilité métabolique mesurée en réponse à l'exposition au rejet de STEP. Une approche statistique multifactorielle a été appliquée, l'*ANOVA Multiblock OPLS (AMOPLS)*, afin de relier la variabilité mesurée aux facteurs d'étude (le sexe, l'exposition et l'interaction entre ces deux facteurs). C'est donc en combinant la structure du design expérimental et l'analyse multifactorielle des données métabolomiques par l'approche AMOPLS, que nous avons pu répondre à notre question de recherche. L'approche AMOPLS, permettant la décomposition de la variabilité selon les deux facteurs *sexe* et *exposition* ainsi que de l'interaction *sexe × exposition*, a été capable de quantifier la part de chaque facteur et de leur interaction sur la variabilité totale observée. L'AMOPLS a de plus rendu possible l'identification des métabolites contribuant le plus à l'effet de ces facteurs sur la variabilité des données métabolomiques. L'ensemble de ces informations étant résumé dans un seul modèle, l'interprétation des données métabolomiques est d'autant plus facilitée. Malgré la grande variabilité biologique rencontrée dans cette étude, une réponse commune des moules mâles et femelles a pu être évaluée dans un premier temps, avec principalement une modulation des lysophospholipides. Ces modifications pourraient être causées par une dégradation des lipides membranaires induite par un stress oxydant. Dans un second temps, la réponse spécifique à chaque sexe a été déterminée, impliquant à nouveau des lipides polaires, mais modulés différemment selon le sexe. Le contenu lipidique étant connu pour varier entre les moules mâles et femelles, ces différences de modulations observées pourraient concerner des lipides dont l'implication dans des processus biologiques diffèrent entre les deux sexes. Au regard de la contribution importante des lipides mise en avant par le modèle dans la réponse des moules mâles et femelles à l'exposition au rejet de STEP, une analyse lipidomique serait très pertinente pour compléter ces résultats. De plus, le modèle AMOPLS a également mis en évidence une modulation spécifique de la voie de la kynurénine chez les mâles, pouvant indiquer une perturbation du métabolisme énergétique et du système immunitaire, tandis que ces altérations n'ont pas été observées chez les femelles. D'une manière générale, cette étude souligne l'intérêt d'une telle approche statistique pour traiter et interpréter les données métabolomiques dans un contexte

écotoxicologique, d'autant plus quand l'organisme d'étude est une espèce sauvage dont il peut être difficile d'associer la variabilité observée aux facteurs d'étude.

*Perspectives* – Les différentes études menées dans le cadre de cette thèse se sont confrontées à une barrière commune, l'élucidation structurale et l'identification des métabolites. En effet, malgré la présence d'une banque de standards analytiques interne au laboratoire d'environ 300 métabolites, moins de 10 % des signaux modulés par les expositions ont été formellement identifiés. Une majorité des signaux reste inconnue ou seulement annotée de manière putative. Pour une vision plus complète des perturbations métaboliques, il serait pertinent d'investir des efforts dans la caractérisation de ces signaux. La construction de réseaux de similarités spectrales, via GNPS et Cytoscape par exemple, serait une piste d'amélioration de ces travaux. Cette difficulté à identifier les métabolites de la moule *M. galloprovincialis* relève également de la méconnaissance de son métabolome. Il serait donc intéressant d'étendre cette caractérisation des métabolites modulés à l'ensemble du métabolome de cet organisme. Une partie de ce travail est en cours de développement au sein du laboratoire afin de définir le niveau basal des métabolites (disponibles dans notre banque de standards analytiques) dans différents tissus (glandes digestives, branchies, pied, tissus mous) de plusieurs individus prélevés directement dans le milieu, en faisant attention bien évidemment de distinguer les mâles des femelles.

Les approches –omiques appliquées dans cette thèse ont permis de générer de nombreuses hypothèses quant aux effets que les perturbations métaboliques pourraient entraîner sur l'organisme (ex. perturbation de la reproduction, du système immunitaire, diminution de la force du byssus, etc.). Ces hypothèses peuvent donc servir de base pour de nouvelles études, qu'il serait intéressant de tester par des expérimentations et analyses complémentaires. Nous pourrions par exemple nous inspirer de l'étude d'Ericson et al. (2010) pour la mesure de l'abondance et de la force du byssus en réponse à une exposition. Par ailleurs, l'investigation des effets sur le système immunitaire pourrait d'une part être ciblée sur les hémocytes, par les mesures de la viabilité cellulaire et de la stabilité des membranes lysosomales (Rocha et al., 2014). Une altération du système immunitaire pouvant fragiliser la résistance des organismes face à des pathogènes, il serait pertinent d'autre part, de réaliser ces mêmes mesures chez des organismes qui, en plus d'être exposés au(x) contaminant(s), seraient challengés par une bactérie du genre *Vibrio*, responsable d'épisodes de mortalité chez des bivalves marins (Liu et al., 2014).

Enfin, pour compléter l'étude de la relation de cause à effet selon la complexité des différents niveaux d'exposition (molécule seule, mixture de molécules connues, mélange complexe), il serait pertinent d'étudier les effets d'une mixture de PP, incluant la CBZ. Cette perspective est actuellement explorée au laboratoire, où une exposition de moules *M. galloprovincialis* à une mixture de PP (CBZ, diclofénac et venlafaxine) a été réalisée début mars 2020. Les effets de chacun de ces PP ayant déjà

été investigués séparément au sein du laboratoire par l'approche métabolomique, cette étude permettra de déterminer des possibles tendances synergiques, additives ou antagonistes entre ces trois PP. Des approches statistiques multi-tableaux pourraient être envisagées afin de comparer les empreintes métaboliques générées au cours de ces différentes expérimentations et de mettre en évidence des signatures métaboliques spécifiques de ces PP, ou non, dans les empreintes métaboliques issues de l'exposition au mélange.

De nombreuses questions restent ouvertes dans la caractérisation des effets des expositions chroniques à faibles doses auxquelles les populations sauvages de moules *M. galloprovincialis* sont soumises. En abordant les effets d'une substance seule, puis d'un mélange témoin de la contamination urbaine, nous avons mis en évidence l'intérêt des analyses multi-omiques (métabolomique et protéomique). La combinaison des approches métabolomique et protéomique, a révélé de nouvelles voies moléculaires et processus cellulaires associées aux effets d'un PP seul, la CBZ. Quant aux analyses métabolomiques, elles ont pu caractériser l'implication du facteur sexe chez la moule méditerranéenne, observable au niveau de la glande digestive, en réponse à une exposition à un effluent de STEP. De plus, l'approche métabolomique a identifié chez les organismes mâles de nombreuses voies métaboliques perturbées par l'exposition au rejet de STEP, susceptibles d'entraîner des effets néfastes à l'échelle de l'organisme.

L'application des approches multi-omiques apparaît incontournable dans le domaine de l'écotoxicologie pour une connaissance plus précise des effets des contaminants présents à de faibles concentrations dans l'environnement sur des organismes sauvages. De surcroît, les approches multi-omiques sont d'un intérêt particulier pour établir des liens entre des effets moléculaires précoces observés et des effets transposables à l'échelle des individus, de la population et des communautés (concept de l'*Adverse Outcome Pathways*). De telles connaissances sur les substances chimiques sont indispensables pour une évaluation et une gestion des risques plus juste.

# Références bibliographiques

---

- Abdelhafidh, K., Ali, M., Hassen, K., Badreddine, S., Jaume, A., Sandra, P., Ethel, E., Damià, B., Hamouda, B., Ezzeddine, M., **2018**. Uptake and metabolism of carbamazepine (CBZ) by clam *Ruditapes decussatus* and its effects in biochemical responses. *Xenobiotica* 48, 727–733. <https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1354268>
- Ackerman, J.D., Nishizaki, M.T., **2004**. The effect of velocity on the suspension feeding and growth of the marine mussels *Mytilus trossulus* and *M. californianus*: implications for niche separation. *J. Mar. Syst., Biophysical Factors Affecting the Growth and Survival of Aquatic Organisms* 49, 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2003.06.004>
- Adams, S.M., **2003**. Establishing Causality between Environmental Stressors and Effects on Aquatic Ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 9, 17–35. <https://doi.org/10.1080/713609850>
- Aguirre-Martínez, Gabriela V., Buratti, S., Fabbr, E., DelValls, A.T., Martín-Díaz, M.L., **2013**. Using lysosomal membrane stability of haemocytes in *Ruditapes philippinarum* as a biomarker of cellular stress to assess contamination by caffeine, ibuprofen, carbamazepine and novobiocin. *J. Environ. Sci. China* 25, 1408–1418. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(12\)60207-1](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(12)60207-1)
- Aguirre-Martínez, G. V., Del Valls, T.A., Martín-Díaz, M.L., **2013**. Early responses measured in the brachyuran crab *Carcinus maenas* exposed to carbamazepine and novobiocin: Application of a 2-tier approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 97, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.002>
- Aguirre-Martínez, G.V., DelValls, A.T., Laura Martín-Díaz, M., **2015**. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 120, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.036>
- Albani, F., Riva, R., Baruzzi, A., **1995**. Carbamazepine clinical pharmacology: a review. *Pharmacopsychiatry* 28, 235–244. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979609>
- Albentosa, M., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., **1996**. Fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* spat fed on different microalgae diets. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 113, 113–119. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)02041-1](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)02041-1)
- Albóniga, O.E., González, O., Alonso, R.M., Xu, Y., Goodacre, R., **2020**. Optimization of XCMS parameters for LC–MS metabolomics: an assessment of automated versus manual tuning and its effect on the final results. *Metabolomics* 16, 14. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-1636-9>
- Ali, A.M., Rønning, H.T., Alarif, W., Kallenborn, R., Al-Lihaibi, S.S., **2017**. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in effluent-dominated Saudi Arabian coastal waters of the Red Sea. *Chemosphere* 175, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.095>
- Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., **2018a**. Effects of single and combined exposure of pharmaceutical drugs (carbamazepine and cetirizine) and a metal (cadmium) on the biochemical responses of *R. philippinarum*. *Aquat. Toxicol.* 198, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.011>
- Almeida, A., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., **2014**. Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 156, 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.002>
- Almeida, Â., Freitas, R., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., **2015**. Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam *Ruditapes philippinarum*. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 172–173, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.004>
- Almeida, Â., Freitas, R., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Campos, B., Barata, C., **2018b**. Effects of carbamazepine and cetirizine under an ocean acidification scenario on the biochemical and transcriptome responses of the clam *Ruditapes philippinarum*. *Environ. Pollut.* 235, 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.121>
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., **2000**. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2341–2347. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190926>

- Alvarez-Muñoz, D., Huerta, B., Fernandez-Tejedor, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., **2015a**. Multi-residue method for the analysis of pharmaceuticals and some of their metabolites in bivalves. *Talanta* 136, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.035>
- Alvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A.L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., Van den Heuvel, F., Kotterman, M., Marques, A., Barceló, D., **2015b**. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environ. Res., Non-regulated environmental contaminants in seafood: contributions of the ECsafeSEAFOOD EU project* 143, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.09.018>
- Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D., **2010**. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *TrAC Trends Anal. Chem.* 29, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.003>
- Ambrósio, A.F., Soares-da-Silva, P., Carvalho, C.M., Carvalho, A.P., **2002**. Mechanisms of Action of Carbamazepine and Its Derivatives, Oxcarbazepine, BIA 2-093, and BIA 2-024. *Neurochem. Res.* 27, 121–130. <https://doi.org/10.1023/A:1014814924965>
- Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Romeo, M., **2011**. Tolerance to Environmental Contaminants. CRC Press.
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., **2010**. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 730–741. <https://doi.org/10.1002/etc.34>
- Armengaud, J., Trapp, J., Pible, O., Geffard, O., Chaumot, A., Hartmann, E.M., **2014**. Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. *J. Proteomics, Special Issue: Proteomics of non-model organisms* 105, 5–18. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.007>
- Arnot, J.A., Gobas, F.A., **2006**. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14, 257–297. <https://doi.org/10.1139/a06-005>
- Arpin-Pont, L., Bueno, M.J.M., Gomez, E., Fenet, H., **2016**. Occurrence of PPCPs in the marine environment: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4978–4991. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3617-x>
- Ayano, G., **2016**. Bipolar Disorders and Carbamazepine: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Therapeutic Effects and Indications of Carbamazepine: Review of Articles. *Clin. Neuropsychol. Open Access* 1, 1–5. <https://doi.org/10.4172/2472-095X.1000112>
- Babarro, J.M.F., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., **2000**. Feeding behavior of seed mussel *Mytilus galloprovincialis*: Environmental parameters and seed origin.
- Backhaus, T., **2014**. Medicines, shaken and stirred: a critical review on the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130585. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0585>
- Backhaus, T., Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M., Grimme, L.H., **2000**. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2348–2356. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190927>
- Baena-Nogueras, R.M., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A., **2017**. Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation. *Sci. Total Environ.* 590–591, 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.015>
- Bahamonde, P.A., Feswick, A., Isaacs, M.A., Munkittrick, K.R., Martyniuk, C.J., **2016**. Defining the role of omics in assessing ecosystem health: Perspectives from the Canadian environmental monitoring program. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 20–35. <https://doi.org/10.1002/etc.3218>
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., **2011**. Gene Expression Rhythms in the Mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an Annual Cycle. *PLOS ONE* 6, e18904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018904>
- Banni, M., Sforzini, S., Franzellitti, S., Oliveri, C., Viarengo, A., Fabbri, E., **2015**. Molecular and Cellular Effects Induced in *Mytilus galloprovincialis* Treated with Oxytetracycline at Different Temperatures. *PLOS ONE* 10, e0128468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128468>

- Barnes, S., Benton, H.P., Casazza, K., Cooper, S.J., Cui, X., Du, X., Engler, J., Kabarowski, J.H., Li, S., Pathmasiri, W., Prasain, J.K., Renfrow, M.B., Tiwari, H.K., **2016**. Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data: Design and execution of a metabolomics experiment. *J. Mass Spectrom.* 51, 461–475. <https://doi.org/10.1002/jms.3782>
- Barra Caracciolo, A., Topp, E., Grenni, P., **2015**. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *J. Pharm. Biomed. Anal., SI: Analytical approaches* 106, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.040>
- Barragán, J.M., de Andrés, M., **2015**. Analysis and trends of the world's coastal cities and agglomerations. *Ocean Coast. Manag.* 114, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2015.06.004>
- Barupal, D.K., Fan, S., Fiehn, O., **2018**. Integrating bioinformatics approaches for a comprehensive interpretation of metabolomics datasets. *Curr. Opin. Biotechnol., Analytical Biotechnology* 54, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.010>
- Barupal, D.K., Fiehn, O., **2017**. Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15231-w>
- Batchu, S.R., Panditi, V.R., O'Shea, K.E., Gardinali, P.R., **2014**. Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation: implications for their environmental fate. *Sci. Total Environ.* 470–471, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.057>
- Bayen, S., Zhang, H., Desai, M.M., Ooi, S.K., Kelly, B.C., **2013**. Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: Influence of hydrodynamics and physical–chemical properties. *Environ. Pollut.* 182, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.028>
- Bayne, B.L., **2009**. Marine mussels: their ecology and physiology. *Int. Biol. Programme.*
- Bayne, B.L., **1965**. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia* 2, 1–47. <https://doi.org/10.1080/00785326.1965.10409596>
- Bazinet, R.P., Rao, J.S., Chang, L., Rapoport, S.I., Lee, H.-J., **2006**. Chronic Carbamazepine Decreases the Incorporation Rate and Turnover of Arachidonic Acid but Not Docosahexaenoic Acid in Brain Phospholipids of the Unanesthetized Rat: Relevance to Bipolar Disorder. *Biol. Psychiatry* 59, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.07.024>
- Beale, D.J., Pinu, F.R., Kouremenos, K.A., Poojary, M.M., Narayana, V.K., Boughton, B.A., Kanojia, K., Dayalan, S., Jones, O.A.H., Dias, D.A., **2018**. Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics* 14, 152. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1449-2>
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.-E., Park, H.-S., **2011**. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci. Total Environ.* 409, 4351–4360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.015>
- Beisken, S., Eiden, M., Salek, R.M., **2015**. Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 15, 97–109. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.974562>
- Beninger, P.G., Le Pennec, G., Le Pennec, M., **2003**. Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol. Bull.* 205, 83–92. <https://doi.org/10.2307/1543448>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., **1995**. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bennet-Clark, H.C., **1976**. Marine mussels: their ecology and physiology. *International Biological Programme 10* Edited by B. L. Bayne, Cambridge University Press, 1976. Pp. xvii+506. £22.00. *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 61, 359–359. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1976.sp002367>

- Benotti, M.J., Brownawell, B.J., **2009**. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environ. Pollut.* 157, 994–1002. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.009>
- Bernini, P., Bertini, I., Luchinat, C., Nincheri, P., Staderini, S., Turano, P., **2011**. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J. Biomol. NMR* 49, 231–243. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9489-1>
- Bertilsson, L., **1978**. Clinical Pharmacokinetics of Carbamazepine. *Clin. Pharmacokinet.* 3, 128–143. <https://doi.org/10.2165/00003088-197803020-00003>
- Beutler, A.S., Li, S., Nicol, R., Walsh, M.J., **2005**. Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases. *Life Sci.* 76, 3107–3115. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.01.003>
- Blaženović, I., Kind, T., Ji, J., Fiehn, O., **2018**. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. *Metabolites* 8, 31. <https://doi.org/10.3390/metabo8020031>
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., **1959**. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Blum, C.B., Mousavi, F., Emili, A., **2018**. Single-platform ‘multi-omic’ profiling: unified mass spectrometry and computational workflows for integrative proteomics–metabolomics analysis. *Mol. Omics* 14, 307–319. <https://doi.org/10.1039/C8MO00136G>
- Boccard, J., Rutledge, D.N., **2013**. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. *Anal. Chim. Acta* 769, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.022>
- Boeing, D.W., **1999**. An Evaluation of Bivalves as Biomonitors of Heavy Metals Pollution in Marine Waters. *Environ. Monit. Assess.* 55, 459–470. <https://doi.org/10.1023/A:1005995217901>
- Boillot, C., Martinez Bueno, M.J., Munaron, D., Le Dreau, M., Mathieu, O., David, A., Fenet, H., Casellas, C., Gomez, E., **2015**. In vivo exposure of marine mussels to carbamazepine and 10-hydroxy-10,11-dihydro-carbamazepine: Bioconcentration and metabolization. *Sci. Total Environ.* 532, 564–570. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.067>
- Bolton, E., Wang, Y., Thiessen, P.A., Bryant, S.H., **2008**. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Chapter 12.
- Bongaarts, J., **2019**. IPBES, **2019**. Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. *Popul. Dev. Rev.* 45, 680–681. <https://doi.org/10.1111/padr.12283>
- Bonnefille, B., Arpin-Pont, L., Gomez, E., Fenet, H., Courant, F., **2017**. Metabolic profiling identification of metabolites formed in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) after diclofenac exposure. *Sci. Total Environ.* 583, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.063>
- Bouchard, B., Gagné, F., Fortier, M., Fournier, M., **2009**. An in-situ study of the impacts of urban wastewater on the immune and reproductive systems of the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 150, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.04.002>
- Bougrier, S., Hawkins, A.J.S., Héral, M., **1997**. Preingestive selection of different microalgal mixtures in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*, analysed by flow cytometry. *Aquaculture* 150, 123–134. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01457-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01457-3)
- Boxall, A.B.A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Verslycke, T., Ankley, G.T., Beazley, K.F., Belanger, S.E., Berninger, J.P., Carriquiriborde, P., Coors, A., Deleo, P.C., Dyer, S.D., Ericson, J.F., Gagné, F., Giesy, J.P., Guin, T., Hallstrom, L., Karlsson, M.V., Larsson, D.G.J., Lazorchak, J.M., Mastrocco, F., McLaughlin, A., McMaster, M.E., Meyerhoff, R.D., Moore, R., Parrott, J.L., Snape, J.R., Murray-Smith, R., Servos, M.R., Sibley, P.K., Straub, J.O., Szabo, N.D., Topp, E., Tetreault, G.R., Trudeau, V.L., Van Der Kraak, G., **2012**. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ. Health Perspect.* 120, 1221–1229. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104477>

- Braby, C.E., Somero, G.N., **2006**. Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). *J. Exp. Biol.* 209, 2554–2566. <https://doi.org/10.1242/jeb.02259>
- Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R.M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., Escher, B.I., Mark Hewitt, L., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jonker, W., Kool, J., Lamoree, M., Muschket, M., Neumann, S., Rostkowski, P., Ruttkies, C., Schollee, J., Schymanski, E.L., Schulze, T., Seiler, T.-B., Tindall, A.J., De Aragão Umbuzeiro, G., Vrana, B., Krauss, M., **2016**. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Sci. Total Environ.* 544, 1073–1118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.102>
- Brandts, I., Teles, M., Gonçalves, A.P., Barreto, A., Franco-Martinez, L., Tvarijonaviciute, A., Martins, M.A., Soares, A.M.V.M., Tort, L., Oliveira, M., **2018**. Effects of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Sci. Total Environ.* 643, 775–784. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.257>
- Breton, H., Cociglio, M., Bressolle, F., Peyriere, H., Blayac, J.P., Hillaire-Buys, D., **2005**. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine, oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 828, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.09.019>
- Brockmeier, E.K., Hodges, G., Hutchinson, T.H., Butler, E., Hecker, M., Tollefsen, K.E., Garcia-Reyero, N., Kille, P., Becker, D., Chipman, K., Colbourne, J., Collette, T.W., Cossins, A., Cronin, M., Graystock, P., Gutsell, S., Knapen, D., Katsiadaki, I., Lange, A., Marshall, S., Owen, S.F., Perkins, E.J., Plaistow, S., Schroeder, A., Taylor, D., Viant, M., Ankley, G., Falciani, F., **2017**. The Role of Omics in the Application of Adverse Outcome Pathways for Chemical Risk Assessment. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx097>
- Bulling, M.T., Hicks, N., Murray, L., Paterson, D.M., Raffaelli, D., White, P.C.L., Solan, M., **2010**. Marine biodiversity–ecosystem functions under uncertain environmental futures. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 2107–2116. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0022>
- Bundy, J.G., Davey, M.P., Viant, M.R., **2009**. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5, 3–21. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0152-0>
- Burgess, R.M., Ho, K.T., Brack, W., Lamoree, M., **2013**. Effects-directed analysis (EDA) and toxicity identification evaluation (TIE): Complementary but different approaches for diagnosing causes of environmental toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1935–1945. <https://doi.org/10.1002/etc.2299>
- Cajaraville, M.P., Pal, S.G., **1995**. Morphofunctional Study of the Haemocytes of the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis* with Emphasis on the Endolysosomal Compartment. *Cell Struct. Funct.* 20, 355–367. <https://doi.org/10.1247/csf.20.355>
- Caliman, F.A., Gavrilesco, M., **2009**. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – A Review. *CLEAN – Soil Air Water* 37, 277–303. <https://doi.org/10.1002/clen.200900038>
- Calisto, V., Domingues, M.R.M., Erny, G.L., Esteves, V.I., **2011**. Direct photodegradation of carbamazepine followed by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. *Water Res.* 45, 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.037>
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., **2002**. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 57, 469–476. <https://doi.org/10.1002/jemt.10100>
- Cappello, T., Mauceri, A., Corsaro, C., Maisano, M., Parrino, V., Lo Paro, G., Messina, G., Fasulo, S., **2013**. Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.019>
- Cappello, T., Giannetto, A., Parrino, V., Maisano, M., Oliva, S., De Marco, G., Guerriero, G., Mauceri, A., Fasulo, S., **2018**. Baseline levels of metabolites in different tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia: Mytilidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 26, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.03.005>

- Carballal, M.J., López, C., Azevedo, C., Villalba, A., **1997**. Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 96–105. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4670>
- Carriker, M.R., **1961**. Interrelation of functional morphology, behavior, and autecology in early stages of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 77, 168–241.
- Castro, L.F.C., Melo, C., Guillot, R., Mendes, I., Queirós, S., Lima, D., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., **2007**. The estrogen receptor of the gastropod *Nucella lapillus*: modulation following exposure to an estrogenic effluent? *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 84, 465–468. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.008>
- Cavill, R., Jennen, D., Kleinjans, J., Briedé, J.J., **2016**. Transcriptomic and metabolomic data integration. *Brief. Bioinform.* 17, 891–901. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv090>
- Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Sørensen, H., Streibig, J.C., **2007**. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 149–156. <https://doi.org/10.1897/06-196r.1>
- Challis, J.K., Hanson, M.L., Friesen, K.J., Wong, C.S., **2014**. A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: defining our current understanding and identifying knowledge gaps. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 672–696. <https://doi.org/10.1039/C3EM00615H>
- Chase, J.M., Blowes, S.A., Knight, T.M., Gerstner, K., May, F., **2020**. Ecosystem decay exacerbates biodiversity loss with habitat loss. *Nature* 584, 238–243. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2531-2>
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., **2019a**. Acute and Chronic Toxicity of Carbamazepine on the Release of Chitinase, Molting, and Reproduction in *Daphnia similis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 209. <https://doi.org/10.3390/ijerph16020209>
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., Liang, X., Martyniuk, C.J., **2019b**. Carbamazepine disrupts molting hormone signaling and inhibits molting and growth of *Eriocheir sinensis* at environmentally relevant concentrations. *Aquat. Toxicol.* 208, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.010>
- Chen, H., Zha, J., Liang, X., Li, J., Wang, Z., **2014**. Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 155, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.001>
- Cheng, J., Lan, W., Zheng, G., Gao, X., **2018**. Metabolomics: A High-Throughput Platform for Metabolite Profile Exploration. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1754, 265–292. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7717-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7717-8_16)
- Cheng, T.C., Rifkin, E., **1970**. Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. *Spec. Publ. Am. Fish. Soc.* 443–496.
- Chiffre, A., Degiorgi, F., Buleté, A., Spinner, L., Badot, P.-M., **2016**. Occurrence of pharmaceuticals in WWTP effluents and their impact in a karstic rural catchment of Eastern France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 25427–25441. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7751-5>
- Chong, J., Wishart, D.S., Xia, J., **2019**. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 68, e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Chong, J., Xia, J., **2017**. Computational Approaches for Integrative Analysis of the Metabolome and Microbiome. *Metabolites* 7, 62. <https://doi.org/10.3390/metabo7040062>
- Clara, M., Strenn, B., Kreuzinger, N., **2004**. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* 38, 947–954. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.058>
- Clements, W.H., Rohr, J.R., **2009**. Community responses to contaminants: using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1789–1800. <https://doi.org/10.1897/09-140.1>

- Cleuvers, M., **2003**. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.*, Hot Spot Pollutants: Pharmaceuticals in the Environment 142, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- Collado, N., Rodriguez-Mozaz, S., Gros, M., Rubirola, A., Barceló, D., Comas, J., Rodriguez-Roda, I., Buttiglieri, G., **2014**. Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. *Environ. Pollut.* 185, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.040>
- Courant, F., Antignac, J.-P., Dervilly-Pinel, G., Le Bizec, B., **2014**. Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics* 14, 2369–2388. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400255>
- Crain, C.M., Halpern, B.S., Beck, M.W., Kappel, C.V., **2009**. Understanding and Managing Human Threats to the Coastal Marine Environment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1162, 39–62. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04496.x>
- Cranford, P.J., Ward, J.E., Shumway, S.E., **2011**. Bivalve Filter Feeding: Variability and Limits of the Aquaculture Biofilter, in: *Shellfish Aquaculture and the Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 81–124. <https://doi.org/10.1002/9780470960967.ch4>
- Cruz, D., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., **2016**. Caffeine impacts in the clam *Ruditapes philippinarum*: Alterations on energy reserves, metabolic activity and oxidative stress biomarkers. *Chemosphere* 160, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.068>
- Damania, R., Desbureaux, S., Rodella, A.-S., Russ, J., Zaveri, E., **2019**. Quality Unknown: The Invisible Water Crisis. The World Bank. <https://doi.org/10.1596/978-1-4648-1459-4>
- Daughton, C.G., **2004**. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environ. Impact Assess. Rev.*, Environment and Health: new answers, new questions. 24, 711–732. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2004.06.003>
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., **1999**. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107, 907.
- David, A., Lange, A., Abdul-Sada, A., Tyler, C.R., Hill, E.M., **2017**. Disruption of the Prostaglandin Metabolome and Characterization of the Pharmaceutical Exposome in Fish Exposed to Wastewater Treatment Works Effluent As Revealed by Nanoflow-Nanospray Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Environ. Sci. Technol.* 51, 616–624. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04365>
- de los Ríos, A., Pérez, L., Ortiz-Zarragoitia, M., Serrano, T., Barbero, M.C., Echavarri-Erasun, B., Juanes, J.A., Orbea, A., Cajaraville, M.P., **2013**. Assessing the effects of treated and untreated urban discharges to estuarine and coastal waters applying selected biomarkers on caged mussels. *Mar. Pollut. Bull.* 77, 251–265. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.09.050>
- de Villiers, A., Lestremau, F., Szucs, R., Gélébart, S., David, F., Sandra, P., **2006**. Evaluation of ultra performance liquid chromatography: Part I. Possibilities and limitations. *J. Chromatogr. A* 1127, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.071>
- de Zwaan, A.; Mathieu, M., **1992**. Cellular biochemistry and endocrinology, in: Gosling, E. (Ed.) *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. pp. 223-307
- Defossez, J.-M., Hawkins, A.J.S., **1997**. Selective feeding in shellfish: size-dependent rejection of large particles within pseudofaeces from *Mytilus edulis*, *Ruditapes philippinarum* and *Tapes decussatus*. *Mar. Biol.* 129, 139–147. <https://doi.org/10.1007/s002270050154>
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., **1994**. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–172. <https://doi.org/10.1007/BF00117081>
- Dernekbası, S., Öksüz, A., Çelik, M.Y., Karayücel, I., Karayücel, S., **2015**. The Fatty Acid Composition of Cultured Mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck 1819) in Offshore Longline System in the Black Sea. *J. Aquac. Mar. Biol. Volume 2*. <https://doi.org/10.15406/jamb.2015.02.00049>
- Di Poi, C., Bidel, F., Dickel, L., Bellanger, C., **2014**. Cryptic and biochemical responses of young cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to environmentally relevant concentrations of fluoxetine. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 151, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.026>

- Di Poi, C., Darmaillacq, A.-S., Dickel, L., Boulouard, M., Bellanger, C., **2013**. Effects of perinatal exposure to waterborne fluoxetine on memory processing in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 132–133, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.02.004>
- Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P., Cajaraville, M.P., **2004**. Cytochemical and Histochemical Aspects of the Digestive Gland Cells of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in Relation to Function. *J. Mol. Histol.* 35, 501–509. <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000045952.87268.76>
- Ding, T., Lin, K., Yang, B., Yang, M., Li, J., **2019**. Toxic effects and metabolic fate of carbamazepine in diatom *Navicula* sp. as influenced by humic acid and nitrogen species. *J. Hazard. Mater.* 378, 120763. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120763>
- Díaz-Cruz, M.S., López de Alda, M.J., Barceló, D., **2003**. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC Trends Anal. Chem.* 22, 340–351. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00603-4)
- Domingo-Almenara, X., Siuzdak, G., **2020**. Metabolomics Data Processing Using XCMS. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2104, 11–24. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_2)
- Douet D.-G., Le Bris H., Giraud E. Environmental aspects of drug and chemical use in aquaculture: an overview. In: Rogers C. (ed.), Basurco B. (ed.). *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*. Zaragoza: CIHEAM, **2009**. p. 105-126
- Dunn, W.B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J.D., Halsall, A., Haselden, J.N., Nicholls, A.W., Wilson, I.D., Kell, D.B., Goodacre, R., **2011**. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 6, 1060–1083. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>
- Dunn, W.B., Ellis, David.I., **2005**. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends Anal. Chem.* 24, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>
- Eades, C., Waring, C.P., **2010**. The effects of diclofenac on the physiology of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Environ. Res.* 69 Suppl, S46-48. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.11.001>
- Eggen, R.I.L., Behra, R., Burkhardt-Holm, P., Escher, B.I., Schweigert, N., **2004**. Peer Reviewed: Challenges in Ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 38, 58A-64A. <https://doi.org/10.1021/es040349c>
- Ellis, R.P., Spicer, J.I., Byrne, J.J., Sommer, U., Viant, M.R., White, D.A., Widdicombe, S., **2014**. 1H NMR Metabolomics Reveals Contrasting Response by Male and Female Mussels Exposed to Reduced Seawater pH, Increased Temperature, and a Pathogen. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7044–7052. <https://doi.org/10.1021/es501601w>
- Ericson, H., Thorsén, G., Kumblad, L., **2010**. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquat. Toxicol.* 99, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.017>
- Escher, B.I., Hermens, J.L.M., **2002**. Modes of Action in Ecotoxicology: Their Role in Body Burdens, Species Sensitivity, QSARs, and Mixture Effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4201–4217. <https://doi.org/10.1021/es015848h>
- Fabbri, E., Franzellitti, S., **2016a**. Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 799–812. <https://doi.org/10.1002/etc.3131>
- Fabbri, E., Franzellitti, S., **2016b**. Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 799–812. <https://doi.org/10.1002/etc.3131>
- Fabbri, R., Montagna, M., Balbi, T., Raffo, E., Palumbo, F., Canesi, L., **2014**. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 99, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.05.007>

- Faggio, C., Tsarpali, V., Dailianis, S., **2018**. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: An overview. *Sci. Total Environ.* 636, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.264>
- Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R.C., Nishijima, M., Raetz, C.R.H., Shimizu, T., Spener, F., Meer, G. van, Wakelam, M.J.O., Dennis, E.A., **2009**. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* 50, S9–S14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>
- Fang, T.-H., Nan, F.-H., Chin, T.-S., Feng, H.-M., **2012**. The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1435–1444. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.04.008>
- Fasulo, S., Iacono, F., Cappello, T., Corsaro, C., Maisano, M., D’Agata, A., Giannetto, A., De Domenico, E., Parrino, V., Lo Paro, G., Mauceri, A., **2012**. Metabolomic investigation of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) caged in aquatic environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.001>
- Fearman, J.-A., Bolch, C.J.S., Moltschaniwskyj, N.A., **2009**. Energy Storage and Reproduction in Mussels, *Mytilus galloprovincialis*: The Influence of Diet Quality. *J. Shellfish Res.* 28, 305–312. <https://doi.org/10.2983/035.028.0212>
- Fenet, H., Arpin-Pont, L., Vanhoutte-Brunier, A., Munaron, D., Fiandrino, A., Martínez Bueno, M.-J., Boillot, C., Casellas, C., Mathieu, O., Gomez, E., **2014**. Reducing PEC uncertainty in coastal zones: A case study on carbamazepine, oxcarbazepine and their metabolites. *Environ. Int.* 68, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.025>
- Feng, J., Liu, A., Zhu, W., **2017**. Toxic Effects of Atrazine on Reproductive and Immune Systems in Animal Models. *Reprod. Syst. Sex. Disord.* 06. <https://doi.org/10.4172/2161-038X.1000208>
- Feng, J., Zhang, Q., Zhou, Y., Yu, S., Hong, L., Zhao, S., Yang, J., Wan, H., Xu, G., Zhang, Y., Li, C., **2018**. Integration of Proteomics and Metabolomics Revealed Metabolite–Protein Networks in ACTH-Secreting Pituitary Adenoma. *Front. Endocrinol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00678>
- Fent, K., Weston, A., Caminada, D., **2006**. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., **1995**. Chronic toxicity of diazinon to *daphnia magna*: Effects on survival, reproduction and growth. *Toxicol. Environ. Chem.* 49, 25–32. <https://doi.org/10.1080/02772249509358173>
- Fernández-Casalderrey, A., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., **1994**. Effect of sublethal concentrations of pesticides on the feeding behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 27, 82–89.
- Fiehn, O., **2002**. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155–171. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Field, C.B., Barros, V.R., Intergovernmental Panel on Climate Change (Eds.), **2014**. Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability: Working Group II contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, New York, NY.
- Figueras, A., Moreira, R., Sendra, M., Novoa, B., **2019**. Genomics and immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* in a changing environment. *Fish Shellfish Immunol.* 90, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.064>
- Filgueira, R., Fernández-Reiriz, M.J., Labarta, U., **2009**. Clearance rate of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. I. Response to extreme chlorophyll ranges. *Cienc. Mar.* 35, 405–417.
- Flaherty, C.M., Dodson, S.I., **2005**. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.016>
- Fong, P.P., Noordhuis, R., Ram, J.L., **1993**. Dopamine reduces intensity of serotonin-induced spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (pallas). *J. Exp. Zool.* 266, 79–83.

- Forsberg, E.M., Huan, T., Rinehart, D., Benton, H.P., Warth, B., Hilmers, B., Siuzdak, G., **2018**. Data processing, multi-omic pathway mapping, and metabolite activity analysis using XCMS Online. *Nat. Protoc.* 13, 633–651. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.151>
- Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.Ø., Nielsen, J., **2003**. Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. *Genome Res.* 13, 244–253. <https://doi.org/10.1101/gr.234503>
- Franzellitti, S., Balbi, T., Montagna, M., Fabbri, R., Valbonesi, P., Fabbri, E., Canesi, L., **2019**. Phenotypical and molecular changes induced by carbamazepine and propranolol on larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 234, 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.045>
- Franzellitti, S., Buratti, S., Capolupo, M., Du, B., Haddad, S.P., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., Fabbri, E., **2014**. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquat. Toxicol., Antidepressants in the Aquatic Environment* 151, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.016>
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Fabbri, E., **2013**. The mode of action (MOA) approach reveals interactive effects of environmental pharmaceuticals on *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 140–141, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.005>
- Freitas, R., Almeida, Â., Calisto, V., Velez, C., Moreira, A., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Wrona, F.J., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., **2016**. The impacts of pharmaceutical drugs under ocean acidification: New data on single and combined long-term effects of carbamazepine on *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ.* 541, 977–985. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.138>
- Freitas, R., Almeida, Â., Calisto, V., Velez, C., Moreira, A., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., **2015a**. 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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.023>
- Freitas, R., Almeida, Â., Pires, A., Velez, C., Calisto, V., Schneider, R.J., Esteves, V.I., Wrona, F.J., Figueira, E., Soares, A.M.V.M., **2015b**. The effects of carbamazepine on macroinvertebrate species: Comparing bivalves and polychaetes biochemical responses. *Water Res.* 85, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.003>
- Gabbott, P.A., Bayne, B.L., **1973**. Biochemical Effects of Temperature and Nutritive Stress on *Mytilus Edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 53, 269–286. <https://doi.org/10.1017/S0025315400022268>
- Gagné, F., Blaise, C., Fournier, M., Hansen, P.D., **2006**. Effects of selected pharmaceutical products on phagocytic activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 143, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.01.008>
- Gagné, F., Blaise, C., Hellou, J., **2004**. Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primary-treated municipal effluent plume for 1 year. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 138, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.04.006>
- Gagné, F., Cejka, P., André, C., Hausler, R., Blaise, C., **2007**. Neurotoxicological effects of a primary and ozonated treated wastewater on freshwater mussels exposed to an experimental flow-through system. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 460–470. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.006>
- Gagnebin, Y., Tonoli, D., Lescuyer, P., Ponte, B., de Seigneux, S., Martin, P.-Y., Schappler, J., Boccard, J., Rudaz, S., **2017**. Metabolomic analysis of urine samples by UHPLC-QTOF-MS: Impact of normalization strategies. *Anal. Chim. Acta* 955, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.029>
- Gaitán-Espitia, J.D., Quintero-Galvis, J.F., Mesas, A., D'Elía, G., **2016**. Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (*Bivalvia: Pteriomorphia*): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep26853>

- Gardinassi, L.G., Xia, J., Safo, S.E., Li, S., **2017**. Bioinformatics Tools for the Interpretation of Metabolomics Data. *Curr. Pharmacol. Rep.* 3, 374–383. <https://doi.org/10.1007/s40495-017-0107-0>
- Gaw, S., Thomas, K.V., Hutchinson, T.H., **2014**. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130572–20130572. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0572>
- Giacomini, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.-F., Jacob, D., Goulitquer, S., Thévenot, E.A., Caron, C., **2015**. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* 31, 1493–1495. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813>
- Gillis, P.L., Gagné, F., McInnis, R., Hooey, T.M., Choy, E.S., André, C., Hoque, M.E., Metcalfe, C.D., **2014**. The impact of municipal wastewater effluent on field-deployed freshwater mussels in the Grand River (Ontario, Canada). *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 134–143. <https://doi.org/10.1002/etc.2401>
- Gillis, P.L., McInnis, R., Salerno, J., de Solla, S.R., Servos, M.R., Leonard, E.M., **2017**. Municipal wastewater treatment plant effluent-induced effects on freshwater mussel populations and the role of mussel refugia in recolonizing an extirpated reach. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 225, 460–468. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.010>
- Giraud, M., Douville, M., Houde, M., **2015**. Chronic toxicity evaluation of the flame retardant tris (2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP) using *Daphnia magna* transcriptomic response. *Chemosphere* 132, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.028>
- Girón-Pérez, M.I., Santerre, A., Gonzalez-Jaime, F., Casas-Solis, J., Hernández-Coronado, M., Peregrina-Sandoval, J., Takemura, A., Zaitseva, G., **2007**. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 760–769. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.02.004>
- Go, E.P., **2010**. Database Resources in Metabolomics: An Overview. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5, 18–30. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9157-3>
- Godoy, A.A., Kummrow, F., **2017**. What do we know about the ecotoxicology of pharmaceutical and personal care product mixtures? A critical review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 47, 1453–1496. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1370991>
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., **1978**. The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, 101–125. <https://doi.org/10.1017/S0376892900005555>
- Gomez, E., Bachelot, M., Boillot, C., Munaron, D., Chiron, S., Casellas, C., Fenet, H., **2012**. Bioconcentration of two pharmaceuticals (benzodiazepines) and two personal care products (UV filters) in marine mussels *Mytilus galloprovincialis* under controlled laboratory conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 2561–2569. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0964-3>
- González-Alonso, S., Merino, L.M., Esteban, S., López de Alda, M., Barceló, D., Durán, J.J., López-Martínez, J., Aceña, J., Pérez, S., Mastroianni, N., Silva, A., Catalá, M., Valcárcel, Y., **2017**. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. *Environ. Pollut.* 229, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.060>
- González-Fernández, C., Albentosa, M., Campillo, J.A., Viñas, L., Franco, A., Bellas, J., **2016**. Effect of mussel reproductive status on biomarker responses to PAHs: Implications for large-scale monitoring programs. *Aquat. Toxicol.* 177, 380–394. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.012>
- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., **2014**. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 148, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.011>
- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., **2013**. Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ. Pollut.* 173, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.10.018>

- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., **2012**. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.017>
- Gorbi, S., Virno Lamberti, C., Notti, A., Benedetti, M., Fattorini, D., Moltedo, G., Regoli, F., **2008**. An ecotoxicological protocol with caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Mar. Environ. Res.* 65, 34–49. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2007.07.006>
- Gosling, E., **2015**. *Marine Bivalve Molluscs*. John Wiley & Sons.
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., **2019**. Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *J. Proteomics*, 10 Year Anniversary of Proteomics 198, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001>
- Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Almunia, C., François, A., Navarro, L., Armengaud, J., Salvador, A., Geffard, O., **2017**. Ecotoxicoproteomics for Aquatic Environmental Monitoring: First in Situ Application of a New Proteomics-Based Multibiomarker Assay Using Caged Amphipods. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13417–13426. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03736>
- Grenni, P., Ancona, V., Barra Caracciolo, A., **2018**. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchem. J., Pharmacological Research and Analytical Approaches* 136, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>
- Grundy, M.M., Ratcliffe, N.A., Moore, M.N., **1996**. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res., Pollutant Responses In Marine Organisms* 42, 187–190. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(95\)00033-X](https://doi.org/10.1016/0141-1136(95)00033-X)
- Guijas, C., Montenegro-Burke, J.R., Domingo-Almenara, X., Palermo, A., Warth, B., Hermann, G., Koellensperger, G., Huan, T., Uritboonthai, W., Aisporna, A.E., Wolan, D.W., Spilker, M.E., Benton, H.P., Siuzdak, G., **2018**. METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. *Anal. Chem.* 90, 3156–3164. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04424>
- Hai, F.I., Yang, S., Asif, M.B., Sencadas, V., Shawkat, S., Sanderson-Smith, M., Gorman, J., Xu, Z.-Q., Yamamoto, K., **2018**. Carbamazepine as a Possible Anthropogenic Marker in Water: Occurrences, Toxicological Effects, Regulations and Removal by Wastewater Treatment Technologies. *Water* 10, 107. <https://doi.org/10.3390/w10020107>
- Harbi, K., Makridis, P., Koukoumis, C., Papadionysiou, M., Vgenis, T., Kornaros, M., Ntaikou, I., Giokas, S., Dailianis, S., **2017**. Evaluation of a battery of marine species-based bioassays against raw and treated municipal wastewaters. *J. Hazard. Mater.* 321, 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.036>
- Haug, K., Salek, R.M., Conesa, P., Hastings, J., de Matos, P., Rijnbeek, M., Mahendraker, T., Williams, M., Neumann, S., Rocca-Serra, P., Maguire, E., González-Beltrán, A., Sansone, S.-A., Griffin, J.L., Steinbeck, C., **2013**. MetaboLights—an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data. *Nucleic Acids Res.* 41, D781–D786. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1004>
- Hawkins, A.J.S., Fang, J.G., Pascoe, P.L., Zhang, J.H., Zhang, X.L., Zhu, M.Y., **2001**. Modelling short-term responsive adjustments in particle clearance rate among bivalve suspension-feeders: separate unimodal effects of seston volume and composition in the scallop *Chlamys farreri*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262, 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00282-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00282-9)
- He, Z., Cheng, X., Kyzas, G.Z., Fu, J., **2016**. Pharmaceuticals pollution of aquaculture and its management in China. *J. Mol. Liq.* 223, 781–789. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.09.005>
- Heye, K., Lotz, T., Wick, A., Oehlmann, J., **2019**. Interactive effects of biotic and abiotic environmental stressors on carbamazepine toxicity in the non-biting midge *Chironomus riparius*. *Water Res.* 156, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.007>
- Hines, A., Oladiran, G.S., Bignell, J.P., Stentiford, G.D., Viant, M.R., **2007a**. Direct Sampling of Organisms from the Field and Knowledge of their Phenotype: Key Recommendations for Environmental Metabolomics. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3375–3381. <https://doi.org/10.1021/es062745w>

- Hines, A., Staff, F.J., Widdows, J., Compton, R.M., Falciani, F., Viant, M.R., **2010**. Discovery of Metabolic Signatures for Predicting Whole Organism Toxicology. *Toxicol. Sci.* 115, 369–378. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq004>
- Hines, A., Yeung, W.H., Craft, J., Brown, M., Kennedy, J., Bignell, J., Stentiford, G.D., Viant, M.R., **2007b**. Comparison of histological, genetic, metabolomics, and lipid-based methods for sex determination in marine mussels. *Anal. Biochem.* 369, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.06.008>
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, Kenichi, Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M.Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, Ken, Funatsu, K., Matsuura, F., Soga, T., Taguchi, R., Saito, K., Nishioka, T., **2010**. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* 45, 703–714. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>
- Howard, P.H., Muir, D.C.G., **2011**. Identifying New Persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemicals in Commerce II: Pharmaceuticals. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6938–6946. <https://doi.org/10.1021/es201196x>
- Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M., Schlenk, D., **2002**. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 229–235. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1182-7>
- Hughes, H.W., Mamlok, R.J., Dodge, W.F., Snodgrass, W.R., **1985**. Metabolic acidosis, hyperglycemia, and ketonuria in carbamazepine overdose (Report No. 4). Nature Publishing Group.
- Iglesias, J.I.P., Pérez-Camacho, A., Navarro, E., Labarta, U., Beiras, R., Hawkins, A.J.S., Widdows, J., **1996**. Microgeographic variability in feeding: absorption, and condition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* LMK.): a transplant experiment.
- Irisarri, J., Fernández-Reiriz, M.-J., Labarta, U., **2015**. Temporal and spatial variations in proximate composition and Condition Index of mussels *Mytilus galloprovincialis* cultured in suspension in a shellfish farm. *Aquaculture* 435, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.041>
- Izral, N.M., Brua, R.B., Culp, J.M., Yates, A.G., **2018**. Developing metabolomics-based bioassessment: crayfish metabolome sensitivity to food and dissolved oxygen stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 36184–36193. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3518-5>
- Ji, C., Li, F., Wang, Q., Zhao, J., Sun, Z., Wu, H., **2016**. An integrated proteomic and metabolomic study on the gender-specific responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* to tetrabromobisphenol A (TBBPA). *Chemosphere* 144, 527–539. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.052>
- Jiang, W., Xia, T., Yun, Y., Li, M., Zhang, F., Gao, S., Chen, W., **2019**. UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of carbamazepine and its seven major metabolites in serum of epileptic patients. *J. Chromatogr. B* 1108, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.016>
- Johansson, M.W., Lind, M.I., Holmblad, T., Thornqvist, P.O., Soderhall, K., **1995**. Peroxinectin, a Novel Cell Adhesion Protein from Crayfish Blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 1079–1087. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2731>
- Johnstone, M.B., Ellis, S., Mount, A.S., **2008**. Visualization of shell matrix proteins in hemocytes and tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 310, 227–239. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21206>
- Juhel, G., Bayen, S., Goh, C., Lee, W.K., Kelly, B.C., **2017**. 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.* 36, 429–441. <https://doi.org/10.1002/etc.3556>
- Kanehisa, M., Goto, S., **2000**. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kappel, C.V., **2005**. Losing pieces of the puzzle: threats to marine, estuarine, and diadromous species. *Front. Ecol. Environ.* 3, 275–282. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2005\)003\[0275:LPOTPT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2005)003[0275:LPOTPT]2.0.CO;2)

- Karagiannis, D., Vatsos, I.N., Angelidis, P., **2011**. Effects of atrazine on the viability and the formation of byssus of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquac. Int.* 19, 103–110. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9344-5>
- Karaman, I., **2017**. Preprocessing and Pretreatment of Metabolomics Data for Statistical Analysis, in: Sussulini, A. (Ed.), *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 145–161. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_6)
- Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D., Mallick, P., **2008**. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* 24, 2534–2536. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn323>
- Khan, S.A., Liu, X., Li, H., Zhu, Y., Fan, W., Zhou, P., Rehman, Z. ur, **2016**. <sup>1</sup>H NMR-based serum metabolic profiling of *Carassius auratus gibelio* under the toxicity of Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 2597–2608. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1086-0>
- Kim, K., Mall, C., Taylor, S.L., Hitchcock, S., Zhang, C., Wettersten, H.I., Jones, A.D., Chapman, A., Weiss, R.H., **2014**. Mealtime, Temporal, and Daily Variability of the Human Urinary and Plasma Metabolomes in a Tightly Controlled Environment. *PLOS ONE* 9, e86223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086223>
- Kim, Y., Ashton-Alcox, K.A., Powell, E.N., **2006**. *Histological Techniques for Marine Bivalve Molluscs: Update*. Silver Spring, MD. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS, 1-27.
- Kimbrough, K.L., Johnson, W.E., Lauenstein, G.G., Christensen, J.D., Apeti, D.A., **2008**. An assessment of two decades of contaminant monitoring in the nation's coastal zone. In: Silver Spring, M.D.N.T.M., editot. NOAA, 1-105.
- Kind, T., Fiehn, O., **2007**. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* 8, 105. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-105>
- Klosterhaus, S.L., Grace, R., Hamilton, M.C., Yee, D., **2013**. Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environ. Int.* 54, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.01.009>
- Knapen, D., Angrish, M.M., Fortin, M.C., Katsiadaki, I., Leonard, M., Margiotta-Casaluci, L., Munn, S., O'Brien, J.M., Pollesch, N., Smith, L.C., Zhang, X., Villeneuve, D.L., **2018**. Adverse outcome pathway networks I: Development and applications. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 1723–1733. <https://doi.org/10.1002/etc.4125>
- Krastanov, A., **2010**. *Metabolomics—The State of Art*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 24, 1537–1543. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0001-Y>
- Kudriakova, T.B., Sirota, L.A., Rozova, G.I., Gorkov, V.A., **1992**. Autoinduction and steady-state pharmacokinetics of carbamazepine and its major metabolites. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 33, 611–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1992.tb04089.x>
- Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T.R., Neumann, S., **2012**. CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets. *Anal. Chem.* 84, 283–289. <https://doi.org/10.1021/ac202450g>
- Kümmerer, K., **2009**. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* 90, 2354–2366. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>
- Kwon, J.-W., Rodriguez, J.M., **2014**. Occurrence and Removal of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products in Three Wastewater-Treatment Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 538–548. <https://doi.org/10.1007/s00244-013-9979-0>
- Lafont, R., Mathieu, M., **2007**. Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16, 109–130. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0113-1>
- Lankadurai, B.P., Nagato, E.G., Simpson, M.J., **2013**. Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. *Environ. Rev.* 21, 180–205. <https://doi.org/10.1139/er-2013-0011>

- Lara-Martín, P.A., González-Mazo, E., Petrovic, M., Barceló, D., Brownawell, B.J., **2014**. Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY). *Mar. Pollut. Bull.*, 7th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology 85, 710–719. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.022>
- Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., Leboulenger, F., **2010**. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 372–386. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.011>
- Legido-Quigley, C., Stella, C., Perez-Jimenez, F., Lopez-Miranda, J., Ordovas, J., Powell, J., van-der-Ouderaa, F., Ware, L., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., **2010**. Liquid chromatography-mass spectrometry methods for urinary biomarker detection in metabonomic studies with application to nutritional studies. *Biomed. Chromatogr. BMC* 24, 737–743. <https://doi.org/10.1002/bmc.1357>
- Lehane, C., Davenport, J., **2006**. A 15-month study of zooplankton ingestion by farmed mussels (*Mytilus edulis*) in Bantry Bay, Southwest Ireland. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 67, 645–652.
- Lertratanangkoon, K., Horning, M.G., **1982**. Metabolism of carbamazepine. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 10, 1–10.
- Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J., Cai, Y., **2012**. Investigation of antibiotics in mollusks from coastal waters in the Bohai Sea of China. *Environ. Pollut.* 162, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.022>
- Liang, X., Chen, B., Nie, X., Shi, Z., Huang, X., Li, X., **2013**. The distribution and partitioning of common antibiotics in water and sediment of the Pearl River Estuary, South China. *Chemosphere* 92, 1410–1416. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.044>
- Libiseller, G., Dvorzak, M., Kleb, U., Gander, E., Eisenberg, T., Madeo, F., Neumann, S., Trausinger, G., Sinner, F., Pieber, T., Magnes, C., **2015**. IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC Bioinformatics* 16, 118. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0562-8>
- Lignot, J.-H., Pannier, F., Trilles, J.-P., Charmantier, G., **1998**. Effects of tributyltin oxide on survival and osmoregulation of the shrimp *Penaeus japonicus* (crustacea, decapoda). *Aquat. Toxicol.* 41, 277–299. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00088-X)
- Lin, C.Y., Viant, M.R., Tjeerdema, R.S., **2006**. Metabolomics: methodologies and applications in the environmental sciences. *J. Pestic. Sci.* 31, 245–251.
- Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., Keun, H.C., Craig, A., Pearce, J.T.M., Bruce, S.J., Hardy, N., Sansone, S.-A., Antti, H., Jonsson, P., Daykin, C., Navarange, M., Beger, R.D., Verheij, E.R., Amberg, A., Baunsgaard, D., Cantor, G.H., Lehman-McKeeman, L., Earll, M., Wold, S., Johansson, E., Haselden, J.N., Kramer, K., Thomas, C., Lindberg, J., Schuppe-Koistinen, I., Wilson, I.D., Reilly, M.D., Robertson, D.G., Senn, H., Krotzky, A., Kochhar, S., Powell, J., van der Ouderaa, F., Plumb, R., Schaefer, H., Spraul, M., Standard Metabolic Reporting Structures working group, **2005**. Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nat. Biotechnol.* 23, 833–838. <https://doi.org/10.1038/nbt0705-833>
- Liquete, C., Piroddi, C., Drakou, E.G., Gurney, L., Katsanevakis, S., Charef, A., Egoh, B., **2013**. Current Status and Future Prospects for the Assessment of Marine and Coastal Ecosystem Services: A Systematic Review. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067737>
- Liu, J., Wang, R., Huang, B., Lin, C., Wang, Y., Pan, X., **2011**. Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. *Environ. Pollut., Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity* 159, 2815–2822. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.013>
- Liu, X., Sun, H., Wang, Y., Ma, M., Zhang, Y., **2014**. Gender-specific metabolic responses in hepatopancreas of mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.002>
- Liu, Y., Liang, Y., Wishart, D., **2015**. PolySearch2: a significantly improved text-mining system for discovering associations between human diseases, genes, drugs, metabolites, toxins and more. *Nucleic Acids Res.* 43, W535–W542. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv383>

- Lowe, D.M., Moore, M.N., Bayne, B.L., **1982**. Aspects of Gametogenesis in the Marine Mussel *Mytilus Edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 62, 133–145. <https://doi.org/10.1017/S0025315400020166>
- Lubet, P., **1959**. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilides et les pectinides (Mollusques bivalves). *Rev. Trav. Inst. Pêches, Marit*, 23(4), 386–548.
- Lucas, J.S., **2008**. Chapter 4 - Feeding and Metabolism, in: Southgate, P.C., Lucas, J.S. (Eds.), *The Pearl Oyster*. Elsevier, London, pp. 103–130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52976-3.00004-8>
- Lunestad, T.B., Samuelson, O.B., Fjelde, S., Ervik, A., **1995**. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture* 134, 217–225. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00065-A](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00065-A)
- Lv, M., Sun, Q., Xu, H., Lin, L., Chen, M., Yu, C.-P., **2014**. Occurrence and fate of triclosan and triclocarban in a subtropical river and its estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 88, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.065>
- Mahieu, N.G., Genenbacher, J.L., Patti, G.J., **2016**. A roadmap for the XCMS family of software solutions in metabolomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 30, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.11.009>
- Mamas, M., Dunn, W.B., Neyses, L., Goodacre, R., **2011**. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch. Toxicol.* 85, 5–17. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0609-6>
- Maranho, L.A., André, C., DelValls, T.A., Gagné, F., Martín-Díaz, M.L., **2015**. Adverse effects of wastewater discharges in reproduction, energy budget, neuroendocrine and inflammation processes observed in marine clams *Ruditapes philippinarum*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 164, 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.07.044>
- Margot, J., Rossi, L., Barry, D.A., Holliger, C., **2015**. A review of the fate of micropollutants in wastewater treatment plants. *WIREs Water* 2, 457–487. <https://doi.org/10.1002/wat2.1090>
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., **2002**. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392. <https://doi.org/10.1002/jemt.10040>
- Martin-Díaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., **2009**. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 94, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.06.015>
- Martínez Bueno, M.J., Boillot, C., Fenet, H., Chiron, S., Casellas, C., Gómez, E., **2013**. Fast and easy extraction combined with high resolution-mass spectrometry for residue analysis of two anticonvulsants and their transformation products in marine mussels. *J. Chromatogr. A* 1305, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.071>
- Martínez Bueno, M.J., Boillot, C., Munaron, D., Fenet, H., Casellas, C., Gómez, E., **2014**. Occurrence of venlafaxine residues and its metabolites in marine mussels at trace levels: development of analytical method and a monitoring program. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 601–610. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7477-x>
- Martínez Bueno, M.J., Herrera, S., Munaron, D., Boillot, C., Fenet, H., Chiron, S., Gómez, E., **2016**. POCIS passive samplers as a monitoring tool for pharmaceutical residues and their transformation products in marine environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5019–5029. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3796-5>
- Martínez-Pita, I., Sánchez-Lazo, C., Ruíz-Jarabo, I., Herrera, M., Mancera, J.M., **2012**. Biochemical composition, lipid classes, fatty acids and sexual hormones in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from cultivated populations in south Spain. *Aquaculture* 358–359, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.003>
- Martyniuk, C.J., **2018**. Are we closer to the vision? A proposed framework for incorporating omics into environmental assessments. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 59, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.005>
- Matozzo, V., **2014**. Effects of pharmaceuticals on immune parameters of aquatic invertebrates. *Invertebr. Surviv. J.* 11, 163–173.

- McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., Quinn, B., **2014**. A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *Sci. Total Environ.* 476–477, 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.123>
- McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., Quinn, B., **2013**. The determination of pharmaceutical residues in cooked and uncooked marine bivalves using pressurised liquid extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 9509–9521. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7371-6>
- Meredith-Williams, M., Carter, L.J., Fussell, R., Raffaelli, D., Ashauer, R., Boxall, A.B.A., **2012**. Uptake and depuration of pharmaceuticals in aquatic invertebrates. *Environ. Pollut., Chemicals Management and Environmental Assessment of Chemicals in China* 165, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.11.029>
- Mezzelani, M., Fattorini, D., Gorbi, S., Nigro, M., Regoli, F., **2020**. Human pharmaceuticals in marine mussels: Evidence of sneaky environmental hazard along Italian coasts. *Mar. Environ. Res.* 105137. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105137>
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Da Ros, Z., Fattorini, D., d’Errico, G., Milan, M., Bargelloni, L., Regoli, F., **2016a**. Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 121, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.03.005>
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d’Errico, G., Benedetti, M., Milan, M., Bargelloni, L., Regoli, F., **2016b**. Transcriptional and cellular effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in experimentally exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 180, 306–319. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.006>
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d’Errico, G., Consolandi, G., Milan, M., Bargelloni, L., Regoli, F., **2018**. Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, Ibuprofen and Ketoprofen: Insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. *Chemosphere* 198, 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.148>
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F., **2018**. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 140, 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>
- Milan, M., Pauletto, M., Patarnello, T., Bargelloni, L., Marin, M.G., Matozzo, V., **2013**. Gene transcription and biomarker responses in the clam *Ruditapes philippinarum* after exposure to ibuprofen. *Aquat. Toxicol.* 126, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.007>
- Miller, T.H., Bury, N.R., Owen, S.F., Barron, L.P., **2017**. Uptake, biotransformation and elimination of selected pharmaceuticals in a freshwater invertebrate measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 183, 389–400. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.083>
- Milovanovic, J.R., Jankovic, S.M., **2011**. Factors influencing carbamazepine pharmacokinetics in children and adults: population pharmacokinetic analysis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 49, 428–436. <https://doi.org/10.5414/cp201517>
- Miracle, A.L., Ankley, G.T., **2005**. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 19, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.06.007>
- Misra, B.B., **2018**. New tools and resources in metabolomics: 2016–2017. *ELECTROPHORESIS* 39, 909–923. <https://doi.org/10.1002/elps.201700441>
- Misra, B.B., Langefeld, C., Olivier, M., Cox, L.A., **2019**. Integrated omics: tools, advances and future approaches. *J. Mol. Endocrinol.* 62, R21–R45. <https://doi.org/10.1530/JME-18-0055>
- Moles, A., Hale, N., **2003**. Use of physiological responses in *Mytilus trossulus* as integrative bioindicators of sewage pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 954–958. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00108-5)
- Monteiro, M.S., Carvalho, M., Bastos, M.L., Guedes de Pinho, P., **2013**. Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery: Advances and Challenges. *Curr. Med. Chem.* 20, 257–271.

- Montezinho, L.P., Mørk, A., Duarte, C.B., Penschuck, S., Geraldès, C.F., Castro, M.M.C., **2007**. Effects of mood stabilizers on the inhibition of adenylate cyclase via dopamine D2-like receptors. *Bipolar Disord.* 9, 290–297. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2007.00354.x>
- Monton, M.R.N., Soga, T., **2007**. Metabolome analysis by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A, Editors' Choice* 1168, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.065>
- Moore, M.N., **1985**. Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.*
- Moore, M.N., Allen, I.J., **2002**. A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 54, 579–584. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00166-6](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00166-6)
- Moore, M.N., Allen, J.I., McVeigh, A., Shaw, J., **2006**. Lysosomal and Autophagic Reactions as Predictive Indicators of Environmental Impact in Aquatic Animals. *Autophagy* 2, 217–220. <https://doi.org/10.4161/auto.2663>
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D.R., **2004**. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen., Genotoxicological Studies in Aquatic Organisms* 552, 247–268. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028>
- Moreno, P., Beisken, S., Harsha, B., Muthukrishnan, V., Tudose, I., Dekker, A., Dornfeldt, S., Taruttis, F., Grosse, I., Hastings, J., Neumann, S., Steinbeck, C., **2015**. BiNChE: A web tool and library for chemical enrichment analysis based on the ChEBI ontology. *BMC Bioinformatics* 16, 56. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0486-3>
- Morrison, N., Bearden, D., Bundy, J.G., Collette, T., Currie, F., Davey, M.P., Haigh, N.S., Hancock, D., Jones, O.A.H., Rochfort, S., Sansone, S.-A., Štys, D., Teng, Q., Field, D., Viant, M.R., **2007**. Standard reporting requirements for biological samples in metabolomics experiments: environmental context. *Metabolomics* 3, 203–210. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0067-1>
- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., Snider, D., **2004**. Hemocyte-Mediated Shell Mineralization in the Eastern Oyster. *Science* 304, 297–300. <https://doi.org/10.1126/science.1090506>
- Munaron, D., Tapie, N., Budzinski, H., Andral, B., Gonzalez, J.-L., **2012**. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuar. Coast. Shelf Sci., Research and Management for the conservation of coastal lagoon ecosystems* 114, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.09.009>
- Nakata, H., Shinohara, R.-I., Nakazawa, Y., Isobe, T., Sudaryanto, A., Subramanian, A., Tanabe, S., Zakaria, M.P., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Kim, E.Y., Min, B.-Y., We, S.-U., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Frank, D., Lauenstein, G., Kannan, K., **2012**. Asia–Pacific mussel watch for emerging pollutants: Distribution of synthetic musks and benzotriazole UV stabilizers in Asian and US coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2211–2218. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.07.049>
- Näslund, J., Hedman, J.E., Agestrand, C., **2008**. Effects of the antibiotic ciprofloxacin on the bacterial community structure and degradation of pyrene in marine sediment. *Aquat. Toxicol.* 90, 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.09.002>
- Nesatyy, V.J., Suter, M.J.-F., **2008**. Analysis of environmental stress response on the proteome level. *Mass Spectrom. Rev.* 27, 556–574. <https://doi.org/10.1002/mas.20177>
- Neuparth, T., Martins, C., Santos, C.B. de los Costa, M.H., Martins, I., Costa, P.M., Santos, M.M., **2014**. Hypocholesterolaemic pharmaceutical simvastatin disrupts reproduction and population growth of the amphipod *Gammarus locusta* at the ng/L range. *Aquat. Toxicol.* 155, 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.009>
- Newell, R.I.E., **1989**. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North and Mid-Atlantic) : blue mussel. *Biol. Rep. USA*.
- Nicholson, J.K., Lindon, J.C., Holmes, E., **1999**. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of

- biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 29, 1181–1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., **2007**. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225–1234. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1035-8>
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Yang, H., Dong, H., **2019**. Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.061>
- Nobles, T., Zhang, Y., **2015**. Survival, Growth and Condition of Freshwater Mussels: Effects of Municipal Wastewater Effluent. *PLOS ONE* 10, e0128488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128488>
- Noguera-Oviedo, K., Aga, D.S., **2016**. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. *J. Hazard. Mater.* 316, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.058>
- OECD, **2019**. *Pharmaceutical Residues in Freshwater: Hazards and Policy Responses*, OECD Studies on Water, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/c936f42d-en>.
- OECD, **2008**. *OECD Guidelines for the testing of chemicals: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes*. OECD Guidel. 315.
- Oldenkamp, R., Beusen, A.H.W., Huijbregts, M.A.J., **2019**. Aquatic risks from human pharmaceuticals—modelling temporal trends of carbamazepine and ciprofloxacin at the global scale. *Environ. Res. Lett.* 14, 034003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab0071>
- Oliveira, P., Almeida, Â., Calisto, V., Esteves, V.I., Schneider, R.J., Wrona, F.J., Soares, A.M.V.M., Figueira, E., Freitas, R., **2017**. Physiological and biochemical alterations induced in the mussel *Mytilus galloprovincialis* after short and long-term exposure to carbamazepine. *Water Res.* 117, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.052>
- Oropesa, A.L., Floro, A.M., 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6907-7>
- Pagano, M., Porcino, C., Briglia, M., Fiorino, E., Vazzana, M., Silvestro, S., Faggio, C., **2017**. The Influence of Exposure of Cadmium Chloride and Zinc Chloride on Haemolymph and Digestive Gland Cells from *Mytilus galloprovincialis*. *Int. J. Environ. Res.* 11, 207–216. <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0020-8>
- Palmer, G.C., **1979**. Interactions of antiepileptic drugs on adenylate cyclase and phosphodiesterases in rat and mouse cerebrum. *Exp. Neurol.* 63, 322–335. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(79\)90128-6](https://doi.org/10.1016/0014-4886(79)90128-6)
- Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A., **2011**. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere* 84, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.049>
- Patti, G.J., Tautenhahn, R., Siuzdak, G., **2012**. Meta-analysis of untargeted metabolomic data from multiple profiling experiments. *Nat. Protoc.* 7, 508–516. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.454>
- Peñuelas, J., Sardans, J., **2009**. Ecological metabolomics. *Chem. Ecol.* 25, 305–309. <https://doi.org/10.1080/02757540903062517>
- Peregrín-Alvarez, J.M., Sanford, C., Parkinson, J., **2009**. The conservation and evolutionary modularity of metabolism. *Genome Biol.* 10, R63. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r63>
- Pinu, F.R., Beale, D.J., Paten, A.M., Kouremenos, K., Swarup, S., Schirra, H.J., Wishart, D., **2019**. Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites* 9. <https://doi.org/10.3390/metabo9040076>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M., **2010**. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>

- Pomfret, S.M., Brua, R.B., Izral, N.M., Yates, A.G., **2019**. Metabolomics for biomonitoring: an evaluation of the metabolome as an indicator of aquatic ecosystem health. *Environ. Rev.* <https://doi.org/10.1139/er-2019-0003>
- Pouliquen, H., Delépée, R., Larhantec-Verdier, M., Morvan, M.-L., Le Bris, H., **2007**. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. *Aquaculture* 262, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.014>
- Prichard, E., Granek, E.F., **2016**. Effects of pharmaceuticals and personal care products on marine organisms: from single-species studies to an ecosystem-based approach. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 22365–22384. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7282-0>
- Prins, T.C., Smaal, A.C., Pouwer, A.J., **1991**. Selective ingestion of phytoplankton by the bivalves *Mytilus edulis* L. and *Cerastoderma edule* (L.). *Hydrobiol. Bull.* 25, 93–100. <https://doi.org/10.1007/BF02259595>
- QuintilesIMS and its affiliates, 2015. *Global Medicines Use in 2020. Outlook and Implications*, pp. 9–21.
- Rathahao-Paris, E., Alves, S., Junot, C., Tabet, J.-C., **2015**. High resolution mass spectrometry for structural identification of metabolites in metabolomics. *Metabolomics* 12, 10. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0882-8>
- Regoli, F., Principato, G., **1995**. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00064-W](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00064-W)
- Ren, J.-L., Zhang, A.-H., Kong, L., Wang, X.-J., **2018**. Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites. *RSC Adv.* 8, 22335–22350.
- Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., **2013**. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 93, 1268–1287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059>
- Robinson, B.J., Hellou, J., **2009**. Biodegradation of endocrine disrupting compounds in harbour seawater and sediments. *Sci. Total Environ.* 407, 5713–5718. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.07.003>
- Rocha, T.L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J.P., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Bebianno, M.J., **2014**. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 101, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.009>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Cao, K.-A.L., **2017**. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Comput. Biol.* 13, e1005752. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
- Roux, A., Lison, D., Junot, C., Heilier, J.-F., **2011**. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clin. Biochem., Mass Spectrometry in Laboratory Medicine* 44, 119–135. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016>
- Ruttkies, C., Schymanski, E.L., Wolf, S., Hollender, J., Neumann, S., **2016**. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J. Cheminformatics* 8, 3. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0115-9>
- Salek, R.M., Neumann, S., Schober, D., Hummel, J., Billiau, K., Kopka, J., Correa, E., Reijmers, T., Rosato, A., Tenori, L., Turano, P., Marin, S., Deborde, C., Jacob, D., Rolin, D., Dartigues, B., Conesa, P., Haug, K., Rocca-Serra, P., O’Hagan, S., Hao, J., van Vliet, M., Sysi-Aho, M., Ludwig, C., Bouwman, J., Cascante, M., Ebbels, T., Griffin, J.L., Moing, A., Nikolski, M., Oresic, M., Sansone, S.-A., Viant, M.R., Goodacre, R., Günther, U.L., Hankemeier, T., Luchinat, C., Walther, D., Steinbeck, C., **2015**. COordination of Standards in MetabOmicS (COSMOS): facilitating integrated metabolomics data access. *Metabolomics* 11, 1587–1597. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0810-y>

- Santos, L.H.M.L.M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., Montenegro, M.C.B.S.M., **2013**. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 461–462, 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>
- Santos, M.M., Reis-Henriques, M.A., Guillot, R., Lima, D., Franco-Duarte, R., Mendes, I., Queirós, S., Castro, L.F.C., **2008**. Anti-androgenic effects of sewage treatment plant effluents in the prosobranch gastropod *Nucella lapillus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 148, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.03.012>
- Saravanan, M., Ramesh, M., **2013**. Short and long-term effects of clofibric acid and diclofenac on certain biochemical and ionoregulatory responses in an Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *Chemosphere* 93, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.015>
- Sauvé, S., Desrosiers, M., **2014**. A review of what is an emerging contaminant. *Chem. Cent. J.* 8, 15. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>
- Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R.W., **2007**. Interactions between climate change and contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1845–1856. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.09.020>
- Seed, R., **1969**. The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores. *Oecologia* 3, 277–316. <https://doi.org/10.1007/BF00390380>
- Sericano, J.L., Wade, T.L., Sweet, S.T., Ramirez, J., Lauenstein, G.G., **2014**. Temporal trends and spatial distribution of DDT in bivalves from the coastal marine environments of the continental United States, 1986–2009. *Mar. Pollut. Bull., U.S. Coastal Monitoring: NOAA's Mussel Watch investigates Contaminants of Emerging Concern* 81, 303–316. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.049>
- Serrano, F.S.J., López, J.S., Martín, L.O.G., **1995**. Caffeine inhibition of glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle tissue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27, 911–916. [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(95\)00058-W](https://doi.org/10.1016/1357-2725(95)00058-W)
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., **2003**. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Simmons, D.B.D., Benskin, J.P., Cosgrove, J.R., Duncker, B.P., Ekman, D.R., Martyniuk, C.J., Sherry, J.P., **2015**. Omics for aquatic ecotoxicology: Control of extraneous variability to enhance the analysis of environmental effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1693–1704. <https://doi.org/10.1002/etc.3002>
- Simões, T., Novais, S.C., Natal-da-Luz, T., Renaud, M., Leston, S., Ramos, F., Römbke, J., Roelofs, D., van Straalen, N.M., Sousa, J.P., Lemos, M.F.L., **2019**. From laboratory to the field: Validating molecular markers of effect in *Folsomia candida* exposed to a fungicide-based formulation. *Environ. Int.* 127, 522–530. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.073>
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., **2006**. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Smith, E., Morowitz, H.J., **2004**. Universality in intermediary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 13168–13173. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404922101>
- Söderhäll, K., Cerenius, L., Johansson, M.W., **1994**. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 712, 155–161. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb33570.x>
- Solé, M., Shaw, J.P., Frickers, P.E., Readman, J.W., Hutchinson, T.H., **2010**. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 649–656. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3182-1>
- Sordet, M., Berlioz-Barbier, A., Buleté, A., Garric, J., Vulliet, E., **2016**. Quantification of emerging micropollutants in an amphipod crustacean by nanoliquid chromatography coupled to mass

- spectrometry using multiple reaction monitoring cubed mode. *J. Chromatogr. A* 1456, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.022>
- Soudant, P., E. Chu, F.-L. Volety, A., **2013**. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 196–216. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001>
- Spurgeon, D.J., Jones, O.A.H., Dorne, J.-L.C.M., Svendsen, C., Swain, S., Stürzenbaum, S.R., **2010**. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci. Total Environ., Cumulative Stressors - Risk assessment of mixtures of chemicals and combinations of chemicals and natural stressors* 408, 3725–3734. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.02.038>
- Strohmeier, T., Strand, Ø., Alunno-Bruscia, M., Duinker, A., Cranford, P.J., **2012**. Variability in particle retention efficiency by the mussel *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 412, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.11.006>
- Suárez, M.P., Alvarez, C., Molist, P., Juan, F.S., **2005**. Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the estuary of Vigo. *J. Shellfish Res.* 24, 531–540. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[531:PAOGCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[531:PAOGCA]2.0.CO;2)
- Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G., **2015**. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerg. Contam.* 1, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2015.07.001>
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reilly, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., **2007**. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Sun, J., Zhou, Q., Hu, X., **2019**. Integrating multi-omics and regular analyses identifies the molecular responses of zebrafish brains to graphene oxide: Perspectives in environmental criteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180, 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.011>
- Tahrani, L., Van Loco, J., Ben Mansour, H., Reyns, T., **2016**. Occurrence of antibiotics in pharmaceutical industrial wastewater, wastewater treatment plant and sea waters in Tunisia. *J. Water Health* 14, 208–213. <https://doi.org/10.2166/wh.2015.224>
- Taylor, N.S., Gavin, A., Viant, M.R., **2018**. Metabolomics Discovers Early-Response Metabolic Biomarkers that Can Predict Chronic Reproductive Fitness in Individual *Daphnia magna*. *Metabolites* 8, 42. <https://doi.org/10.3390/metabo8030042>
- Ternes, T.A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., Joss, A., **2004**. A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (K<sub>d</sub>) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res.* 38, 4075–4084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.07.015>
- Theodoridis, G.A., Gika, H.G., Plumb, R., Wilson, I.D., **2020**. Chapter 9 - Liquid chromatographic methods combined with mass spectrometry in metabolomics, in: Issaq, H.J., Veenstra, T.D. (Eds.), *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 149–169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818607-7.00009-8>
- Theodoridis, G.A., Gika, H.G., Want, E.J., Wilson, I.D., **2012**. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal. Chim. Acta* 711, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.042>
- Thompson, R.J., Bayne, B.L., **1974**. Some relationships between growth, metabolism and food in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 27, 317–326. <https://doi.org/10.1007/BF00394367>
- Thuiller, W., **2004**. Patterns and uncertainties of species’ range shifts under climate change. *Glob. Change Biol.* 10, 2020–2027. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00859.x>
- Tian, Y., Xia, X., Wang, Jinhua, Zhu, L., Wang, Jun, Zhang, F., Ahmad, Z., **2019**. Chronic Toxicological Effects of Carbamazepine on *Daphnia magna* Straus: Effects on Reproduction Traits, Body Length, and Intrinsic Growth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 103, 723–728. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02715-w>

- Tomanek, L., **2012**. Environmental Proteomics of the Mussel *Mytilus*: Implications for Tolerance to Stress and Change in Limits of Biogeographic Ranges in Response to Climate Change. *Integr. Comp. Biol.* 52, 648–664. <https://doi.org/10.1093/icb/ics114>
- Tran, N.H., Reinhard, M., Gin, K.Y.-H., **2018**. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Res.* 133, 182–207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>
- Trapp, J., Almunia, C., Gaillard, J.-C., Pible, O., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., **2016**. Proteogenomic insights into the core-proteome of female reproductive tissues from crustacean amphipods. *J. Proteomics* 135, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.06.017>
- Trapp, J., Armengaud, J., Salvador, A., Chaumot, A., Geffard, O., **2014**. Next-Generation Proteomics: Toward Customized Biomarkers for Environmental Biomonitoring. *Environ. Sci. Technol.* 48, 13560–13572. <https://doi.org/10.1021/es501673s>
- Tsiaka, P., Tsarpali, V., Ntaikou, I., Kostopoulou, M.N., Lyberatos, G., Dailianis, S., **2013**. Carbamazepine-mediated pro-oxidant effects on the unicellular marine algal species *Dunaliella tertiolecta* and the hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology* 22, 1208–1220. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1108-3>
- Tsuyuzaki, K., Morota, G., Ishii, M., Nakazato, T., Miyazaki, S., Nikaido, I., **2015**. MeSH ORA framework: R/Bioconductor packages to support MeSH over-representation analysis. *BMC Bioinformatics* 16, 45. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0453-z>
- Tulipani, S., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Andres-Lacueva, C., **2013**. Comparative Analysis of Sample Preparation Methods To Handle the Complexity of the Blood Fluid Metabolome: When Less Is More. *Anal. Chem.* 85, 341–348. <https://doi.org/10.1021/ac302919t>
- Tulipani, S., Mora-Cubillos, X., Jáuregui, O., Llorach, R., García-Fuentes, E., Tinahones, F.J., Andres-Lacueva, C., **2015**. New and Vintage Solutions To Enhance the Plasma Metabolome Coverage by LC-ESI-MS Untargeted Metabolomics: The Not-So-Simple Process of Method Performance Evaluation. *Anal. Chem.* 87, 2639–2647. <https://doi.org/10.1021/ac503031d>
- Turja, R., Lehtonen, K.K., Meierjohann, A., Brozinski, J.-M., Vahtera, E., Soirinsuo, A., Sokolov, A., Snoeijs, P., Budzinski, H., Devier, M.-H., Peluhet, L., Paakkonen, J.-P., Viitasalo, M., Kronberg, L., **2015**. The mussel caging approach in assessing biological effects of wastewater treatment plant discharges in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 97, 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.024>
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., Turk, D., **2012**. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics, Proteolysis 50 years after the discovery of lysosome 1824*, 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., **2003**. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/s1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/s1382-6689(02)00126-6)
- van Ravenzwaay, B., Cunha, G.C.-P., Leibold, E., Looser, R., Mellert, W., Prokoudine, A., Walk, T., Wiemer, J., **2007**. The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect. *Toxicol. Lett.* 172, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.05.021>
- Veetil, G.P.P., Vijaya Nadaraja, A., Bhasi, A., Khan, S., Bhaskaran, K., **2012**. Degradation of Triclosan under Aerobic, Anoxic, and Anaerobic Conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1603–1612. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9573-3>
- Velasco, L.A., Navarro, J.M., **2003**. Energetic balance of infaunal (*Mulinia edulis* King, 1831) and epifaunal (*Mytilus chilensis* Hupe, 1854) bivalves in response to wide variations in concentration and quality of seston. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1, 79–92. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00316-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00316-2)
- Velisek, J., Stara, A., Kolarova, J., Svobodova, Z., **2011**. Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. *Pestic. Biochem. Physiol.* 100, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.05.004>

- Velisek, J., Stastna, K., Sudova, E., Turek, J., Svobodova, Z., **2009**. Effects of subchronic simazine exposure on some biometric, biochemical, hematological and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Neuro Endocrinol. Lett.* 30 Suppl 1, 236–241.
- Venter, O., Brodeur, N.N., Nemiroff, L., Belland, B., Dolinsek, I.J., Grant, J.W.A., **2006**. Threats to Endangered Species in Canada. *BioScience* 56, 903–910. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)56\[903:TTEsic\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)56[903:TTEsic]2.0.CO;2)
- Verlicchi, P., Zambello, E., **2015**. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil — A critical review. *Sci. Total Environ.* 538, 750–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>
- Vernouillet, G., Eullaffroy, P., Lajeunesse, A., Blaise, C., Gagné, F., Juneau, P., **2010**. Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere* 80, 1062–1068. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.010>
- Viant, M.R., **2008**. Recent developments in environmental metabolomics. *Mol. Biosyst.* 4, 980. <https://doi.org/10.1039/b805354e>
- Viant, M.R., **2007**. Metabolomics of aquatic organisms: the new ‘omics’ on the block. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 332, 301–306.
- Viarengo, A., Canesi, L., **1991**. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture, The Biology and Cultivation of Mussels* 94, 225–243. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90120-V](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90120-V)
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., **2007**. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* 146, 281–300. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>
- Villas-Bôas, S.G., Koulman, A., Lane, G.A., **2007**. Analytical methods from the perspective of method standardization, in: Nielsen, J., Jewett, M.C. (Eds.), *Metabolomics: A Powerful Tool in Systems Biology, Topics in Current Genetics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 11–52. [https://doi.org/10.1007/4735\\_2007\\_0217](https://doi.org/10.1007/4735_2007_0217)
- Villeneuve, D.L., Crump, D., Garcia-Reyero, N., Hecker, M., Hutchinson, T.H., LaLone, C.A., Landesmann, B., Lettieri, T., Munn, S., Nepelska, M., Ottinger, M.A., Vergauwen, L., Whelan, M., **2014**. Adverse Outcome Pathway (AOP) Development I: Strategies and Principles. *Toxicol. Sci.* 142, 312–320. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu199>
- Vinaixa, M., Samino, S., Saez, I., Duran, J., Guinovart, J.J., Yanes, O., **2012**. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites* 2, 775–795. <https://doi.org/10.3390/metabo2040775>
- Vinaixa, M., Schymanski, E.L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R.M., Yanes, O., **2016**. Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends Anal. Chem.* 78, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.005>
- Vuckovic, D., **2020**. Chapter 4 - Sample preparation in global metabolomics of biological fluids and tissues, in: Issaq, H.J., Veenstra, T.D. (Eds.), *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 53–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818607-7.00004-9>
- Vuckovic, D., **2012**. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1523–1548. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6039-y>
- Wagner, N.D., Simpson, A.J., Simpson, M.J., **2018**. Sublethal metabolic responses to contaminant mixture toxicity in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2448–2457. <https://doi.org/10.1002/etc.4208>
- Wang, J., Hu, J., Zhang, S., **2010**. Studies on the sorption of tetracycline onto clays and marine sediment from seawater. *J. Colloid Interface Sci.* 349, 578–582. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.04.081>

- Wang, J., Wang, S., **2016**. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *J. Environ. Manage.* 182, 620–640. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.049>
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapon, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrew, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., P, C.A.B., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.Ø., Pogliano, K., Lington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Bandeira, N., **2016**. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* 34, 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wanichthanarak, K., Fahrman, J.F., Grapov, D., **2015**. Genomic, Proteomic, and Metabolomic Data Integration Strategies. *Biomark. Insights* 10s4, BMI.S29511. <https://doi.org/10.4137/BMI.S29511>
- Want, E.J., Masson, P., Michopoulos, F., Wilson, I.D., Theodoridis, G., Plumb, R.S., Shockcor, J., Loftus, N., Holmes, E., Nicholson, J.K., **2013**. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nat. Protoc.* 8, 17–32. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.135>
- Want, E.J., Wilson, I.D., Gika, H., Theodoridis, G., Plumb, R.S., Shockcor, J., Holmes, E., Nicholson, J.K., **2010**. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nat. Protoc.* 5, 1005–1018. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.50>
- Ward, E.J., Shumway, S.E., **2004**. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, VOLUME 300 Special Issue 300, 83–130. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.002>
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., Hühnerfuss, H., **2004**. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* 56, 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.015>
- Widdows, J., Donkin, P., Staff, F.J., Matthiessen, P., Law, R.J., Allen, Y.T., Thain, J.E., Allchin, C.R., Jones, B.R., **2002**. Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. *Mar. Environ. Res.* 53, 327–356. [https://doi.org/10.1016/s0141-1136\(01\)00120-9](https://doi.org/10.1016/s0141-1136(01)00120-9)
- Wille, K., Kiebooms, J.A.L., Claessens, M., Rappé, K., Vanden Bussche, J., Noppe, H., Van Praet, N., De Wulf, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De Brabander, H.F., Vanhaecke, L., **2011**. Development of analytical strategies using U-HPLC-MS/MS and LC-ToF-MS for the quantification of micropollutants in marine organisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 1459–1472. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4878-6>
- Winter, J.E., **1978**. A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. *Aquaculture* 13, 1–33. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90124-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90124-2)

- Wishart, D.S., Jewison, T., Guo, A.C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorn Dahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., Neveu, V., Greiner, R., Scalbert, A., **2013**. HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41, D801–D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>
- Wu, H., Southam, A.D., Hines, A., Viant, M.R., **2008**. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal. Biochem.* 372, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.002>
- Xia, J., Wishart, D.S., **2010**. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 2342–2344. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq418>
- Yahel, G., Marie, D., Beninger, P.G., Eckstein, S., Genin, A., **2009**. In situ evidence for pre-capture qualitative selection in the tropical bivalve *Lithophaga simplex*. *Aquat. Biol.* 6, 235–246. <https://doi.org/10.3354/ab00131>
- Yang, Y., Fu, J., Peng, H., Hou, L., Liu, M., Zhou, J.L., **2011**. Occurrence and phase distribution of selected pharmaceuticals in the Yangtze Estuary and its coastal zone. *J. Hazard. Mater.* 190, 588–596. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.092>
- Zhang, L., Hu, J., Zhu, R., Zhou, Q., Chen, J., **2013**. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3687–3698. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4170-5>
- Zhang, Y., Geißen, S.-U., Gal, C., **2008**. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>
- Zhou, B., Xiao, J.F., Tuli, L., Ransom, H.W., **2012**. LC-MS-based metabolomics. *Mol. Biosyst.* 8, 470–481. <https://doi.org/10.1039/c1mb05350g>
- Zhou, G., Li, S., Xia, J., **2020**. Network-Based Approaches for Multi-omics Integration, in: Li, S. (Ed.), *Computational Methods and Data Analysis for Metabolomics*, Methods in Molecular Biology. Springer US, New York, NY, pp. 469–487. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_23)
- Zouiten, A., Beltifa, A., Van Loco, J., Mansour, H.B., Reyns, T., **2016**. Ecotoxicological potential of antibiotic pollution—industrial wastewater: bioavailability, biomarkers, and occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 15343–15350. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6713-2>