



HAL
open science

Caractérisation des effets d'un anxiolytique (oxazépam) sur le cycle de vie d'un gastéropode d'eau douce, *Radix balthica*

Morgane Lebreton

► **To cite this version:**

Morgane Lebreton. Caractérisation des effets d'un anxiolytique (oxazépam) sur le cycle de vie d'un gastéropode d'eau douce, *Radix balthica*. Ecologie, Environnement. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30291 . tel-03332234

HAL Id: tel-03332234

<https://theses.hal.science/tel-03332234>

Submitted on 2 Sep 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

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Morgane LEBRETON

Le 18 décembre 2020

Caractérisation des effets d'un anxiolytique (oxazépam) sur le cycle de vie d'un gastéropode d'eau douce, Radix balthica.

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition**

Unité de recherche :

BTSB - Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives

Thèse dirigée par
Florence GERET et Elsa BONNAFE

Jury

Mme Céline BOULANGE-LECOMTE, Rapporteur

M. Patrice GONZALEZ, Rapporteur

Mme Farida AKCHA, Rapporteur

M. Alain GEFFARD, Examineur

Mme Florence GERET, Directrice de thèse

Mme Elsa BONNAFE, Co-directrice de thèse

Résumé

La contamination environnementale par les médicaments est une préoccupation majeure de ces dernières décennies. Les antibiotiques et les hormones ont été au cœur de l'attention mais certaines familles de médicaments ne font encore l'objet que de très peu d'études. C'est notamment le cas des psychotropes, et particulièrement des anxiolytiques. L'oxazépam, médicament fréquemment utilisé dans le traitement de l'anxiété et métabolite de nombreuses benzodiazépines, est l'un des psychotropes les plus fréquemment détectés dans les eaux de surface. Cette molécule a fait l'objet depuis quelques années, de plusieurs études écotoxicologiques qui se sont essentiellement focalisées sur les perturbations du comportement chez le poisson. Cependant, très peu d'études se sont encore intéressées à ses effets sur les invertébrés aquatiques. Ainsi, cette thèse a pour objectif d'évaluer l'impact de concentrations environnementales d'oxazépam sur le cycle de vie d'un gastéropode d'eau douce ubiquitaire en Europe, *Radix balthica*. Nous nous sommes demandé si, et comment l'oxazépam affectait trois étapes clés de la vie de l'organisme : la reproduction, le développement embryonnaire et la croissance, en couplant des approches physiologiques, comportementales et moléculaires. Ce travail se présente donc en trois volets, correspondant aux trois étapes du cycle de vie (reproduction, développement embryonnaire et croissance). Pour chacun des trois volets, des expérimentations ont été menées en exposant les organismes à des concentrations d'oxazépam maximales mesurées en sortie d'effluents (10 µg/L) et en rivière (0,8 µg/L). Plusieurs paramètres physiologiques (e.g. état de l'appareil reproducteur, fertilité, taux d'éclosion, croissance, prise alimentaire) et comportementaux (e.g. interactions sociales, locomotion) ont été analysés pour répondre aux questions posées. Les parties axées sur l'embryogénèse et la croissance ont fait l'objet d'une analyse transcriptomique afin d'obtenir des informations sur les potentiels mécanismes de toxicité impliqués au niveau moléculaire. Au stade adulte, l'oxazépam affecte la reproduction en augmentant la densité de spermatozoïdes à forte concentration (10 µg/L) et diminue la quantité d'œufs par ponte à faible concentration (0,8 µg/L). Une diminution de l'activité locomotrice a également été observée pour les deux concentrations d'oxazépam testées. Les études menées sur le stade embryonnaire ont montré une variabilité inter-population importante qui ne permet pas de conclure sur de potentiels effets de l'oxazépam. Enfin, en ce qui concerne le stade juvénile, les résultats ont montré un effet important de l'oxazépam sur la prise alimentaire, avec un effet stimulant à faible concentration et inhibiteur à forte concentration. Il a également été montré une réduction de la mortalité après exposition à la plus faible concentration d'oxazépam. L'analyse transcriptomique ciblée a permis de mettre en évidence une sous-expression globale de gènes impliqués dans la transmission nerveuse et liés à différentes fonctions comme le comportement alimentaire, la croissance, la locomotion ou encore la chémoréception. L'ensemble de ces résultats nous permet d'enrichir les connaissances toxicologiques quant aux effets de l'oxazépam sur un invertébré aquatique.

Mots clés : Ecotoxicologie aquatique, Psychotrope, Gastéropode, Reproduction, Développement, Analyse transcriptomique

Abstract

Freshwater contamination by pharmaceuticals is becoming a major concern over the last decades. Antibiotics and hormonal treatments have been the focus of attention but some pharmaceutical families are not subject to many studies yet. This is especially true for psychoactive drugs, and particularly anxiolytics. Among anxiolytics, oxazepam is one of the most frequently detected psychotropic in surface waters in connection with its high consumption but also to its status of metabolite of many benzodiazepines. This molecule has been subject to some ecotoxicological studies mainly focused on behavioural disturbance in fish. However, very few studies are interested in its effects on aquatic invertebrates. Thus, this thesis aims to assess the impact of environmental relevant oxazepam concentrations on the life cycle of a freshwater gastropod widespread in Europe, *Radix balthica*. We asked if and how oxazepam affected three important steps of the life of this organism: reproduction, embryonic development and growth, coupling physiological, behavioural and molecular approaches. This work consists into three parts, corresponding to the three steps previously described (reproduction, embryonic development and growth). For each of these stages, organisms have been exposed to relevant oxazepam concentrations: 10 µg/L corresponding to the maximal concentration found in STEP effluents and 0.8 µg/L corresponding to the maximal concentration found in river. Numerous physiological (e.g. reproductive apparatus state, fertility, hatching rate, growth, feeding rate) and behavioral parameters (e.g. social interactions, locomotion) have been tested to answer the question raised. Studies on embryogenesis and growth have been completed by a transcriptomic analysis to bring information on potential toxicity mechanisms at molecular level. Results showed that, at the adult stage (reproduction), oxazepam increased spermatozoa density at high concentration (10 µg/L) and decreased the number of eggs per eggmass at low concentration (0.8 µg/L). A decrease of the locomotor activity has also been observed for both oxazepam concentrations. Studies led on the embryonic stage showed a high inter-population variability which did not allow conclusions on potential effects of oxazepam. Finally, concerning the juvenile stage, results showed a significant effect of oxazepam on feeding rate with an activator effect at low concentration and an inhibitory effect at high dose. A reduction of mortality after exposure has also been demonstrated at the lowest concentration. Transcriptomic analysis revealed a global under-expression of genes involved in neural transmission linked to many functions, such as feeding behavior, growth, locomotion or chemoreception. Taken together, these results enhance the ecotoxicological knowledge of oxazepam impact on an aquatic invertebrate.

Keywords: Aquatic ecotoxicology, Psychotropic drug, Gastropoda, Reproduction, Development, Transcriptomic analysis

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes directrices de thèse, Florence Géret et Elsa Bonnafé. Florence, un immense merci pour ta bienveillance, la confiance que tu as su m'accorder et tes conseils toujours avisés. Elsa, un grand merci pour ton suivi et ton expertise, notamment du point de vue moléculaire. Merci à toutes les deux de m'avoir laissé de la liberté pour mener ce projet. J'ai vraiment apprécié de travailler avec vous durant des trois années.

Je tiens à remercier particulièrement Céline Boulangé-Lecompte, Patrice Gonzalez et Farida Akcha de m'avoir fait l'honneur d'accepter de prendre du temps pour examiner et critiquer mon travail de thèse. Merci également à Alain Geffard d'avoir accepté d'être examinateur.

Une pensée particulière à mes encadrants de stage de Master, Aïcha Badou, Rossana Sussarellu, Guillaume Rivière et Elise David. Vous avez contribué à mon apprentissage dans le monde de la recherche et à l'aboutissement de ces nombreuses années d'études. Merci à tous, je vous en suis très reconnaissante.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard, Marie-Agnès Coutellec et Jean Armengaud pour avoir été présents lors de ces deux comités très enrichissants. Merci pour vos conseils avisés et votre expertise qui m'ont permis, notamment en début de thèse, de libérer des points de blocage et de commencer sereinement cette étude.

Merci également à Michel Treillhou pour ton accueil chaleureux au sein du laboratoire BTSB, ta disponibilité (et tes soirées flambadou !). Un grand merci à Jean-Michel Malouyres, notre Mac Gyver du labo, pour ton soutien technique tout au long de cette aventure. Sans toi, les campagnes de prélèvement n'auraient pas été aussi agréables et efficaces. Je tiens à te remercier profondément pour ta bonne humeur, tes idées lumineuses et pour le temps passé à l'atelier quand l'envie me prenait de vouloir créer un nouveau système d'expérimentation. Merci également de t'être occupé de mes escargots, surtout ces derniers mois, que j'ai, il faut le dire, lâchement abandonné. Je tiens également à remercier Jean-Luc Carayon, pour toutes ces heures passées à mettre au point la méthode d'extraction puis à doser mes échantillons d'eau. Un grand merci également à Caroline Vignet, d'avoir pris le temps de me conseiller,

notamment pour les analyses de comportement. Tu as été d'une aide précieuse. Merci également aux autres membres du labo, Pierre Marty, Nathan Téné et Alice Fournier, merci pour l'ambiance chaleureuse et conviviale que vous apportez toutes et tous au labo!

Je souhaite également remercier Delphine Dos Santos de tout mon coeur pour son immense gentillesse et pour son aide et sa disponibilité lorsque j'ai dû utiliser ses salles pour des manip ou pour l'encadrement des TP. Merci également à Valérie Fernandez et Karen Chevallier pour votre réactivité et votre gentillesse.

Alice Saunier, merci pour ton aide précieuse pour les extractions d'ARN, tes conseils avisés et nos petits délires de fin de journée, lorsque la fatigue se fait sentir. J'espère seulement que les photos dossiers ne seront pas trop divulguées ! Ce congrès à Charleston restera gravé dans mes souvenirs.

Ces trois années ont été très riches en belles rencontres et en amitiés. Il y a peu de doctorants et post-docs à Champollion, mais une sacrée équipe s'est formée en quelques années ! Je commencerai par les « anciens », Marion et Vincent, les piliers de la jeunesse de BTSB ! Merci à vous deux, pour votre bienveillance, vos conseils et pour les potins ! Je tiens à vous exprimer mon admiration pour votre force et votre détermination. Une petite pensée pour notre rayon de soleil, notre Zoé internationale qui nous a apporté joie et tendresse à chacune de ses venues au labo. Axel, merci de m'avoir fait découvrir cet univers de la myrmécologie, maintenant, je sais qu'on pourrait assaisonner tous les plats avec des fourmis différentes ! Mickal, merci pour ton grain de folie et tes merveilleuses histoires personnelles qui nous ont bien fait rire durant quelques mois. Ensuite, à toute notre génération de doctorants, Valentine, Lucie, Manon, Ludo, Charlotte, Eugénie et aux nouveaux venus, Steven et Ibtissam, un immense merci pour tous ces moments passés ensemble, surtout au bar, certes, mais pas que ! Valentine, tes « ça serait pas un temps à mojito ?? » vont me manquer, je te souhaite que du bonheur pour la suite ! Lucie, ma chère collègue écotox, ne t'en fait pas, tout se passera bien pour ta dernière année, tu pourras toujours contacter ton « encadrante » en cas de besoin ! Manon, je te remercie profondément pour ton écoute et pour tes encouragements, notamment ces derniers mois. J'espère vous revoir tous très bientôt, peut être en Bretagne !!

J'aimerais également remercier les stagiaires que j'ai encadré au cours de ces trois ans de thèse, notamment Sacha Sire qui m'a grandement aidé dans l'analyse de données. Je vous souhaite à tous plein de réussite pour la suite.

Enfin, je remercie chaleureusement ma famille et ma belle famille qui m'ont peu vu ces dernières années mais qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans ce projet, depuis le temps que je voulais faire de la « recherche de trouvation » !! Peut-être ce manuscrit ou la soutenance vous aideront à comprendre réellement pourquoi j'ai sacrifié toutes ces « cagouilles ».

Je voudrais finir par mon cher et tendre, Manu, celui qui m'a supporté, encouragé et soutenu sans failles pendant ces trois années et jusqu'à la dernière minute. Tu es mon pilier et je ne te remercierai jamais assez pour ta bienveillance, ton soutien et ton amour. Merci de m'avoir suivi dans cette aventure, et dans toutes celles que nous réserve la suite !

Liste des communications

Posters :

- Colloques nationaux :
 - ✓ **SEFA** – Montpellier – Juin 2018 : « Vers une meilleure compréhension des effets de l'oxazepam sur la mobilité, la reproduction et sur l'embryogénèse de deux espèces d'eau douce non modèles » M. Lebreton, A. Saunier, J-Y. Mazzitelli, J-M. Malgouyres, L. Charron, E. Bonnafé, F. Géret.
 - ✓ **EcoBim** – Sousse (Tunisie) – Avril 2019 : « Etude de la réponse physiologique et transcriptomique des embryons du gastéropode aquatique *Radix balthica* suite à une exposition à un anxiolytique » M. Lebreton, A. Saunier, J-M. Malgouyres, E. Bonnafé, F. Géret.
- Colloques internationaux :
 - ✓ **SFE²** – Rennes – Octobre 2018 : « Effects of an anxiolytic drug on embryogenesis, growth and locomotion of a non-model freshwater gastropod » M. Lebreton, A. Saunier, J-M Malgouyres, E. Bonnafé, F. Géret.
 - ✓ **PRIMO** – Charleston, SC (USA) – Mai 2019 : « What kind of effects is induced by an anxiolytic drug on embryogenesis of a freshwater gastropod? Macroscopic and transcriptomic analysis » M. Lebreton, A. Saunier, J-M Malgouyres, E. Bonnafé, F. Géret.

Communications orales :

- Colloques nationaux :
 - ✓ **GdR Ecotoxicologie aquatique** – Antony – Décembre 2018 : « Effets d'un anxiolytique sur l'embryogénèse, la mobilité et la croissance d'un gastéropode d'eau douce non modèle » M. Lebreton, J-Y Mazzitelli, E. Bonnafé, F. Géret
 - ✓ **GdR Ecotoxicologie aquatique** – Bordeaux – Novembre 2019 : « Evaluation des effets de l'oxazepam sur le gastéropode d'eau douce *Radix balthica* : couplage d'approches comportementale, physiologique et transcriptomique » M. Lebreton, S. Sire, J-M Malgouyres, C. Vignet, E. Bonnafé, F. Géret
- Colloques internationaux :
 - ✓ **PRIMO** – Charleston, SC (USA) – Mai 2019 : « Does the genitor lifestyle of the freshwater gastropod *Radix balthica* affect oxazepam sensitivity of embryos? » M. Lebreton, A. Saunier, C. Vignet, E. Bonnafé, F. Géret

Vulgarisation scientifique :

- Interview CFM Radio - Emission le Mag 81 (mars 2019) : « Résidus de médicaments dans l'eau » Morgane Lebreton et Alice Saunier
- Pause café - pause musée (mars 2019) : « Devenir de médicaments en eau douce : quels impacts sur la faune aquatique ? » Morgane Lebreton et Alice Saunier - Muséum d'Histoire Naturelle de Gaillac
- Nuit Européenne des Chercheurs 2018 - Top chrono pour ma thèse : « Pour les escargots, pas besoin de psy, un bain suffit ! » - Cinéma CGR les Cordeliers, Albi

Table des matières

LISTE DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION GENERALE	9
PARTIE 1 : ETAT DE L'ART	12
I - Les médicaments psychotropes : de l'homme au milieu aquatique	12
A) Les différentes classes de psychotropes	12
B) Consommation des psychotropes	13
C) Traitement des psychotropes au niveau des STEP	17
D) Concentration des psychotropes au niveau des STEP	21
E) Concentrations des psychotropes dans le milieu aquatique	23
F) Facteurs de dégradation et persistance dans le milieu aquatique	25
II - Les benzodiazépines : mécanismes d'action, métabolisation et toxicité	26
A) Structure des benzodiazépines	26
B) Mécanismes d'action des benzodiazépines	28
C) Métabolisation et demi-vie des benzodiazépines dans l'organisme cible	30
D) Propriétés pharmacologiques et effets secondaires des benzodiazépines chez les mammifères	32
E) Effets connus des benzodiazépines sur les organismes aquatiques non cibles	33
1. Effets des benzodiazépines sur les vertébrés aquatiques	33
2. Effets des benzodiazépines sur les invertébrés aquatiques	35
III – Description de l'organisme d'étude : <i>Radix balthica</i>	36
A) Généralités	36
B) Reproduction de <i>Radix balthica</i> : de la gamétogénèse à la ponte	39
C) Caractérisation du développement embryonnaire	43
D) Caractérisation du stade juvénile	45
E) Utilisation de <i>Radix balthica</i> comme organisme d'étude	46
IV - Objectifs de la thèse	47
PARTIE 2 : IDENTIFICATION DES EFFETS DE L'OXAZEPAM SUR <i>RADIX BALTHICA</i>	49
Préambule : Caractérisation génétique de l'espèce <i>Radix balthica</i>	50

I -	Introduction	50
II -	Méthodologie	50
	A) Sélection des individus à analyser.....	50
	B) Extraction ADN.....	51
	C) PCR avec couple d’amorces dégénérées.....	52
	D) Vérification de l’amplification et purification de l’amplicon d’intérêt.....	53
	E) Construction de l’arbre phylogénétique	53
III -	Résultats de la caractérisation génétique	53

Chapitre I : Effets de l’anxiolytique oxazépam sur la reproduction d’un gastéropode d’eau douce : une étude prospective..... 55

Article 1 : Effects of the anxiolytic benzodiazepine oxazepam on freshwater gastropod reproduction: a prospective study 59

I -	Introduction	61
II -	Materials and methods.....	63
	A) Test organisms	63
	B) Experimental design.....	64
	C) Water contamination.....	65
	D) Growth monitoring	65
	E) Reproductive organ status and spermatozoon counts	66
	F) Behavioural analysis during initial encounters with other snails.....	67
	G) Monitoring of fecundity and fertility	67
	H) Locomotion assessment.....	68
	I) Statistical analysis	68
III -	Results	68
	A) Chemical analysis	68
	B) Growth monitoring	69
	C) Organization and development of the reproductive system	70
	D) Reproductive organ status and spermatozoon counts	70
	E) Behavioral analysis during initial encounters with other snails.....	72
	F) Monitoring of fecundity and fertility	72
	G) Locomotion assessment.....	74
IV -	Discussion	74
V -	Conclusion	78

Chapitre II : Effets de l'oxazépam sur l'embryogénèse de <i>R. balthica</i>	85
I - Introduction.....	86
II - Matériels et méthodes	88
A) Détermination des moments clés pour l'analyse des accélérations de rotation et des battements cardiaques	88
B) Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de différentes populations de géniteurs.....	89
C) Etude des fenêtres de sensibilité des embryons face à l'oxazépam.....	91
D) Effets de l'oxazépam sur l'expression de gènes impliqués dans la signalisation calcique, l'interaction cellule/MEC et la détoxification	92
III - Détermination des moments clés pour l'analyse des accélérations de rotation et des battements cardiaques.....	94
A) Détermination des fenêtres temporelles pour l'étude des accélérations de rotation	94
B) Détermination des fenêtres temporelles pour l'étude des battements cardiaques	97
IV - Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de différentes populations de géniteurs.....	98
A) Analyse préliminaire de la caractérisation des effets de l'oxazépam sur les embryons.....	98
B) Comparaison des effets de l'oxazépam sur des embryons issus de géniteurs d'élevage et sauvages.....	100
C) Effets d'une exposition parentale sur l'embryogénèse	104
D) Analyse globale des expositions menées sur les embryons de <i>R. balthica</i>	106
V - Etude des fenêtres de sensibilité des embryons face à l'oxazépam	108
VI - Effets de l'oxazépam sur l'expression de gènes impliqués dans la signalisation calcique, l'interaction cellule/MEC et la détoxification.....	109
VII - Conclusion	113

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez <i>R. balthica</i> juvéniles après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam.....	114
--	-----

Article 2 : <i>Low concentrations of oxazepam induce feeding and molecular changes in Radix balthica juveniles</i>	117
--	-----

I - Introduction.....	119
II - Materials and methods.....	121
A) Test organisms	121
B) Experimental design.....	121
C) Chemical analysis	122
D) Feeding rate	123
E) Locomotion	123
F) RNA extraction and RT-qPCR	123

G)	Statistics	125
III -	Results	126
A)	Water concentrations	126
B)	Impact of oxazepam exposure on survival rate	126
C)	Impact of oxazepam exposure on feeding rate	127
D)	Impact of oxazepam exposure on shell growth and wet weight	128
E)	Impact of oxazepam exposure on locomotion	129
F)	Transcriptomic analysis.....	130
IV -	Discussion	133
V -	Conclusion	138
	Chapitre IV : Bilan général et perspectives	153
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____	157
	ANNEXE 1 : ALIGNEMENT DE SEQUENCES DU CYT-B DES ESPECES DU GENRE RADIX_____	180
	ANNEXE 2 : ARBRE PHYLOGENETIQUE COMPLET ISSUS DE L'ALIGNEMENT DE SEQUENCES	
	_____	185

Liste des figures

Partie 1 : Etat de l'art

<i>Figure 1-1 : Consommation d'antidépresseurs entre 2000 et 2011 par les 23 pays de l'OCDE (OCDE, 2013).</i>	15
<i>Figure 1-2 : Prévalence des remboursements des médicaments psychotropes en 2017 selon l'âge et le sexe (en pourcentage) (OFDT, 2019).</i>	16
<i>Figure 1-3 : Niveaux de consommation des benzodiazépines dans huit pays européens (exprimé en Dose Définie Journalière/1000 habitants/jour) entre 2012 et 2015 (ANSM, 2017).</i>	17
<i>Figure 1-4 : Voies d'introduction des médicaments psychotropes dans les eaux continentales (modifié d'après ANSES (2011)).</i>	18
<i>Figure 1-5 : Exemple de fonctionnement d'une station d'épuration classique (modifié d'après Encyclopaedia Britannica).</i>	19
<i>Figure 1-6 : Structure principale des benzodiazépines. Les labels « R » dénotent des chaînes latérales, donnant aux différentes benzodiazépines leur propriété.</i>	27
<i>Figure 1-7 : Structure de l'oxazépam</i>	27
<i>Figure 1-8 : Représentation schématique du récepteur GABA_A. Les deux sites de liaison des molécules de GABA sont situés entre les sous unités α et β, tandis que le site de liaison des benzodiazépines se situe entre les sous unités α et γ (source : what-when-how.com).</i>	29
<i>Figure 1-9 : Mode d'action des benzodiazépines au niveau des synapses gabaergiques.</i>	30
<i>Figure 1-10 : Valeurs des demi-vies de plusieurs benzodiazépines (d'après Greenblatt and Shader (1985)).</i>	31
<i>Figure 1-11 : Voies métaboliques de plusieurs benzodiazépines. Les molécules encadrées correspondent aux benzodiazépines commercialisées (modifié d'après Dinis-Oliveira (2017) et Mandrioli et al. (2008)).</i>	32
<i>Figure 1-12 : Distribution de l'espèce Radix balthica (Seddon et al., 2014).</i>	37
<i>Figure 1-13 : Radix balthica (photographies personnelles).</i>	38
<i>Figure 1-14 : Ponte de Radix balthica. Les œufs sont regroupés au sein d'une gangue gélatineuse (photographie personnelle).</i>	39
<i>Figure 1-15 : Anatomie de l'appareil reproducteur des Lymnaeidae. ag : glande albumen, ng : glande nidamentaire, od : ovispermiducte, ot : ovotestis, ov : oviducte, pr : prostate, ps : complexe pénial, sd : spermiducte, sp : spermathèque, va : vagin. Echelle : 1 mm (d'après Samadi et al., 2000).</i>	40
<i>Figure 1-16 : Caractérisation du comportement copulatoire (A) et de ponte (B) chez Lymnaea stagnalis (d'après Koene, 2010)</i>	41
<i>Figure 1-17 : Schéma indiquant les ganglions du système nerveux. Les points bleus et rouges représentent les clusters impliqués dans la reproduction mâle et femelle respectivement. Les substances impliqués dans la reproduction mâle sont indiquées en bleu tandis que les substances impliquées dans le comportement femelle</i>	

sont indiquées en rouge. Com : commissure cérébrale, icn : nerf cervical inférieur, ni : nerf intestinal, np : nerf périal, RN, anneau ganglionnaire, RpeN : neurone pédieux droit, st : statocyste (d'après Koene, 2010). 42

Figure 1-18 : Les grandes étapes de l'embryogénèse de *Radix balthica* (photographies personnelles)..... 43

Figure 1-19 : Photographie de microscopie électronique d'un embryon de *Helisoma trivolvis* au stade trochophore en vue antérieure (A) et latérale droite (B). Les bandes ciliaires dorsolatérales sont indiquées par des flèches et la bande ventrale est indiquée par un astérisque. Echelle : 50 μm (d'après Diefenbach et al., 1991). 44

Partie 2 : Identification des effets de l'oxazépam sur *Radix balthica*

Préambule : Caractérisation génétique de l'espèce *Radix balthica*

Figure 2-1 : Arbre phylogénétique du genre *Radix* basé sur la méthode du Maximum de Parsimonie de fragments séquencés du marqueur mitochondrial cyt-b (240 pb, longueur de l'arbre : 305, indice de consistance : 0,685, indice de rétention : 0,896). L'arbre a été réalisé en utilisant l'algorithme de Subtree-Pruning-Regrafting dans lequel l'arbre initial a été obtenu par additions aléatoires de séquences (1000 réplicats). 54

Chapitre I : Effets de l'anxiolytique oxazépam sur la reproduction d'un gastéropode d'eau douce : une étude prospective

Figure 2-I-1 : Mise en œuvre du protocole d'expérimentation pour analyser les effets de l'oxazépam sur la reproduction de *Radix balthica*. 57

Figure 2-I-2 : Drawing of the isolation system which consisted of a Perspex slab mounted on feet, into which holes were drilled. Tubes ending in a grid at the bottom were inserted into each hole. Each juvenile was allowed a volume of 57 cm³ and each system was covered with wire mesh to prevent the animals from escaping. The isolation system was then partially submerged in a 50 L aquarium filled with 16 L ISO 6431 water. 64

Figure 2-I-3 : Change in adult shell length (mm) after (black open circles) and during the experiment (gray zone). Individuals were measured from week 6 post hatching, at two-week intervals until exposure (week 12 post hatching). During the exposure period, adults were measured at the start of exposure (week 12 post hatching, n = 33), on transfer to glass jars (week 15 post hatching, n = 33) and at the end of experiment (week 20, n = 24). Error bars indicate the mean \pm SEM..... 69

Figure 2-I-4 : Effects of oxazepam on reproductive organ status and spermatozoon density for each set of conditions (n=8 individuals per set of conditions). a) Weight of reproductive organs (in mg), b) area of ovotestis (in mm²). Bars and error bars indicate the mean \pm SEM. c) Number of spermatozoa per unit area of the ovotestis. The lower, central and upper horizontal bars of the boxes indicate the 1st, 2nd (median) and 3rd quartiles, respectively. Black diamonds represent the mean number of spermatozoa. 71

Figure 2-I-5 : Analysis of adult social behavior after a long period of isolation. a) Proportion of each class of social interaction (very short: < 5 min, short: 5-10 min, medium: 15-40 min and long: > 45 min) relative to the total of new interactions occurring in all glass jars per condition and for each hour of the monitoring. b) Focus on the first hour of meeting. Box plot represents the total time of interactions (all mixed) occurred in each glass jars (n = 5) for each condition. The lower, central and upper horizontal bars of the boxes indicate the 1st, 2nd (median) and 3rd quartile respectively. Black diamonds represent the mean. 72

Figure 2-I-6 : Effects of oxazepam exposure on fecundity and fertility. a) Mean number of eggs laid per adult for each week after transfer to glass jars and for each set of conditions. b) Mean number of eggs per egg mass for each week after transfer to glass jars and for each set of conditions. c) Mean number of egg masses laid per adult for each week after transfer to glass jars and for each set of conditions. d) Hatching rate (18 days post-fertilization). Bars and error bars represent the mean ± SEM..... 73

Figure 2-I-7 : Mean distance moved per snail during each hour of monitoring and for each oxazepam concentration (n = 5 to 7 snails). Letters represent statistically different groups. Error bars indicate the SEM. .. 74

Figure 2-I-8 : a) Identification of the reproductive apparatus of Radix balthica. The female organs consisted of the oviduct (oothecal gland), nidamental gland (uterus) and albumen gland. The mature albumen gland was graybeige in color and kidney-shaped, whereas the oviduct and nidamental were cream-colored. The male part of genital tract consisted of the prostate (pear-shaped and beige with black spots), vas deferens and penial complex. b) Organ maturity as a function of shell length. The ovotestis was visible in all individuals of at least 6.2 mm in length. The male organs (penial complex and prostate) were present and had their mature shape and color in all individuals. The female organs (oviduct, nidamental gland and albumen gland) were still forming in the smallest snails and took on their mature form and color only in snails of at least 7 mm in length. 84

Figure 2-I-9 : Effects of oxazepam on the area (mm²) of male reproductive organs: a) prostate gland and b) penis, for each set of conditions (n=8 individuals per set of conditions). Bars and error bars indicate the mean ± SEM 84

Chapitre II : Effets de l'oxazepam sur l'embryogénèse de *Radix balthica*

Figure 2-II-1 : Schéma résumant les conditions expérimentales de chacune des quatre expérimentations embryotoxicologiques. Pour l'analyse préliminaire, réalisée sur des embryons issus de géniteurs sauvages, les accélérations de rotations ont été comptées en direct (sans enregistrement vidéo). Pour le suivi des battements cardiaques, les gangues ont été pressées entre deux lames et le suivi d'éclosion a été stoppé après 15 jours de développement. Pour les trois autres expérimentations, l'unique différence entre elles provient des géniteurs ; la seconde expérimentation a été réalisée à partir de géniteurs d'élevage, la troisième, à partir de géniteurs sauvages et pour la quatrième, les géniteurs d'élevages ont été préalablement exposés à la molécule. Pour chacune des trois dernières expériences, les accélérations de rotations ont été filmées, les gangues n'ont pas été écrasées pour le suivi des battements cardiaques et le suivi d'éclosion a duré 18 jours. 91

<i>Figure 2-II-2 : Schéma indiquant les différentes conditions d'exposition. Les rectangles en hachurés correspondent aux périodes d'exposition tandis que les rectangles vides correspondent aux périodes d'incubation en eau saine.</i>	92
<i>Figure 2-II-3 : Grandes fonctions ciblées pour l'analyse en PCR quantitative. Le nombre de gènes ciblés est indiqué sous chaque fonction.</i>	93
<i>Figure 2-II-4 : Suivi temporel du nombre d'accélération de rotations des embryons de R. balthica aux stades a) E20, b) E25, c) E30 (stades selon McKenney and Goldberg, 1989).</i>	95
<i>Figure 2-II-5 : Suivi temporel des battements cardiaques des embryons de R. balthica aux stades a) 26, b) 27, c) 28 (stades selon Mescheriakov (1990)).</i>	97
<i>Figure 2-II-6 : Caractérisation des effets de l'oxazépam sur les embryons. a) Nombre d'accélération de rotation par minute pour chaque condition d'exposition à l'oxazépam (n=60, moyenne ± SEM). b) Fréquence cardiaque enregistrée pour chaque condition (n=35, moyenne ± SEM). c) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J8 et J15 pour chacune des conditions (n=4, moyenne ± SEM). d) Temps moyen d'éclosion (jours). Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. * : P < 0,05 ; *** : P < 0,001.....</i>	99
<i>Figure 2-II-7 : Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de géniteurs d'élevage. a) Nombre d'accélération de rotation par minute pour chaque condition d'exposition à l'oxazépam (n=65, moyenne ± SEM). b) Fréquence cardiaque enregistrée pour chaque condition (n=45, moyenne ± SEM). c) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J8 et J18 pour chacune des conditions (n=11, moyenne ± SEM). d) Temps moyen d'éclosion (jours). Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. + : P < 0,1.</i>	101
<i>Figure 2-II-8 : Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de géniteurs sauvages. a) Nombre d'accélération de rotation par minute (moyenne ± SEM) pour chaque condition d'exposition à l'oxazépam (n=65). b) Fréquence cardiaque enregistrée pour chaque condition (n=45, moyenne ± SEM). c) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J8 et J18 pour chacune des conditions (n=11, moyenne ± SEM). d) Temps moyen d'éclosion (jours). Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. ** : P < 0,01.</i>	102
<i>Figure 2-II-9 : Effets d'une exposition parentale sur l'embryogénèse. a) Nombre d'accélération de rotation par minute (moyenne ± SEM) pour chaque condition d'exposition à l'oxazépam (n=65). b) Fréquence cardiaque enregistrée pour chaque condition (n=45, moyenne ± SEM). c) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J8 et J18 pour chacune des conditions (n=11, moyenne ± SEM). d) Temps moyen d'éclosion (jours). Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. * : P < 0,05.</i>	106
<i>Figure 2-II-10 : Etude des fenêtres de sensibilité des embryons face à l'oxazépam. a) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J11 et J18 pour chacun des types d'exposition (n=4). b) Temps moyen d'éclosion (jours) pour chacun des types d'exposition. Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale.</i>	108

Figure 2-II-11 : Heatmap montrant les niveaux d'expression aux stades a) pré-éclosion et b) post-éclosion pour chaque gène et pour chaque concentration d'oxazépam, normalisés par rapport aux niveaux d'expression du gène de référence (RPL18). Les gradients de couleurs du bleu au rouge représentent les sous et sur-expression respectivement. Les lettres correspondent aux différences significatives entre les conditions. Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. 112

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* juvéniles après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

Figure 2-III-1 : Schéma récapitulatif des paramètres analysés au cours de l'expérimentation sur les juvéniles. 115

Figure 2-III-2 : Survival rate throughout the experiment (n = 40 individuals per condition). Letters show variations between conditions. 127

Figure 2-III-3 : Food consumption (consumed surface) for each week of oxazepam exposure (n = 40 individuals per condition). Error bars indicate the mean \pm SE of the mean. Stars represent significant differences between conditions for the same week. **P < 0.01, ***P < 0.001. 128

Figure 2-III-4 : Growth rate of the shell (mm per week) for each concentration of oxazepam (n = 40 individuals per condition). Error bars indicate the mean \pm SE of the mean. 129

Figure 2-III-5 : Sum of the distance travelled (mm) by juveniles placed in Petri dishes for 8 min for each concentration (n = 9 to 12 individuals per condition). Points and error bars indicate the mean and the SE of the mean, respectively. 130

Figure 2-III-6 : Shell length (in mm) for each concentration of oxazepam (n = 40 individuals per condition). Error bars indicate the mean \pm SE of the mean. 145

Figure 2-III-7 : Consumed surface (in cm²) for each week of oxazepam exposure (n = 40 individuals per condition). Error bars indicate the mean \pm SE of the mean. Stars represent significant differences between conditions for the same week. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. 145

Figure 2-III-8 : Pie chart showing the number and the part of genes differentially expressed in 'Followed' and 'Non-followed' group, in both of groups and the part of non-differentially expressed genes. 146

Figure 2-III-9 : A: Partial nucleotide and deduced amino acid sequences of *Radix balthica* Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta. Partial nucleotide sequence has been isolated with a RT-PCR approach using primers (forward: GGTCATGTGCTTCGCTTCG, reverse: CGCGGGATCTTCACCTTGAT) designed based on *Lymnaea stagnalis* (X58638.1), *Biomphalaria glabrata* (XM_013214518.1) and *Ambigolimax valentianus* (AB473944.1) gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta sequences and direct sequencing of cleaned PCR product (Genoscreen, Lille, France). B : Alignment of deduced amino acid sequences of *Radix balthica* with *Lymnaea stagnalis* GABA receptor subunit beta (accession number : P26714). Identical residues are highlighted in black and similar residues in grey. Nucleotide sequence and the deduced open reading frame has been edited with showorf available on emboss explorer (<http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>). Alignment has been performed on seaview v3.2 software using clustalw alignment program and edited with boxshade v3.31. 147

Liste des tableaux

Partie 1 : Etat de l'art

<i>Tableau 1-1 : Distribution des ventes de produits médicamenteux brevetés (en pourcentage) selon le groupe thérapeutique, dans plusieurs pays, en 2012 (modifié d'après CEPMB, 2015).</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 1-2 : Concentrations (en ng/L) en entrée et sortie de STEP (urbaine ou hospitalière) de différentes molécules psychotropes appartenant aux familles des anxiolytiques, antidépresseurs et antiépileptiques. Les taux d'abattement (efficacité d'élimination au niveau des STEP) sont indiqués quand ils sont précisés dans l'étude.</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 1-3 : Concentrations (en ng/L) de différentes molécules psychotropes appartenant aux familles des anxiolytiques, antidépresseurs et antiépileptiques détectées en rivière.</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 1-4 : Benzodiazépines (ou apparentées) commercialisées en France en 2015 (ANSM, 2017).</i>	<i>28</i>

Partie 2 : Identification des effets de l'oxazépam sur *Radix balthica*

Préambule : Caractérisation génétique de l'espèce *Radix balthica*

<i>Tableau 2-1 : Caractéristiques des individus sélectionnés pour la caractérisation génétique</i>	<i>50</i>
<i>Tableau 2-2 : Programme PCR utilisé lors de l'amplification des fragments d'intérêt.</i>	<i>52</i>

Chapitre II : Effets de l'oxazépam sur l'embryogénèse de *Radix balthica*

<i>Tableau 2-II-1 : Tableau récapitulatif des taux de base (moyenne \pm SEM) pour chaque paramètre analysé et pour chaque population d'embryon. Les effets de l'oxazépam observés sont notés entre parenthèses. * : $P < 0,05$; *** : $P < 0,001$.</i>	<i>103</i>
---	------------

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* juvéniles après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

<i>Table 2-III- 1 : Water concentrations of oxazepam (mean (SD), n = 2) used to expose juvenile pond snails after the renewal of the medium (day 0) and after a week (day 7).</i>	<i>126</i>
--	------------

*Table 2-III-2 : Fold changes of differentially expressed genes after oxazepam exposure at 0.8 or 10 µg/L of juveniles not followed for locomotion after 28 days. Genes were classified according to their function (nervous system, muscle and ciliary structure, digestive system, detoxification, and cell communication). Results are presented as mean fold changes (± SE), n = 9 per condition. Significance versus control: +P < 0.1, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. The colour code from beige to dark orange indicates upregulated genes and from light blue to dark blue downregulated genes.....* 131

*Table 2-III-3 : Fold changes of differentially expressed genes after oxazepam exposure at 0.8 or 10 µg/L of juveniles followed for locomotion after 28 days. Genes were classified according to their function (nervous system, muscle and ciliary structure, digestive system, and detoxification). Results are presented as mean fold changes (± SE), n = 9 per condition. Significance versus control: +P < 0.1 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. The colour code from beige to dark orange indicates upregulated genes and from light blue to dark blue downregulated genes.....* 132

Table 2-III-4 : Primer sequences (forward and reverse) used for RT-qPCR and their efficiencies. Primers were designed using Primer 3 software (v 4.1.0). 147

Table 2-III-5 : P. values of the side by side comparison (Mann Whitney U test) between 'Followed' and 'Not-Followed' groups. The control condition has been compared for all genes and exposed conditions have been compared for genes differentially expressed in both groups. 150

Liste des abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamine	MEC : Matrice Extracellulaire
ACN : Acetonitrile	MES : Matière En Suspension
ADNc : Acide Desoxyribonucléique complémentaire	MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	MEF : Myocyte Enhancer Factor
ANOVA : Analysis of Variance	MIP : Molluscan Insulin-related Peptide
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé	M-MLV : Moloney Murine Leukemia Virus
ARN : Acide Ribonucléique	NMDA : N-méthyl-D-aspartate
bpm : battements par minute	NOS : Nitric Oxide Synthase
BZD : Benzodiazépine	NS : Non Significatif
CDCH : Caudo-dorsal Cell Hormone	OFDT : Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies
CEPMB : Conseil d'Examen du Prix des Médicaments Brevetés	OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques
CNAM : Caisse Nationale de l'Assurance Maladie	pb : paire de bases
DBO : Demande Biochimique en Oxygène	PCR : Polymerase Chain Reaction
DCO : Demande Chimique en Oxygène	PKA : cAMP-dependant Protein Kinase
CPG : Central Pattern Generator	PKC : Protein Kinase C
CTAB : Cetyltrimethylammonium Bromide	PKG : cGMP-dependant Protein Kinase
CYP : Cytochrome P450	PNM : Plan National Micropolluants
DE : Differentially Expressed	PNRM : Plan National sur les Résidus de Médicaments
DEPC : Diethyl pyrocarbonate	PTFE : Polytétrafluoroéthylène
dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate	qPCR : PCR quantitative
DQD : Dose quotidienne Définie	RNAseq : Sequençage ARN
DTT : Dithiothreitol	RPL18 : Ribosomal protein L18
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique	SCP : Small Cardio Peptide
ERE : Evaluation du Risque Environnemental	SD : Standard Deviation
EROD : Ethoxyresorufin-O-deethylase	SE : Standard Error
GABA : Gamma aminobutyric acid	SOD : Superoxyde Dismutase
GST : Glutathion-S-Transferase	SSRI : Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
HPLC : High-performance liquid chromatography	STEP : Station d'Épuration
ITS : Internal Transcribed Spacer	TFA : Trifluoacetic acid
ISO : Organisation Internationale de Normalisation	UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature
jpf : jour post-fécondation	UV : Ultra-Violet
LC/MS : Liquid chromatography–mass spectrometry	WWTP : Wastewater Treatment Plant
LIP : Lymnaea Inhibitory Peptide	

Introduction générale

Selon plusieurs estimations, environ 3000 substances pharmaceutiques sont prescrites dans le monde (Calisto et al., 2009; Hummel et al., 2006; Richardson, 2010). La France est le deuxième pays le plus consommateur de médicaments de l'UE derrière l'Allemagne et est au 5^{ème} rang mondial (derrière les Etats Unis, la Chine, le Japon et l'Allemagne) (Rapport Académie Nationale de Pharmacie, 2019). Le vieillissement de la population dans les pays développés et le développement de l'élevage intensif contribuent à augmenter la consommation de médicaments humains et vétérinaires. De plus, la généralisation des traitements ambulatoires induit une forte présence des résidus médicamenteux au niveau des stations d'épuration domestiques et urbaines qui ne sont pas conçues pour éliminer complètement les résidus pharmaceutiques.

A l'échelle européenne, la Directive Européenne Cadre sur l'Eau, adoptée en 2000 (Directive 2000/60/CE), avait pour objectif principal d'atteindre un bon état chimique et écologique de toutes les eaux communautaires. Dans ce cadre, elle avait défini une liste de 33 substances prioritaires à surveiller. En 2013, la directive 2013/39/UE a intégré 12 nouvelles molécules à la liste des substances prioritaires et une liste de vigilance a été dressée, comportant pour la première fois trois substances pharmaceutiques, le diclofénac, le 17-bêta-estradiol et le 17-alphaéthynylestradiol. En 2019, la Commission Européenne a également proposé des mesures pour limiter les rejets de produits pharmaceutiques et leur impact sur l'environnement (European Commission, 2019). Ces mesures se divisent en six domaines d'action :

- Accroître la sensibilisation et l'utilisation prudente des produits pharmaceutiques
- Améliorer la formation et l'évaluation des risques
- Récolter des données de surveillance
- Encourager une « conception verte » de ces produits
- Diminuer les émissions des fabricants
- Réduire les déchets et à améliorer le traitement des eaux usées.

En France, le Plan National sur les Résidus de Médicaments dans les eaux, lancé en 2011 (PNRM, 2011-2015), a permis notamment de dresser un état des lieux de la contamination aquatique par les résidus médicamenteux en France (Oieau, 2013) et d'engager des

campagnes de surveillance des milieux aquatiques (Bilan du PNRM, 2015). Depuis 2016, ce PNRM a été intégré au Plan National Micropolluants 2 (PNM2, 2016-2021), ce qui permettra de poursuivre les objectifs encore non atteints, tels que la mise en place de procédure pour améliorer la gestion des déchets issus de médicaments ou encore la création d'une liste de polluants à surveiller.

Cependant, selon le récent rapport de l'OCDE (2019), il n'y a pas encore suffisamment d'actions menées pour prévenir les risques de retrouver ces résidus pharmaceutiques dans l'environnement. Afin de prendre le problème à la source, l'OCDE recommande d'intégrer le risque environnemental dans toutes les étapes du processus d'élaboration, de production, de mise sur le marché et d'usage des produits pharmaceutiques. Cette préconisation intègre donc, entre autres, un renforcement des procédures d'évaluation de l'écotoxicité des nouvelles molécules pharmaceutiques. Actuellement, les procédures d'Evaluation du Risque Environnemental (ERE) des produits pharmaceutiques réalisées lors de la procédure d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) sont restreintes. Elles ne concernent que les nouvelles molécules (AMM initiale) et les modifications majeures (Médicaments et Environnement, Cgedd, 2010). Cette obligation de prendre en compte le risque environnemental, issue initialement de la directive 93/39, n'a été réellement concrétisée qu'en 2006 et n'est pas rétrospective. Ainsi, une grande majorité des médicaments actuellement sur le marché n'a pas bénéficié de cette procédure et leur toxicité sur les organismes non cibles reste méconnue.

Cette thèse vise donc à enrichir les connaissances toxicologiques d'un médicament psychotrope largement prescrit et fréquemment retrouvé dans les eaux de surface, l'oxazépam. Les études sur l'oxazépam sont rares, spécialement en ce qui concerne ses effets sur les invertébrés aquatiques ; ainsi, cette étude sera focalisée sur le gastéropode d'eau douce, *Radix balthica*. Ce manuscrit sera divisé en deux parties. Je présenterai en première partie un état de l'art qui traitera tout d'abord des psychotropes, de leur consommation à leur persistance dans le milieu aquatique. Le mécanisme d'action, la métabolisation et la toxicité des molécules de la famille des benzodiazépines et notamment de l'oxazépam seront ensuite présentées. Je montrerai à cette occasion la difficulté d'épuration des benzodiazépines par les stations d'épuration ainsi que la forte présence et rémanence de l'oxazépam dans l'environnement. Enfin, je réaliserai une description de l'organisme étudié, *Radix balthica*, en

détaillant les points clés de son cycle de vie et les mécanismes physiologiques et moléculaires mis en jeu. La seconde partie consistera en un ensemble d'études visant à caractériser les effets de l'oxazépam sur le cycle de vie de *Radix balthica*, et se divisera en quatre chapitres. Les trois premiers chapitres traiteront respectivement des effets de l'oxazépam sur la reproduction, l'embryogénèse et le stade juvénile du gastéropode. Le premier chapitre, axé sur la reproduction, mettra en lumière les effets de l'oxazépam sur la production de gamètes mâles et sur la fertilité. Je traiterai, dans le second chapitre, de l'embryogénèse et des effets variables de l'oxazépam sur les différentes populations d'embryons. Au cours du troisième chapitre, je présenterai les effets de l'oxazépam sur la prise alimentaire, la croissance et la locomotion des juvéniles, tant du point de vu physiologique que moléculaire. Enfin, le quatrième chapitre sera un bilan général de cet ensemble d'études et traitera des perspectives. L'ensemble de ce travail permettra d'évaluer les effets de l'oxazépam sur ce gastéropode dulçaquicole, mais également d'avoir un aperçu de l'impact sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes.

Partie 1 : Etat de l'art

I - Les médicaments psychotropes : de l'homme au milieu aquatique

A) Les différentes classes de psychotropes

Les psychotropes sont des substances chimiques ayant un effet sur l'activité cérébrale en agissant au niveau du système nerveux central. Ils sont généralement utilisés dans les troubles psychiatriques afin de modifier la perception des sensations, l'humeur ou la conscience. Cette classe thérapeutique regroupe de nombreuses sous-classes telles que les anxiolytiques, les antidépresseurs, les hypnotiques, les antiépileptiques, les neuroleptiques, ainsi que les régulateurs de l'humeur.

Les anxiolytiques ou tranquillisants permettent d'atténuer l'angoisse, les troubles émotionnels et les manifestations de l'anxiété telles que les insomnies, tremblements, irritabilité et tensions musculaires en agissant sur les récepteurs GABA (acide gamma-aminobutyrique). Les prescriptions sur le long terme sont généralement des anxiolytiques de la famille des benzodiazépines, qui peuvent rapidement entraîner une dépendance physique ainsi qu'une accoutumance. Les anxiolytiques prescrits le plus couramment en France sont par exemple le diazépam (Valium®), le lorazépam (Temesta®), le bromazépam (Lexomil®) et l'oxazépam (Séresta®).

Les antidépresseurs sont des substances chimiques destinées à traiter les symptômes de la dépression et des troubles de l'humeur en agissant sur les neurotransmetteurs comme la sérotonine et la noradrénaline. Certaines molécules de cette famille sont également utilisées pour la régulation du sommeil perturbé lors de dépressions ainsi que pour réguler les troubles obsessionnels compulsifs ainsi que l'anxiété généralisée. Ils donnent rarement lieu à un usage addictif. Les antidépresseurs les plus courants sont la fluoxétine (Prozac®), la venlafaxine (Effexor®), le citalopram (Seropram®) et la miansérine (Athymil®).

Les hypnotiques ou somnifères sont des substances destinées à provoquer ou à maintenir le sommeil mais qui peuvent, par conséquent, diminuer la vigilance. Beaucoup de ces

médicaments sont des benzodiazépines agonistes du récepteur GABA_A, tel que le témazépam (Normison®) ou des médicaments associés aux benzodiazépines mais de structure chimique différente, dits « non-benzodiazépine » tels que le zopiclone (Imovane®) ou le zolpidem (Stilnox®).

Les antiépileptiques ou anti-convulsants sont généralement prescrits pour le traitement ou la prévention de l'épilepsie. Bien qu'un traitement puisse réduire complètement les symptômes, les antiépileptiques ne sont pas curatifs ; l'arrêt du traitement signe la reprise des symptômes. Les antiépileptiques les plus prescrits sont l'acide valproïque (Depakine®) qui agit à la fois sur la transmission GABAergique et sur les canaux ioniques, et la carbamazépine (Tegretol®) qui est un agoniste du récepteur GABA_A.

Les neuroleptiques ou antipsychotiques sont principalement prescrits pour le traitement de psychoses, comme la schizophrénie, les troubles bipolaires, les hallucinations et délires. Les médicaments neuroleptiques ne peuvent pas guérir ces troubles mais permettent d'améliorer l'état psychique et de faciliter leur adaptation sociale. Ils agissent sur un ou plusieurs neurotransmetteurs, en particulier sur la dopamine. Les neuroleptiques les plus courants sont la cyamémazine (Tercian®), la chlorpromazine (Largactil®) et l'amisulpride (Solian®).

Les régulateurs de l'humeur ou thymorégulateurs sont employés en traitement de fond de longue durée pour soigner les troubles bipolaires. Ils sont efficaces pour réduire la durée, la fréquence ou l'intensité des épisodes aigus mais leur mode d'action n'est pas encore clairement établi. Le carbonate de lithium est le plus couramment prescrit (Téralithe®).

B) Consommation des psychotropes

Comme le montre le rapport annuel de 2013 du Conseil d'Examen du Prix des Médicaments Brevetés (CEPMB, 2015), les médicaments ciblant le système nerveux sont en moyenne en seconde place des ventes pour l'ensemble des pays cités, derrière les agents néoplasiques et immunomodulateurs (Tableau 1-1). En France, la vente de médicaments psychotropes représentait 14,7% des ventes de produits médicamenteux brevetés en 2013.

Tableau 1-1 : Distribution des ventes de produits médicamenteux brevetés (en pourcentage) selon le groupe thérapeutique, dans plusieurs pays, en 2012 (modifié d'après CEPMB, 2015).

Groupe thérapeutique	Canada	France	Italie	Allemagne	Suède	Suisse	Royaume -Uni	Etats -Unis
A : Tube digestif et métabolisme	12,6	10,6	11,2	11,5	10,1	11,1	11,0	12,6
B : Sang et organes sanguiniformateurs	4,1	7,4	8,2	5,6	7,7	4,8	4,2	5,3
C : Système cardiovasculaire	14,3	12,9	13,6	9,6	6,2	12,1	8,9	10,5
D : Produits dermatologiques	3,1	2,4	2,1	2,7	2,5	3,6	3,2	2,8
G : Système génito-urinaire et hormones sexuelles	5,2	3,3	3,9	3,8	5,0	4,6	4,7	5,4
H : Préparations hormonales systémiques	1,1	1,8	1,9	2,0	2,5	1,5	2,1	1,7
J : Antiinfectieux généraux pour usage systémique	7,3	12,2	12,9	10,1	7,8	10,7	10,4	10,4
L : Agents antinéoplasiques et agents immunomodulateurs	15,6	16,7	16,6	20,6	21,4	19,8	16,4	16,1
M : Système musculo-squelettique	3,7	3,4	3,9	3,7	3,0	5,0	2,6	3,0
N : Système nerveux	18,6	14,7	12,1	15,2	18,4	15,7	18,5	18,5
P : Produits parasitaires	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2
R : Système respiratoire	7,2	6,3	5,8	6,7	9,1	6,2	10,2	8,1
S : Organes sensoriels	3,1	2,9	1,9	2,6	2,6	3,1	3,3	2,4
V : Divers	4,0	5,2	5,8	5,9	3,5	1,8	4,2	3,0

Parmi les psychotropes, les antidépresseurs ont montré une consommation accrue entre 2000 et 2011 par les pays de l'OCDE (Figure 1-1). En effet, la Dose Quotidienne Définie pour 1000 habitants (DQD) est passée de 32 à 56 (moyenne des 23 pays de l'OCDE). Les pays les plus consommateurs d'antidépresseurs en 2011 sont le Danemark (85 DQD), le Canada (86 DQD), l'Australie (89 DQD) et l'Islande (106 DQD). La France reste en dessous de la moyenne OCDE avec 50 DQD en 2011 (OCDE, 2013).

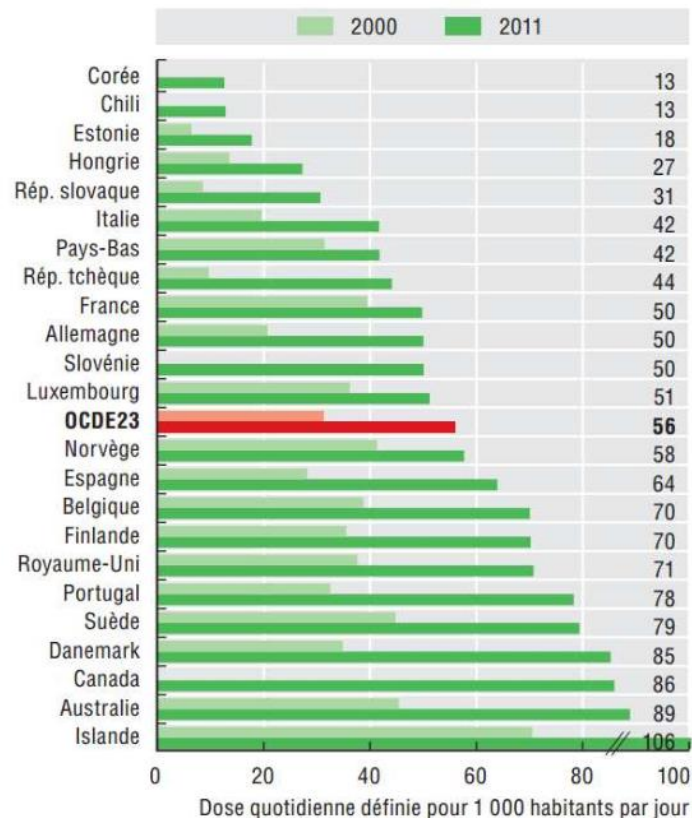


Figure 1-1 : Consommation d'antidépresseurs entre 2000 et 2011 par les 23 pays de l'OCDE (OCDE, 2013).

En France, les anxiolytiques sont les psychotropes les plus consommés avec 1,4 boîte remboursée par habitant en 2017, devant les antidépresseurs (1,2 boîte par habitant) et les hypnotiques (0,7 boîte). Cependant, une légère baisse dans les remboursements d'anxiolytiques a été observée sur la période 2012-2017 (-6%). Une baisse plus importante a été recensée pour les hypnotiques sur cette même période (-28%). En revanche, les remboursements des antidépresseurs sont restés stables entre 2012 et 2017, contrairement à l'augmentation enregistrée au début du siècle (CNAM, 2018) Une étude de l'OFDT (Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies) a également montré que la consommation de psychotropes concernait davantage les femmes que les hommes et

augmentait fortement avec l'âge, l'écart entre les sexes s'amplifiant avec le vieillissement. Ainsi, le remboursement de psychotropes concernerait 9% des femmes de 15-24 ans pour atteindre jusqu'à 49% chez les 85 ans et plus. Chez les hommes, il s'élèverait à 5% chez les 15-24 ans et atteindrait 33% chez les 85 ans et plus (Figure 1-2). Ainsi, malgré une hausse de la consommation des psychotropes au début du siècle, celle-ci a tendance à diminuer au cours de cette dernière décennie. Cette consommation est plus fréquente chez la population âgée et féminine (OFDT, 2019).

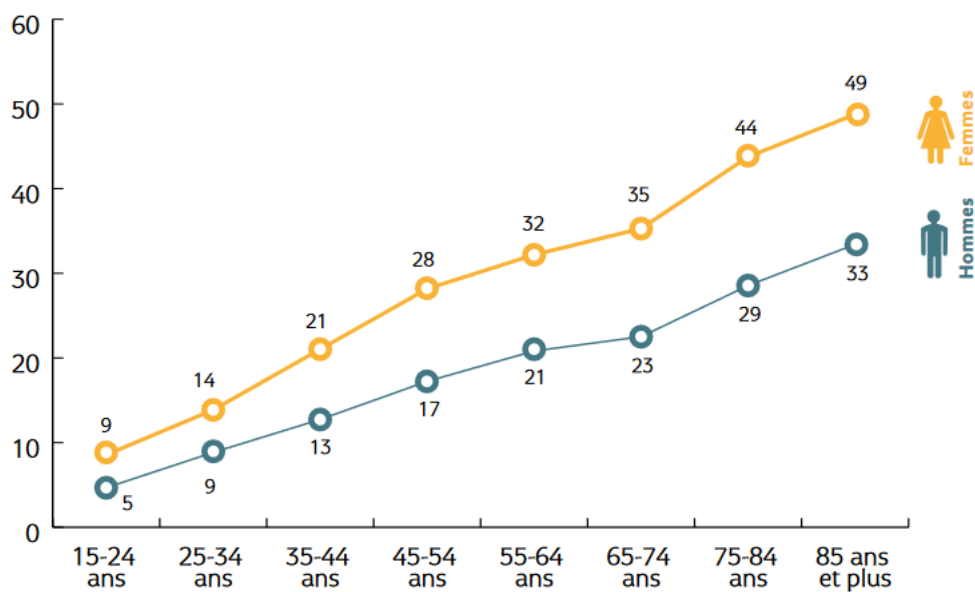


Figure 1-2 : Prévalence des remboursements des médicaments psychotropes en 2017 selon l'âge et le sexe (en pourcentage) (OFDT, 2019).

La consommation française de benzodiazépines (classe de molécules psychotropes ayant des propriétés anxiolytiques, hypnotiques, myorelaxantes ou antiépileptiques) a fait l'objet d'un rapport en 2017 (ANSM, 2017). Malgré une légère diminution de la consommation depuis 2012 (-10%), la France reste en seconde position, derrière l'Espagne parmi les huit pays étudiés (Figure 1-3). L'Allemagne et le Royaume-Uni sont les plus faibles consommateurs de benzodiazépines avec une consommation 4 à 5 fois inférieure à celle de la France. Le rapport de l'ANSM fait état de 64,6 millions de boîtes d'anxiolytiques dérivés des benzodiazépines vendues en France en 2015, représentant 84% de la consommation totale d'anxiolytiques. De la même façon, 46,1 millions de boîtes d'hypnotiques dérivés ou apparentés aux benzodiazépines auraient été vendus, correspondant à 81,4% de la consommation totale

d'hypnotiques et de sédatifs. La France est donc l'un des plus gros consommateurs de benzodiazépines à l'échelle européenne.

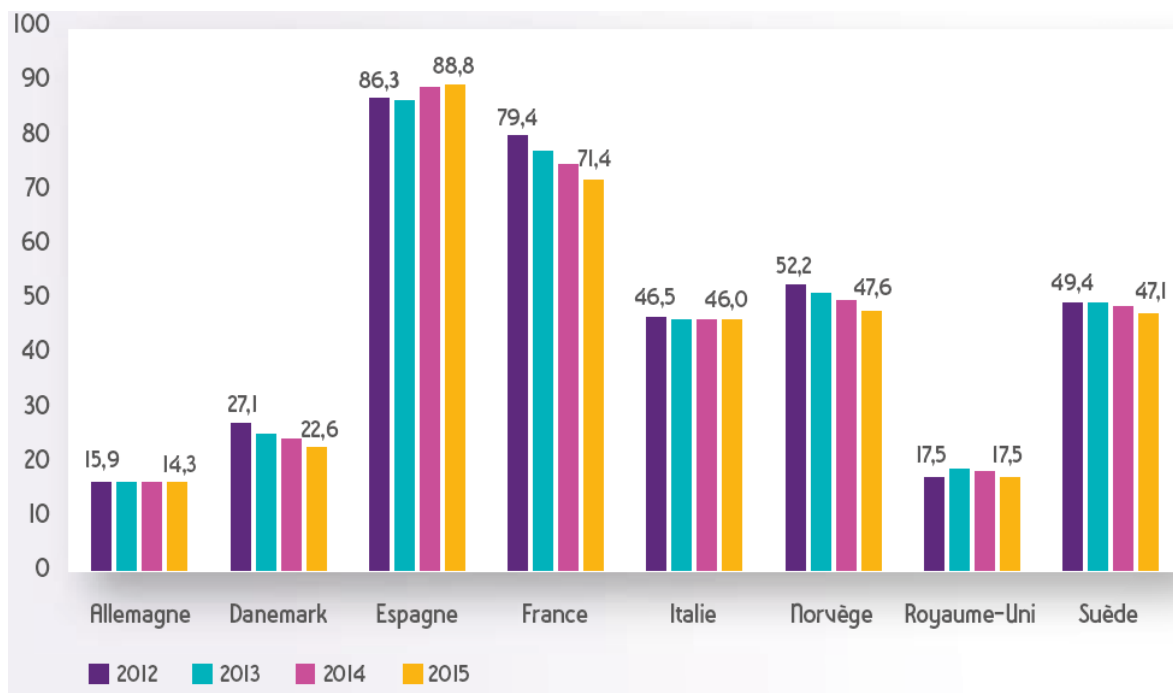


Figure 1-3 : Niveaux de consommation des benzodiazépines dans huit pays européens (exprimé en Dose Définie Journalière/1000 habitants/jour) entre 2012 et 2015 (ANSM, 2017).

Une fois ingérés, les psychotropes vont être plus ou moins métabolisés par l'organisme (notamment via les cytochromes P450) et excrétés dans les urines et fèces sous forme de molécule mère ou de métabolites (molécules issues de la transformation de la molécule mère par oxydation, réduction, hydrolyse et/ou conjugaison) (Daniel, 1995). Les molécules excrétées vont se retrouver dans les eaux usées qui transiteront vers les stations d'épuration pour être traitées avant d'être relâchées dans les eaux superficielles. Ainsi, les stations d'épuration (STEP) sont la principale voie d'entrée des psychotropes dans le milieu aquatique. Les sources issues d'élevages intensifs sont ici négligeables ; les psychotropes étant peu utilisés dans ce domaine.

C) Traitement des psychotropes au niveau des STEP

L'entrée des médicaments psychotropes dans l'environnement se fait donc majoritairement via les eaux usées domestiques, les effluents d'établissements de santé (cliniques, hôpitaux, maisons de retraite, etc.) et d'industries pharmaceutiques (Figure 1-4). Les eaux usées domestiques sont traitées par les stations d'épuration urbaines tandis que les établissements

de santé et les industries pharmaceutiques possèdent en général leurs propres stations de traitement (Djeral et al., 2008). Les eaux traitées seront ensuite déversées dans les eaux de surface.

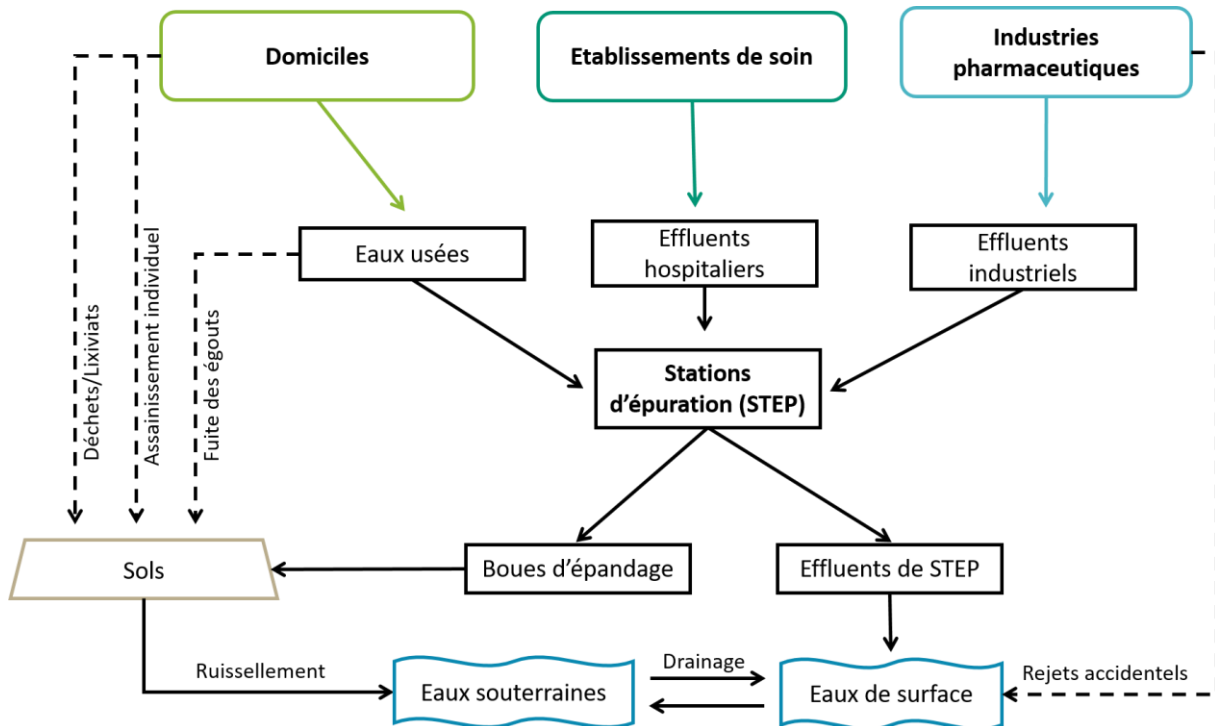


Figure 1-4 : Voies d'introduction des médicaments psychotropes dans les eaux continentales (modifié d'après ANSES (2011)).

Le traitement par les stations d'épuration a pour objectif d'éliminer les matières solides, les matières organiques dissoutes ainsi que certains micropolluants des eaux usées, tout en respectant des normes de qualité, afin de rejeter les eaux dans l'environnement. Ces normes de qualité sont essentiellement basées sur les concentrations en azote et phosphore, ainsi que sur la demande chimique et biochimique en oxygène (DCO et DBO) et la matière biologique en suspension (MES). Il existe plusieurs types de traitements (primaire, secondaire, tertiaire) qui peuvent être combinés en fonction des besoins (Figure 1-5).

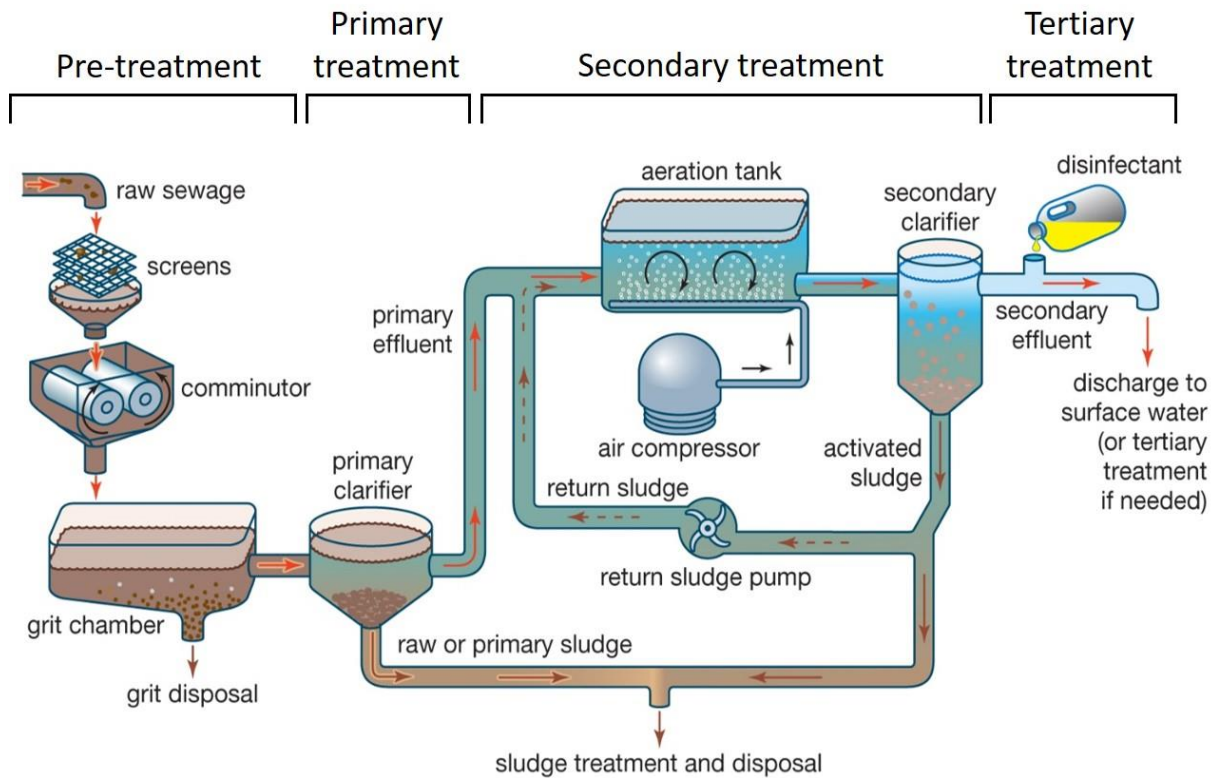


Figure 1-5 : Exemple de fonctionnement d'une station d'épuration classique (modifié d'après Encyclopaedia Britannica).

Lorsque les eaux usées parviennent au niveau des stations d'épuration, un prétraitement est toujours réalisé et consiste en un dégrillage, dessablage et dégraissage afin d'éliminer les matières solides les plus grossières (déchets, graviers, sable) ainsi que les graisses retrouvées en surface.

Le traitement primaire est couramment employé et consiste à séparer la matière en suspension de la phase dissoute après décantation. Ces particules sont récupérées au fond du décanteur par pompage et constituent les boues primaires. Cette étape permet d'éliminer les métaux absorbables (Hg, Al, Ti, Cr, Cu, Zn, Ag, Cd, Sn, Ba et Pb) ainsi que les micropolluants organiques hydrophobes tels que les HAPs (Choubert et al., 2011). Cependant, le traitement primaire ne permet pas d'éliminer les molécules hydrosolubles, dont font partie la majorité des médicaments. En effet, le projet Européen POSEIDON a démontré que le traitement primaire permettait d'éliminer moins de 10% du diazépam au niveau des STEP (Calisto and Esteves, 2009). De plus, de Jesus Gaffney et al. (2017) ont montré que même si le traitement primaire permettait d'éliminer 30% de carbamazépine, ce n'était pas le cas pour la fluoxétine

et l'oxazépam qui ne voyaient pas leur concentration diminuer entre le pré et le post-traitement primaire.

Le traitement secondaire consiste en un traitement bactérien par boues activées et vise à éliminer la matière organique restante. Les micro-organismes vont métaboliser les composés organiques dissous dans l'eau (carbone, azote, phosphore). A l'issue de ce traitement, des boues issues de la dégradation des bactéries et de la matière organique se forment. Celles-ci seront récupérées et traitées. Ce traitement secondaire est plus efficace pour éliminer les psychotropes. Lajeunesse et al. (2012) ont en effet montré que les antidépresseurs présentaient un taux d'élimination entre 5,8 et 53%, avec des taux de 38% pour la sertraline, 36% pour la fluoxétine mais seulement 5,8% pour la carbamazépine. Cette étude confirme donc les résultats de Radjenović et al. (2009) qui avaient montré que 33% de la fluoxétine étaient éliminés par les boues activées contre un taux inférieur à 10% pour la carbamazépine.

Si la plupart des stations d'épuration ne se contentent que des traitements primaires et secondaires, elles peuvent, dans certains cas, être amenées à réaliser des étapes supplémentaires afin d'affiner l'élimination de certaines molécules et d'améliorer la qualité de l'eau traitée. Ainsi, les eaux traitées destinées à l'irrigation agricole nécessitent une élimination totale des pathogènes et celles à destination de la recharge de nappes, une élimination de l'azote et du phosphore afin d'éviter une eutrophisation. Il existe de nombreux traitements tertiaires. Le plus connu est le traitement par ozonation. L'ozone est un gaz ayant des propriétés oxydantes très développées et permettant de dégrader la matière organique et les principaux pathogènes (*E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, etc.). L'ozonation a également prouvé son efficacité pour l'élimination des psychotropes. Luo et al. (2014) ont en effet montré qu'il permettait d'éliminer plus de 90% de la carbamazépine présente. De plus, de nombreuses études ont montré que les taux d'élimination de nombreux psychotropes tels que le diazépam, la fluoxétine, la carbamazépine étaient supérieurs à 70% par ozonation (Pohl et al., 2019; Snyder, 2008; Soulier et al., 2011). Cependant, certaines molécules semblent moins sensibles à ce traitement, comme l'oxazépam qui présente seulement 19% d'élimination (Pohl et al., 2019). Il est également à noter que l'ozonation peut entraîner la formation de composés secondaires, potentiellement plus toxiques que les composés parents, comme cela est suggéré dans l'étude de Pohl et al. (2019) pour la carbamazépine.

La filtration sur charbon actif semble également être une technique efficace pour éliminer les résidus médicamenteux puisque de nombreuses études relatent des taux d'élimination importants pour les psychotropes (Kovalova et al., 2013; Soulier et al., 2011; Westerhoff et al., 2005).

Depuis 2015, et suite à la modification de la loi fédérale et de l'ordonnance sur la protection des eaux, rendant obligatoire l'élimination d'au moins 80% des micropolluants en sortie de station d'épuration, la Suisse a fait le choix de renouveler une partie de ses installations de STEP vieillissantes (120 stations concernées d'ici 2035) par des procédés permettant d'abattre 80% des micropolluants. Même si chaque station va décider des traitements les plus judicieux en fonction des caractéristiques de ses eaux usées, les deux techniques citées précédemment (ozonation et filtration sur charbon actif) seront privilégiées.

La France a, elle, fait le choix d'essayer de réduire les micropolluants à la source. Cependant, quelques programmes visant à proposer des traitements innovants ont vu le jour depuis quelques années tels que le programme Innovec'eau (2016-2019). Ce programme a, entre autres, permis de proposer un traitement basé sur le couplage d'un procédé biologique par bioréacteur à membrane et d'un procédé de photocatalyse, permettant une dépollution optimisée des rejets issus d'établissements accueillant des personnes âgées. Le traitement par bioréacteur à membrane a déjà fait l'objet d'études et a montré qu'il permettait une bonne élimination des produits pharmaceutiques (98% d'élimination de la fluoxétine contre 33% par les boues activées) (de Jesus Gaffney et al., 2017).

Malgré leur efficacité prouvée, ces procédés sont cependant encore rarement mis en place, principalement à cause du coût important des installations.

D) Concentration des psychotropes au niveau des STEP

Malgré les nombreux traitements au niveau des STEP, une quantité importante de molécules psychotropes se retrouve relâchée avec les eaux traitées. De plus, les avancées technologiques des dernières décennies ont permis de détecter et de doser des polluants présents à des concentrations quelques ng/L. Ces nouvelles techniques ont ainsi permis le suivi de molécules d'intérêt en entrée et sortie des stations d'épuration. Il existe de très nombreuses études portant sur le dosage des psycholeptiques dans les eaux de STEP, notamment au niveau européen. Le tableau 1-2 présente un échantillon des études réalisées

au niveau des entrées (affluents) et sorties (effluents) de STEP avec leurs taux d'abattement lorsqu'il est précisé.

Tableau 1-2 : Concentrations (en ng/L) en entrée et sortie de STEP (urbaine ou hospitalière) de différentes molécules psychotropes appartenant aux familles des anxiolytiques, antidépresseurs et antiépileptiques. Les taux d'abattement (efficacité d'élimination au niveau des STEP) sont indiqués quand ils sont précisés dans l'étude.

Famille	Molécule	Type de STEP	Entrée STEP	Sortie STEP	Taux d'abattement	Référence	
Anxiolytique	Alprazolam	Urbaine	1,74-2580	0,81-176		Cunha et al. (2017)	
		Hospitalière	4,58-168	12,2-29		Cunha et al. (2017)	
	Bromazépam	Urbaine	1,3-3662	0,5-15542		Cunha et al. (2017)	
			1966	4383		Huerta-Fontela et al. (2010)	
		Hospitalière	40-158	125-205		Cunha et al. (2017)	
	Clonazépam	Hospitalière		49-145		Cunha et al. (2017)	
	Diazépam	Urbaine	1,7-196	0,642-720		Cunha et al. (2017)	
		Hospitalière	2-244	2-660		Cunha et al. (2017)	
					129,3		Mazzitelli et al. (2018)
	Lorazépam	Urbaine	2,1-10598	1,2-920		Cunha et al. (2017)	
			250	170,6		Huerta-Fontela et al. (2010)	
		Hospitalière	20-1325	38-205		Cunha et al. (2017)	
					430,8	Mazzitelli et al. (2018)	
	Oxazépam			5,6-3300	6,3-3817		Cunha et al. (2017)
		Urbaine		24-77	26-94	-17 %	Golovko et al. (2014)
			480 (max 860)	320 (max 630)		Hummel et al. (2006)	
Hospitalière			28-2200	17-7434		Cunha et al. (2017)	
				7043,6	Mazzitelli et al. (2018)		
Témazépam	Urbaine	55 (max 230)	50 (max 180)		Hummel et al. (2006)		
Antidépresseur	Citalopram	Urbaine	0,4-650	1,5-2100		Cunha et al. (2017)	
			27-180	30-120	18 %	Golovko et al. (2014)	
		Hospitalière	9,43-888	19-162		Cunha et al. (2017)	
					150,7	Mazzitelli et al. (2018)	
	Fluoxétine	Hospitalière		16		Mazzitelli et al. (2018)	
	Sertraline	Urbaine	7-27	3-6	81 %	Golovko et al. (2014)	
		Hospitalière		14,6		Mazzitelli et al. (2018)	
	Venlafaxine	Urbaine	120-800	120-1110	1 %	Golovko et al. (2014)	
			240	161		Huerta-Fontela et al. (2010)	
Mirtrazapine	Urbaine	23-170	13-68	32 %	Golovko et al. (2014)		
Antiépileptique	Carbamazépine		210-710	220-730	-12 %	Golovko et al. (2014)	
		Urbaine	2000	1900		Hummel et al. (2006)	
			1780	1630	8 %	Heberer (2002)	

Ces données nous montrent qu'il est fréquent de retrouver les psychotropes à plusieurs milliers de ng/L en entrée de STEP. Ces concentrations ont tendance à diminuer en sortie de STEP, et seulement quelques études font état d'une concentration supérieure à un millier de ng/L. L'oxazépam présente ainsi en sortie de STEPs urbaines et hospitalières, des concentrations maximales de l'ordre de 4000 à 7000 ng/L (Cunha et al., 2017; Mazzitelli et al., 2018). De plus, Golovko et al. (2014) ont montré un taux d'abattement négatif pour cette molécule ainsi que pour la carbamazépine, c'est à dire que la concentration en sortie est plus importante qu'à l'entrée de STEP. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que certaines molécules, piégées dans les matières fécales, seront libérées lors du traitement biologique (traitement secondaire) (Kasprzyk-Hordern et al., 2009). De plus, d'autres études suggèrent que des molécules ayant subi une glucurono-conjugaison avant excrétion par le corps humain, soient retransformés en composés parents grâce à l'enzyme β -glucuronidase produite par les bactéries fécales de type *Escherichia coli* (Calisto and Esteves, 2009). Enfin, il a été montré que des molécules comme le diazépam subissaient, au cours du traitement biologique, une dégradation en plusieurs composés comme l'oxazépam, le nordazépam et le temazépam, qui sont eux-mêmes des molécules actives (Kosjek et al., 2012). Ces phénomènes peuvent entraîner une libération de composés parents actifs au moment du traitement par les STEP, et donc entraîner ces taux d'abattelements négatifs.

E) Concentrations des psychotropes dans le milieu aquatique

Les effluents de STEP sont majoritairement déversés au niveau des eaux de surface (rivières, estuaires). Même si les phénomènes de dilutions peuvent contribuer à diminuer les concentrations en molécules médicamenteuses, ces dernières restent tout de même détectables dans les rivières après échantillonnage ponctuel et peuvent atteindre des concentrations importantes, comme en témoigne le tableau 1-3.

Tableau 1-3 : Concentrations (en ng/L) de différentes molécules psychotropes appartenant aux familles des anxiolytiques, antidépresseurs et antiépileptiques détectées en rivière.

Famille	Molécule	Concentration rivière (ng/L)	Référence
Anxiolytique	Alprazolam	2,5	Wu et al. (2015)
		0,3-5900	Cunha et al. (2017)
	Bromazépam	0,73-19	Cunha et al. (2017)
	Diazépam	24,3	Wu et al. (2015)
		6,5	López-Serna et al. (2010)
		4,8	Mazzitelli et al. (2018)
		0,14-625	Cunha et al. (2017)
		41,3	López-Serna et al. (2010)
	Lorazépam	2,1	Vulliet and Cren-Olivé (2011)
		1,6-705,5	Cunha et al. (2017)
		25,1	Vulliet and Cren-Olivé (2011)
	Oxazépam	90 (max 400)	Hummel et al. (2006)
		30	González Alonso et al. (2010)
		816	Mazzitelli et al. (2018)
		1,3-1400	Cunha et al. (2017)
Témazépam	23 (max 58)	Hummel et al. (2006)	
Antidépresseur	Citalopram	43	González Alonso et al. (2010)
		7,3	Mazzitelli et al. (2018)
		0,3-76000	Cunha et al. (2017)
	Fluoxétine	25-90	Pivetta et al. (2020)
	Sertraline	14	González Alonso et al. (2010)
	Venlafaxine	0,7	Mazzitelli et al. (2018)
Antiépileptique	Carbamazépine	57	González Alonso et al. (2010)
		25-3530	Pivetta et al. (2020)
		25 (max 81)	Hummel et al. (2006)
		165,3	Mazzitelli et al. (2018)
		58,4	López-Serna et al. (2010)
		82	González Alonso et al. (2010)
13,9	Vulliet and Cren-Olivé (2011)		

Dans l'ensemble, les concentrations se situent de quelques dizaines à quelques centaines de ng/L mais certaines molécules ont été détectées à des concentrations plus importantes, notamment pour l'alprazolam, l'oxazépam et le citalopram (Cunha et al., 2017).

La fréquence de détection des molécules est un paramètre à prendre également en compte. Une vaste étude, réalisée sur 30 rivières européennes a démontré que l'oxazépam était détecté dans 85% des cas (Fick et al., 2017). Cette observation a également été retrouvée dans d'autres études à plus petite échelle (González Alonso et al., 2010; Hummel et al., 2006).

Les psychotropes sont donc largement retrouvés dans les milieux aquatiques, notamment à cause des rejets au niveau des STEPs où ils peuvent subir des dégradations ou s'accumuler dans l'environnement.

F) Facteurs de dégradation et persistance dans le milieu aquatique

La dégradation des psychotropes dans le milieu aquatique peut être le résultat de nombreux facteurs biotiques et abiotiques dont les principaux sont la photodégradation et la dégradation par les micro-organismes.

La photodégradation est la dégradation des molécules par les rayonnements solaires. Elle dépend de l'intensité des radiations, de l'eutrophisation, de la profondeur de l'eau, de la composition en matière organique ainsi que de la latitude et des saisons (Mompelat et al., 2009). Elle peut être directe ou indirecte. La photolyse directe est induite par l'absorption de photons qui sont capables de provoquer des transformations chimiques tandis que la photolyse indirecte correspond à changement de conformation des molécules par des radicaux (comme OH•) générés par l'irradiation des nitrates ou des acides humiques (Boule et al., 2005; Mompelat et al., 2009). L'étude de Calisto et al. (2011) a montré que le lorazépam est rapidement photodégradé par les radiations solaires tandis que l'oxazépam et le diazépam étaient fortement résistants à la photodégradation, d'où les fortes concentrations retrouvées en sortie de STEP et dans les milieux aquatiques. De plus, deux autres études ont également démontré que la carbamazépine et le diazépam étaient peu sensibles aux radiations solaires (Kosjek et al., 2012; Yamamoto et al., 2009). Il est cependant à noter que la photodégradation peut générer des composés secondaires peu ou pas connus et potentiellement actifs (Calisto et al., 2011).

La dégradation biotique ou microbienne est très peu présente dans la colonne d'eau (Yamamoto et al., 2009) mais peut devenir importante au niveau des sédiments de la même façon que dans les boues activées des STEP (Kosjek et al., 2012).

Enfin, les phénomènes de dilution peuvent également contribuer à diminuer les concentrations en molécules médicamenteuses au niveau des rivières. Kasprzyk-Hordern et al. (2009) ont montré que la carbamazépine et la gabapentine présentaient une réduction de 40% de leur concentration 27 km en aval du rejet de STEP. Cependant, cette atténuation naturelle ne permet pas d'éliminer complètement les molécules, notamment si elles sont résistantes aux procédés de dégradation cités plus haut.

Certaines molécules présentent une forte affinité pour la matière organique, ce qui peut les rendre moins sensibles aux dégradations abiotiques et prolonger leur durée de vie dans l'environnement. L'adsorption des molécules médicamenteuses sur le sédiment dépend de leurs propriétés physico-chimiques. En effet, plus une molécule est lipophile (coefficient octanol/eau élevé), plus elle aura d'affinité pour la matière organique, et inversement. Cependant, cette règle n'est pas toujours observée et certains autres paramètres peuvent entrer en compte dans le phénomène d'adsorption comme la nature de la matière organique ou le pH de l'environnement (Nunes et al., 2019; Schäfer et al., 2012). Une récente étude a montré que l'oxazépam pouvait persister des décennies dans les sédiments d'un lac aux eaux froides et à l'abri de la lumière, en se fixant à la matière organique (Klaminder et al., 2015).

Les faibles actions de dégradations biotiques ou abiotiques, en milieu naturel ou en STEP, font que l'oxazépam, et plus généralement les benzodiazépines, sont largement présentes dans les milieux aquatiques.

II - Les benzodiazépines : mécanismes d'action, métabolisation et toxicité

Les benzodiazépines sont une classe de molécules psychotropes qui ont en commun une structure moléculaire mais qui présentent une diversité importante de propriétés pharmacologiques. Elles représentent une part importante des psychotropes consommés.

A) Structure des benzodiazépines

Les benzodiazépines sont des molécules organiques composées de trois parties : un cycle benzène (benzo), 2 atomes d'azote (diazapentène) et un cycle azoté à 7 atomes (azépine) (Figure 1-6). Ce sont la nature et la position des substituants (R1, R2, R3, R4, R7, R2') qui vont conditionner

l'activité de la molécule. Par exemple, en position R7, plus le substituant est électronégatif, plus l'activité de la molécule est augmentée.

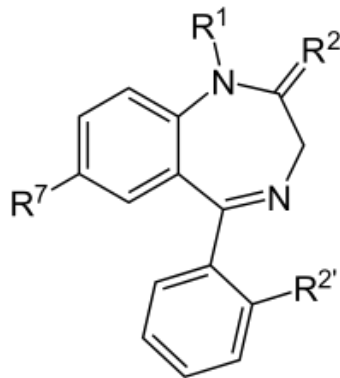


Figure 1-6 : Structure principale des benzodiazépines. Les labels « R » dénotent des chaînes latérales, donnant aux différentes benzodiazépines leur propriété.

La molécule d'oxazépam possède un atome d'hydrogène en position R1, un atome d'oxygène en position R2 et un atome de chlore en position R7 (Figure 1-7).

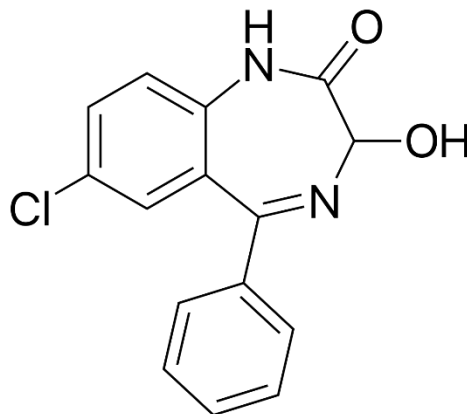


Figure 1-7 : Structure de l'oxazépam

Il existe une cinquantaine de benzodiazépines commercialisées dans le monde, dont une vingtaine en France (Tableau 1-4). On retrouve des molécules dont les propriétés majeures sont anxiolytiques, hypnotiques et anticonvulsivantes. En France, le zolpidem et le zopiclone sont des molécules apparentées aux benzodiazépines de par leur mode d'action mais ont une structure différente.

Tableau 1-4 : Benzodiazépines (ou apparentées) commercialisées en France en 2015 (ANSM, 2017).

Sous-classe thérapeutique	Substance active
Anxiolytique	Alprazolam
	Bromazépam
	Clobazam
	Clorazépate
	Clotiazépam
	Diazépam
	Ethyl lofazépate
	Lorazépam
	Nordazépam
	Oxazépam
	Prazépam
Hypnotique	Estazolam
	Loprazolam
	Lormétazépam
	Midazolam
	Nitrazépam
Anticonvulsivant	Clonazépam
	Midazolam
Apparentés aux benzodiazépines	Zolpidem
	Zopiclone

B) Mécanismes d'action des benzodiazépines

Les benzodiazépines sont des molécules permettant d'accentuer les effets de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central, en se fixant sur les récepteurs GABA de type A (récepteurs GABA_A).

Le récepteur GABA_A est un récepteur appartenant à la grande famille des canaux ioniques, qui inclut également les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, les récepteurs de type 3 à l'hydroxytryptamine (5-HT) et les récepteurs NMDA (glycine) (Schofield et al., 1988). Les récepteurs GABA sont non seulement la cible du GABA et des benzodiazépines mais également de nombreux autres composés comme les barbituriques, neurostéroïdes, anesthésiques et alcools (Sieghart, 1995). Le récepteur est composé, chez les mammifères, de 5 sous unités glycoprotéiques qui peuvent appartenir à 8 différentes classes de sous unités (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1-3), même si la majorité des récepteurs sont de type α 1 β 2 γ 2, α 2 β 3 γ 2 ou α 3 β 3 γ 2 (2:2:1) (Whiting, 2003). Toutes les sous unités sont composées d'un domaine extracellulaire N-terminal qui comportent les sites de liaison, de quatre domaines

transmembranaires et d'une grande boucle intracellulaire (Nayeem et al., 1994; Schofield et al., 1988). Les deux sites de liaison des molécules de GABA sont situés entre les sous unités α et β tandis que celui des benzodiazépines se situe entre les sous unités α et γ (Wafford, 2005) (Figure 1-8). Parmi les sous unités α , seules, les 1, 2, 3 et 5 possèdent une forte affinité avec les benzodiazépines (Kelly et al., 2002). De plus, les effets anxiolytiques des benzodiazépines sont médiés par les sous unités $\alpha 2$ et $\alpha 3$ alors que les propriétés sédatives sont médiées par les récepteurs contenant les sous unités $\alpha 1$ (Rudolph and Knoflach, 2011).

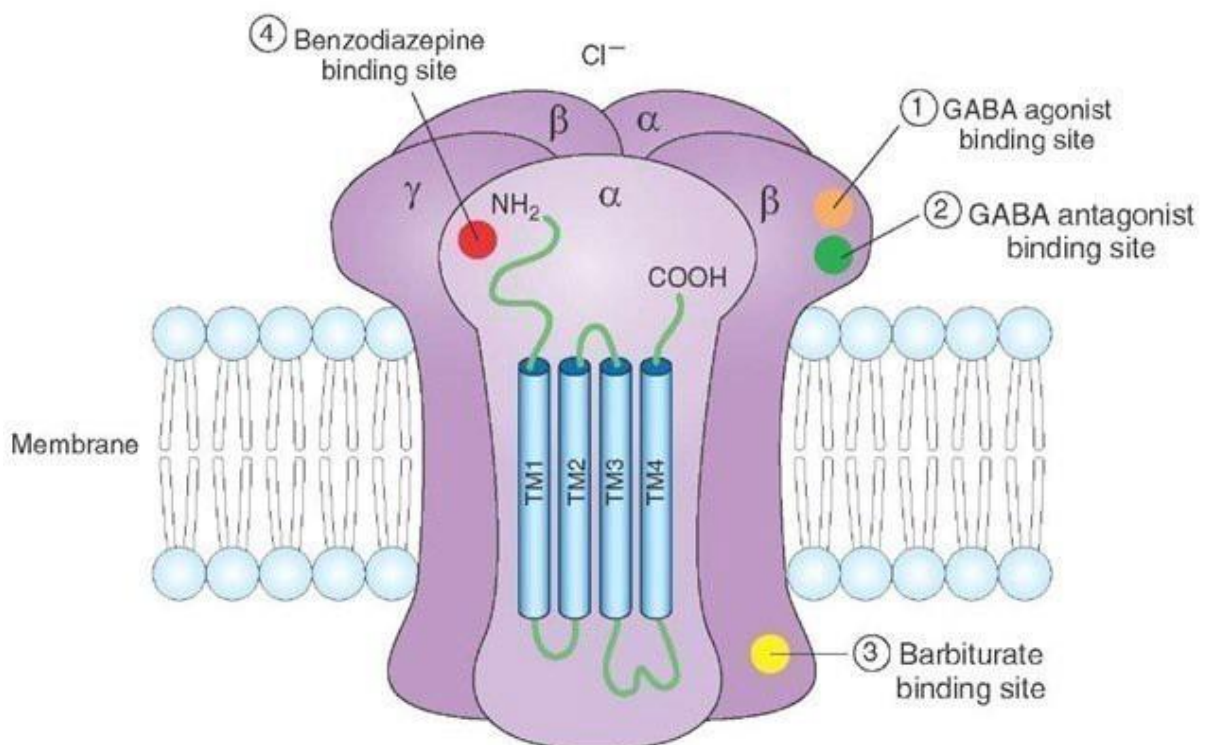


Figure 1-8 : Représentation schématique du récepteur GABA_A. Les deux sites de liaison des molécules de GABA sont situés entre les sous unités α et β , tandis que le site de liaison des benzodiazépines se situe entre les sous unités α et γ (source : what-when-how.com).

La fixation de deux molécules de GABA sur le récepteur induit un changement de conformation entraînant l'ouverture du canal chlorure. L'entrée d'ions chlorure dans la cellule va entraîner une hyperpolarisation de la membrane des neurones post-synaptiques, causant une inhibition de la neurotransmission en diminuant l'excitabilité membranaire (Figure 1-9). Les benzodiazépines étant des modulateurs allostériques positifs du récepteur GABA_A, leur liaison au niveau de leur site spécifique sur le récepteur GABA_A entraîne une modification de conformation du récepteur, augmentant l'affinité pour le GABA.

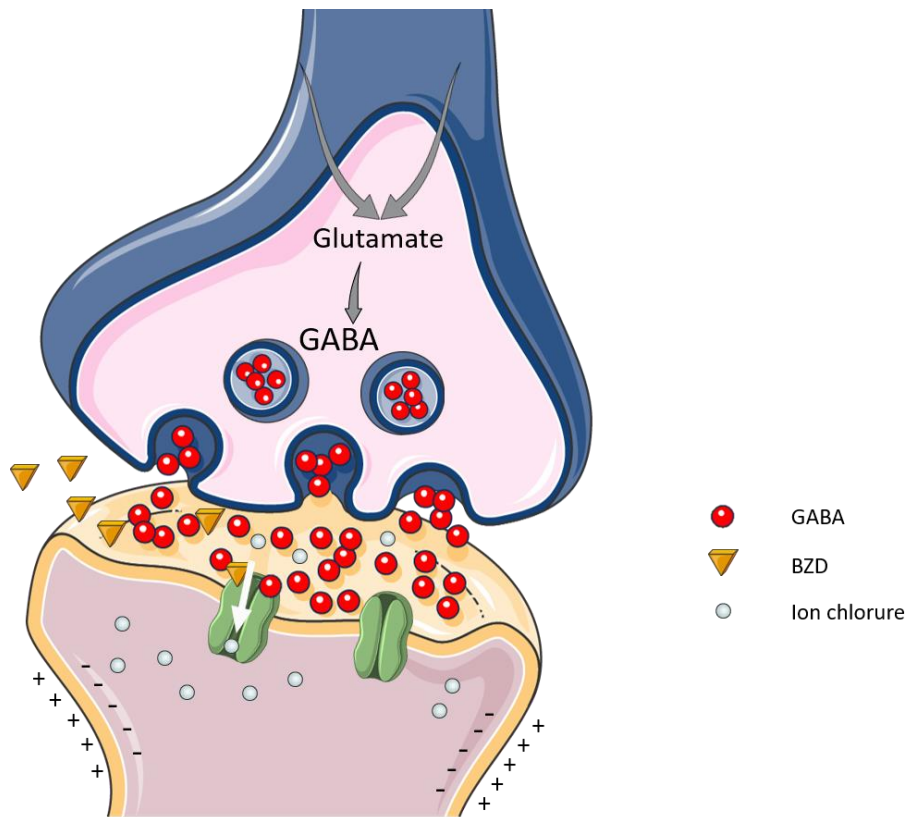


Figure 1-9 : Mode d'action des benzodiazépines au niveau des synapses gabaergiques.

C) Métabolisation et demi-vie des benzodiazépines dans l'organisme cible

Les benzodiazépines sont généralement divisées en trois groupes selon leur propriétés pharmacocinétiques chez l'Homme : les benzodiazépines à action à très court terme (moins de 5h), à moyen terme (entre 5 et 24h) et à long terme (plus de 24h) (Greenblatt et al., 1983a). La durée d'action est non seulement liée à la molécule mère mais également aux métabolites actifs qui peuvent en dériver. En effet, de nombreuses benzodiazépines (diazepam, clorazépate, prazépam, médazépam) se dégradent en un métabolite à action longue, le N-desmethyldiazepam (Figure 1-10) (Jochemsen and Breimer, 1984).

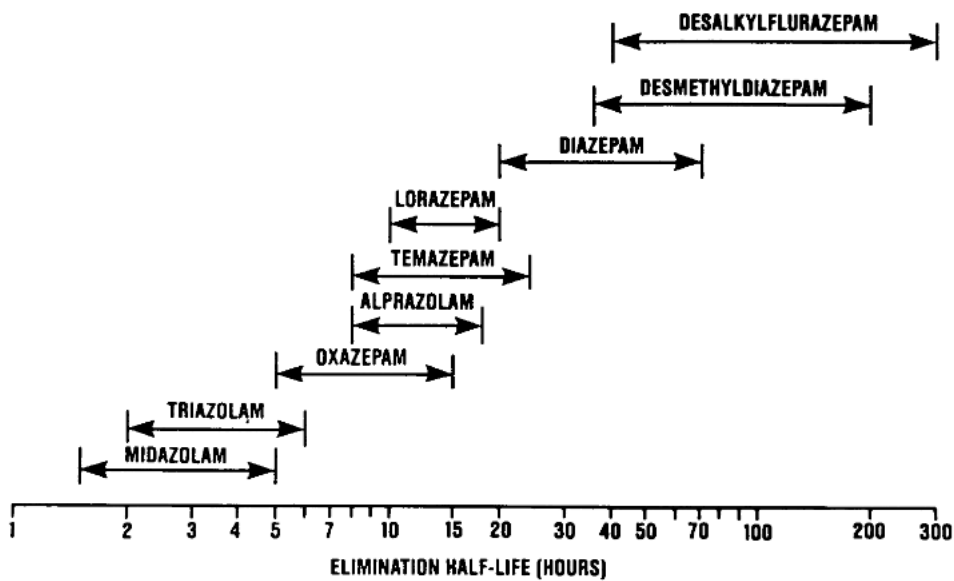


Figure 1-10 : Valeurs des demi-vies de plusieurs benzodiazépines (d'après Greenblatt and Shader (1985)).

La métabolisation des benzodiazépines implique en général deux réactions, une oxydation et réduction hépatique (réaction de phase I) et une glucuronisation (réaction de phase II) (Greenblatt et al., 1983b). Les réactions de phase I sont localisées au niveau du foie par les cytochromes P450 (CYP) dont les plus fréquemment impliqués sont le CYP3A4 et CYP2C19 (Figure 1-11). Les métabolites ainsi obtenus, généralement très hydrophobes, sont rendus plus hydrophiles par glucurono-conjugaison afin de faciliter leur excrétion. La glucurono-conjugaison consiste à ajouter un acide glucuronique activé sous forme d'UDP-acide glucuronique à la molécule initiale grâce à une glucuronyl-transférase. Certaines benzodiazépines commercialisées comme l'oxazépam, le témazépam ou le lorazépam subissent directement cette réaction de glucurono-conjugaison sans subir les transformations de phase I, et sont généralement des benzodiazépines à courte durée d'activité et rapidement éliminées (Chouinard et al., 1999).

Comme l'indique la figure 1-11, l'oxazépam est le métabolite final de nombreuses benzodiazépines (chlordiazépoxyde, médazépam, clorazépate, prazépam, halazépam, nordazépam, diazépam, témazépam) (Griffin et al., 1995; Langner et al., 1991), ce qui est un facteur expliquant les taux d'abattement négatifs observés en sortie de STEP (Cf I-D).

accroissement de comportements agressifs (Guaitani et al., 1971). Une exposition de souris gestantes affecte la survie des nouveau-nés (Owen et al., 1970). De plus, il a été montré qu'un traitement au diazépam et au clonazépam sur des souris gestantes induisait une dépression de la réponse immunitaire de la descendance (Schlumpf et al., 1989). Chez les mâles, les benzodiazépines entraîneraient une production moindre de spermatozoïdes, combinée à des malformations de ces derniers (Kar and Das, 1983; Kishi et al., 1995). Une atrophie prostatique a également été observée après exposition à l'oxazépam chez le chien (Owen et al., 1970). Enfin, une étude menée sur les nouveaux nés exposés aux benzodiazépines durant la grossesse, a montré une apparition des anomalies du système nerveux central ainsi que des problèmes de croissance (Laegreid et al., 1989).

E) Effets connus des benzodiazépines sur les organismes aquatiques non cibles

Les premières études portant sur les effets des benzodiazépines sur les organismes aquatiques sont assez récentes. La majorité d'entre elles s'est portée sur les vertébrés (poissons) et il existe encore peu d'études concernant les invertébrés. Les principales molécules étudiées sont le diazépam et l'oxazépam mais quelques études se sont axées sur d'autres benzodiazépines.

1. Effets des benzodiazépines sur les vertébrés aquatiques

a. Effets des benzodiazépines sur le stade embryonnaire

Une exposition aux benzodiazépines peut entraîner, chez les embryons de poisson, de nombreux effets, tant sur le plan physiologique que comportemental ou moléculaire. Malgré le fait que les embryons de poissons zèbres bioaccumulent peu l'oxazépam, celui-ci provoquerait des anomalies cardiaques et des malformations axiales (Granger Joly de Boissel et al., 2017). De plus, Kalichak et al. (2016) ont montré une mortalité plus importante et une diminution de la fréquence cardiaque chez les larves de poisson zèbre dès exposition à 8 ng de diazépam. Une augmentation de la taille des larves a également été montrée au cours cette même étude, ce qui est en contradiction avec l'étude de Granger Joly de Boissel et al. (2017) dans laquelle la croissance des embryons de médaka semblait être réduite après exposition à l'oxazépam. Concernant le comportement, le diazépam et le lorazépam induisent une réduction de l'anxiété chez les larves de poisson zèbre (Chen et al., 2015; Richendrfer et al., 2012) et une stimulation de l'activité après exposition à forte dose de diazépam (273 µg/L)

pendant 3 jours (Oggier et al., 2010). L'oxazépam induit, quant-à lui, une nage irrégulière chez les larves de poisson zèbre dès une exposition topique (5 min) à 4 µg/L (Granger Joly de Boissel et al., 2017). Du point de vue moléculaire, il a été montré que le diazépam affectait l'expression de gènes impliqués dans le rythme circadien des larves (Oggier et al., 2010) et que l'oxazépam induisait une dérégulation de gènes impliqués dans l'apoptose, la réparation de l'ADN ainsi que du métabolisme mitochondrial (Granger Joly de Boissel et al., 2017).

b. Effets des benzodiazépines sur le stade juvénile

Les études sur le stade juvénile sont plus éparées. Concernant la mortalité, l'oxazépam, à faible concentration (1,1 µg/L) semble augmenter la survie des jeunes perches (Klaminder et al., 2014) tandis qu'aucun effet n'est observé chez les médaka juvéniles, même à des concentrations plus importantes (Chiffre et al., 2016). Au niveau comportemental, le diazépam et l'oxazépam perturbent globalement les activités locomotrices des poissons juvéniles (Chiffre et al., 2016; Klaminder et al., 2014; Wu et al., 2020). Wu et al. (2020) ont également observé une perturbation dose-dépendante des niveaux du neurotransmetteur GABA après exposition au diazépam (augmentation à 12 et 120 µg/L et diminution à 1200 µg/L). Les auteurs suggèrent que ces variations du niveau de GABA pourraient en partie expliquer les modifications comportementales observées.

c. Effets des benzodiazépines sur le stade adulte

Le stade adulte est celui qui recense le plus d'études de toxicité des benzodiazépines, la majorité d'entre elles se focalisant sur des données comportementales, réalisées par l'équipe du Pr. Brodin (Suède). Quelques données de bioaccumulation ont montré que l'oxazépam était préférentiellement accumulé dans le cerveau, le plasma et le foie plutôt que dans les muscles, avec une concentration d'oxazépam dans le plasma des poissons du même ordre de grandeur que ce que l'on peut observer chez l'homme (Huerta et al., 2016). De plus, cette bioaccumulation est inversement proportionnelle à la masse des poissons (Heynen et al., 2016) et fortement impactée par la consommation de proies contaminées (Brodin et al., 2014). La mortalité des perches semble, de la même façon qu'au stade juvénile, diminuer après exposition à 1,2 µg/L d'oxazépam (Klaminder et al., 2014) mais une récente étude souligne que la même espèce exposée en mésocosme ne présente pas de modification de la mortalité, ni de la croissance (Lagesson et al., 2018). De manière générale, les benzodiazépines

induisent une stimulation de l'activité (Brodin et al., 2017, 2014, 2013; Klaminder et al., 2014) et de l'audace (Brandão et al., 2013; Brodin et al., 2017; Cervený et al., 2020; Gebauer et al., 2011; Saaristo et al., 2017; Sundin et al., 2019), et ce, à des doses de l'ordre du ng/L, après 7 jours d'exposition. Ces altérations du comportement seraient cependant réversibles après une période de dépuraction (Sundin et al., 2019). D'autres modifications du comportement ont été observées suite à une exposition aux benzodiazépines, comme une augmentation de la prise alimentaire ainsi qu'une réduction de la sociabilité et de la cohésion en banc de poisson (Brodin et al., 2013; Gebauer et al., 2011). Le comportement associé à la migration est également perturbé avec une augmentation de l'activité migratoire par l'oxazépam (96h d'exposition à 1,9 µg/L) et une augmentation de la vitesse de migration par le témazépam (Hellström et al., 2016; McCallum et al., 2019). De récents travaux ont mis en évidence une perturbation de la réponse à la prédation chez les poissons zèbres avec une différence de sensibilité entre les individus sauvages et d'élevage (Vossen et al., 2020b). De plus, une tolérance à l'oxazépam semble avoir été mise en lumière puisque 7 µg/L d'oxazépam impacteraient la réponse à la prédation au bout de 7 jours mais plus après 28 jours (Vossen et al., 2020a). L'impact sur la reproduction est plus contesté. En effet, les travaux de Hellström et al. (2020) et de Lorenzi et al. (2014) n'ont signalé aucun impact, ni de l'oxazépam, ni du diazépam sur le comportement reproducteur des poissons. Enfin, l'étude de Cervený et al. (2020) montre les interactions que peuvent avoir les benzodiazépines en mélange. En effet, un mélange d'oxazépam, témazépam, promazépam et clobazépam induit des modifications du comportement qui n'avaient pas été observées en testant les molécules seules.

A travers l'ensemble de ces études, il apparaît que les benzodiazépines induisent majoritairement des effets embryotoxiques, ainsi que d'importantes perturbations du comportement chez les poissons juvéniles et adultes.

2. Effets des benzodiazépines sur les invertébrés aquatiques

Les études sur les organismes non-vertébrés aquatiques restent plus éparpillées et une grande partie de ces études s'est focalisée sur la bioaccumulation des benzodiazépines, principalement chez les crustacés. Une étude de bioaccumulation de l'oxazépam chez plusieurs taxons d'invertébrés aquatiques représentant la chaîne trophique a montré que les organismes les plus contaminés étaient ceux en contact avec le sédiment (gastéropodes,

crustacés isopodes) (Lagesson et al., 2016). Le gammare montre une forte capacité de dépuración de l'oxazépam (plus de 50% de la concentration initiale en 6h) (Garcia-Galan et al., 2017). Une seconde étude a montré une faible bioaccumulation du diazépam par le gammare, potentiellement lié à un mécanisme de transformation et excrétion efficace puisque le nordazépam et l'oxazépam, des métabolites du diazépam, ont été détectés dans les tissus (Miller et al., 2017). La seule étude comportementale chez les invertébrés a montré une stimulation de l'activité locomotrice de l'écrevisse après exposition d'une semaine à 1 µg/L d'oxazépam (Kubec et al., 2019). Concernant la reproduction, le diazépam (exposition de 3 semaines à 0,1 µg/L) induit une stimulation de la production d'embryons chez la daphnie (Fuertes et al., 2019; Rivetti et al., 2016) et il a été montré qu'une exposition à 10 µg/L d'oxazépam induisait un retard d'éclosion chez le gastéropode *R. balthica* (Mazzitelli, 2017). Du point de vue moléculaire, une exposition au diazépam induit une perturbation d'un grand nombre de gènes impliqués dans la croissance, la reproduction, le métabolisme énergétique ainsi que dans la régulation nerveuse chez les daphnies (Fuertes et al., 2019). Chez le gastéropode juvénile, l'oxazépam perturberait l'expression de gènes impliqués dans la communication cellulaire (voies Notch et JNK) ainsi que dans la voie de biosynthèse des polyamines et des catécholamines (Mazzitelli et al., 2017).

L'ensemble de ces études a mis en évidence des effets des benzodiazépines sur les organismes aquatiques (vertébrés et invertébrés), se manifestant au niveau du comportement, de la reproduction ou du développement. La molécule la plus impactante, de par ses fortes concentrations environnementales et ses nombreux effets sur les organismes non cibles, est l'oxazépam.

III – Description de l'organisme d'étude : *Radix balthica*

A) Généralités

L'organisme d'étude, *Radix balthica* (Linnaeus, 1758), est un gastéropode pulmoné d'eau douce dont la classification systématique est la suivante : Animalia, Eumetazoa, Bilateralia, Protostomia, Lophotrochozoa, Mollusca, Gastropoda, Basommatophora, Lymnaeidae, Radix.

Radix balthica est une espèce représentative des milieux lenticules d'eau douce tels que les lacs, étangs, cours d'eau et rivières à faible débit. Il est présent au niveau d'une grande partie

de l'Europe (Seddon et al., 2014) (Figure 1-12). Il se nourrit généralement d'algues, de biofilms et de plantes en décomposition.



Figure 1-12 : Distribution de l'espèce *Radix balthica* (Seddon et al., 2014).

Concernant sa morphologie, sa coquille mesure environ 1 à 2 cm à l'âge adulte. Elle est dextre, translucide, en forme de goutte mais avec une pointe discrète. La forme de la coquille peut être très variable au sein d'une même espèce (Schniebs et al., 2011). Ahlgren et al. (2015) ont montré une forte relation entre la prise de risque de l'individu et la forme de sa coquille. En effet, les individus prenant plus de risques présentaient une coquille plus ronde et plus large que les individus réservés. Sous la coquille, le manteau est orné de taches plus ou moins sombres (Figure 1-13). Il a été montré que la pigmentation du manteau était liée à leur environnement et que cette plasticité phénotypique était induite par la présence d'un prédateur (camouflage) et par l'exposition aux UV (photoprotection) (Ahlgren et al., 2013). Le pied est vert pâle, les tentacules sont larges, triangulaires et plats. Les yeux sont situés à la base des tentacules. La respiration se fait grâce à une cavité pulmonaire et la ventilation est réalisée par ouverture/fermeture d'un tube musculaire relié au poumon et localisé sur le côté

droit de l'animal (le pneumostome). La respiration cutanée peut être également importante et dépend de l'oxygénation du milieu.



Figure 1-13 : *Radix balthica* (photographies personnelles).

Cependant, parmi le genre *Radix*, il existe de nombreuses espèces morphologiquement proches qu'il est possible de confondre au moment des échantillonnages dans le milieu. En Europe, cinq espèces sont présentes, *Radix balthica*, *auricularia*, *labiata*, *ampla* et *lagotis*. Même si des critères morphologiques ont été décrits pour chacune des espèces (Schniebs et al., 2013, 2011), il est désormais admis que ces derniers ne sont pas suffisants pour différencier chaque espèce, une identification moléculaire est donc indispensable (Pfenninger et al., 2006; Schniebs et al., 2011).

Radix balthica est, comme tout Lymnaeidae, un organisme hermaphrodite présentant des organes sexuels mâles et femelles distincts. Chaque individu alternera entre le rôle de mâle ou de femelle (Koene and Ter Maat, 2005; Van Duivenboden and Maat, 1985). Les œufs sont pondus sur les végétaux ou les substrats rocheux, par grappes de quelques dizaines, enveloppés par une gangue gélatineuse protectrice (Figure 1-14). Après dix à quinze jours de développement, les œufs éclosent.

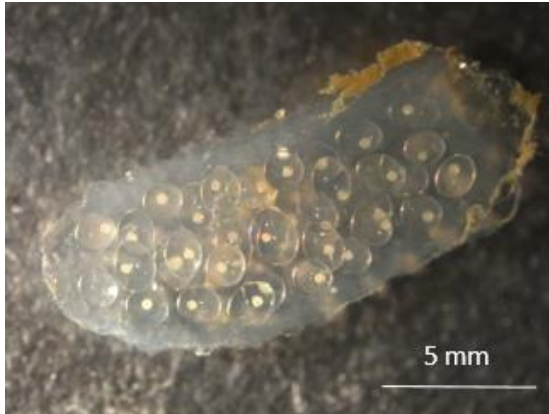


Figure 1-14 : Ponte de *Radix balthica*. Les œufs sont regroupés au sein d'une gangue gélatineuse (photographie personnelle).

B) Reproduction de *Radix balthica* : de la gamétogénèse à la ponte

1. Caractérisation de la reproduction

Chez les gastéropodes, l'organogénèse de l'appareil reproducteur se met en place très rapidement. Les organes sexuels se différencient au cours de l'embryogénèse (Fraser, 1946) et se développent au cours de la croissance. L'appareil reproducteur des gastéropodes se compose de trois systèmes : i) la glande hermaphrodite (ou ovotestis) et l'ovispermiducte sont le lieu de production et de stockage des gamètes mâles et femelles, ii) l'appareil reproducteur mâle, composé du complexe pénial, de la prostate et du vas deferens et iii) l'appareil reproducteur femelle, composé de l'oviducte, de la glande nidamentaire et de la glande albumen (Figure 1-15). *R. balthica* est un hermaphrodite protandre, c'est à dire que l'appareil reproducteur male est opérationnel avant l'appareil femelle (Holm, 1946).

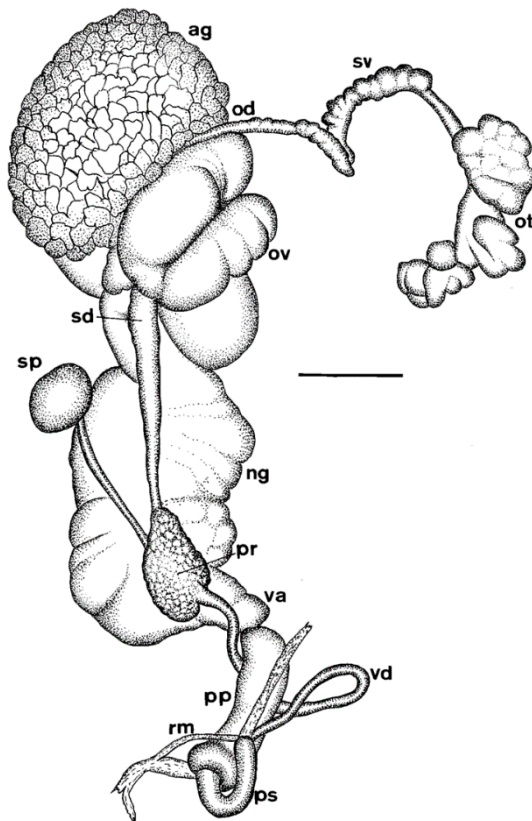


Figure 1-15 : Anatomie de l'appareil reproducteur des Lymnaeidae. ag : glande albumen, ng : glande nidamentaire, od : ovispermiducte, ot : ovotestis, ov : oviducte, pr : prostate, ps : complexe pénial, sd : spermiducte, sp : spermathèque, va : vagin. Echelle : 1 mm (d'après Samadi et al., 2000).

Le comportement copulatoire mâle est généralement dominant, notamment après une période d'isolement où l'individu le plus longtemps isolé prendra le rôle du mâle pour le premier accouplement (Van Duivenboden and Maat, 1985). De plus, l'isolement induit une augmentation de la taille de la prostate des individus ainsi qu'une augmentation du volume de sperme transféré (Dillen et al., 2008; Loose and Koene, 2008). Il a été également montré que le sperme insemé (allosperme) peut être stocké pendant plus de deux mois dans la spermathèque avant d'être utilisé pour la fécondation (Loose and Koene, 2008; Nakadera et al., 2014).

Après fécondation, les spermatozoïdes sont libérés dans l'oviducte et sont transportés vers l'ovispermiducte où a lieu la fécondation des œufs. Les œufs fécondés redescendent ensuite vers l'oviducte où ils sont entourés de fluide perivitellin sécrété par la glande albumen. Le passage au niveau de la glande nidamentaire permet d'encapsuler chaque œuf dans deux membranes, la membrane interne et la membrane externe (Meshcheryakov, 1990). Les sécrétions de la glande mucipare permettent de produire la capsule muqueuse englobant l'ensemble des œufs (Plesh et al., 1971).

2. Comportements reproducteurs

Le comportement reproducteur a largement été décrit, notamment chez *Lymnaea stagnalis* et est divisé en 6 étapes que sont le chevauchement, la rotation sur la coquille du congénère, le positionnement, l'éversion, l'inspection et l'intromission (De Boer et al., 1996; Koene, 2010) (Figure 1-16A). La durée moyenne de reproduction est de minimum 50 minutes mais peut aller jusqu'à plusieurs heures (De Boer et al., 1996; Koene, 2010). De plus, le temps de copulation

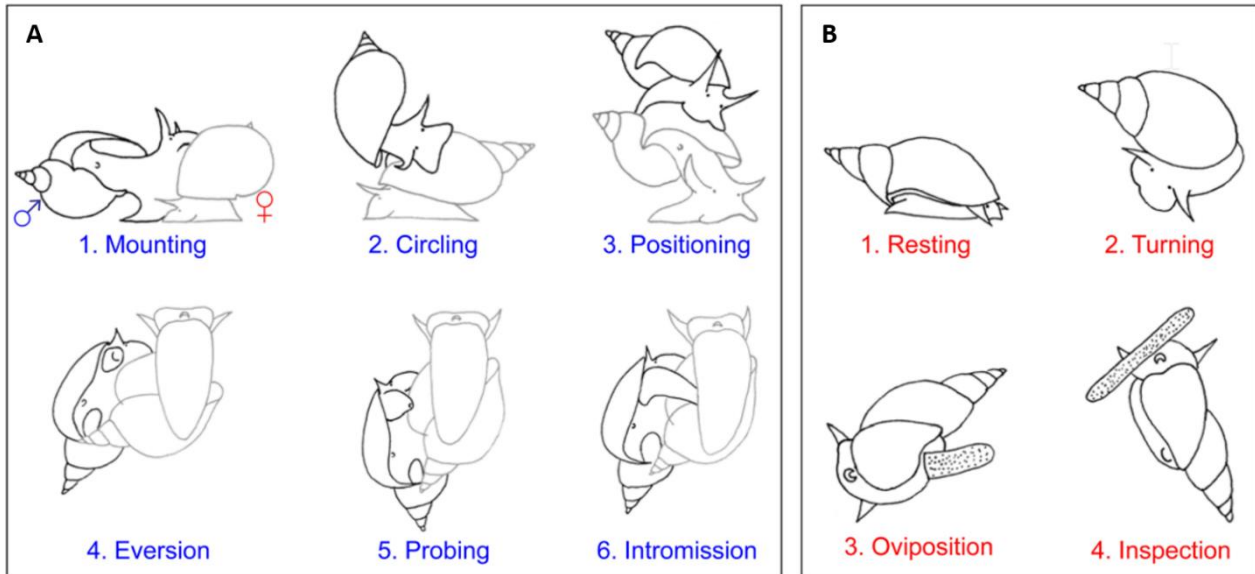


Figure 1-16 : Caractérisation du comportement copulatoire (A) et de ponte (B) chez *Lymnaea stagnalis* (d'après Koene, 2010)

peut être réduit si les individus sont soumis à un isolement précédant la reproduction (Van Duivenboden and Maat, 1985).

Le comportement de ponte a également été caractérisé et dure environ 2 heures et 15 minutes, suivi de la phase d'inspection de la ponte (Ter Maat et al., 1989) (Figure 1-16B).

3. Régulation nerveuse de la reproduction

Le contrôle nerveux régulant la reproduction a été largement étudié chez la Lymnée et a notamment fait l'objet d'une review par Koene (2010). Le comportement copulatoire mâle est principalement contrôlé par quelques groupes de neurones localisés au niveau des lobes antérieurs, du lobe ventral droit, du cluster Ib du lobe pedal droit ainsi qu'au niveau de quelques cellules dispersées du lobe pariétal droit et du ganglion pleural (De Boer et al., 1996). Les principaux neuropeptides régulateurs du comportement copulatoire sont APGWamide, FMRFamide, conopressin, neuropeptide Y, pedal peptide, LIP, etc (Figure 1-17).

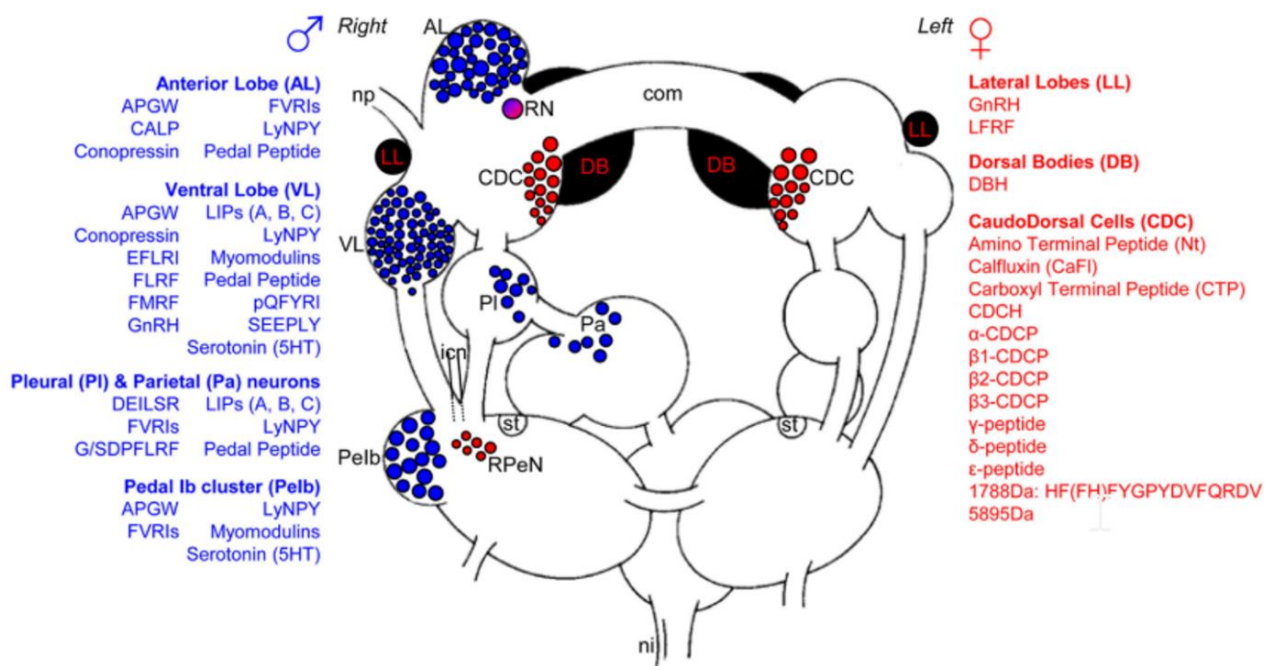


Figure 1-17 : Schéma indiquant les ganglions du système nerveux. Les points bleus et rouges représentent les clusters impliqués dans la reproduction mâle et femelle respectivement. Les substances impliqués dans la reproduction mâle sont indiquées en bleu tandis que les substances impliquées dans le comportement femelle sont indiquées en rouge. Com : commissure cérébrale, icn : nerf cervical inférieur, ni : nerf intestinal, np : nerf périal, RN, anneau ganglionnaire, RpeN : neurone pédieux droit, st : statocyste (d'après Koene, 2010).

Le principal lieu de contrôle neuroendocrinien de la ponte est le groupe de cellules caudodorsales situé au niveau du ganglion cérébral (Ter Maat et al., 1983). Les corps dorsaux sont également un lieu important de régulation neuroendocrinienne de la ponte (Koene, 2010). Les principaux peptides régulant les comportements de pontes appartiennent tous à la famille des « caudodorsal cell hormones » (CDCH), appelées également hormones d'ovulation (Hermann et al., 1997).

C) Caractérisation du développement embryonnaire

Le développement embryonnaire des gastéropodes d'eau douce et notamment de *Lymnaea stagnalis* a été largement caractérisé (Meshcheryakov, 1990; Pande et al., 2010; Sarker et al., 2007). Les grandes étapes de l'embryogénèse de *Radix balthica* sont présentées en figure 1-18.

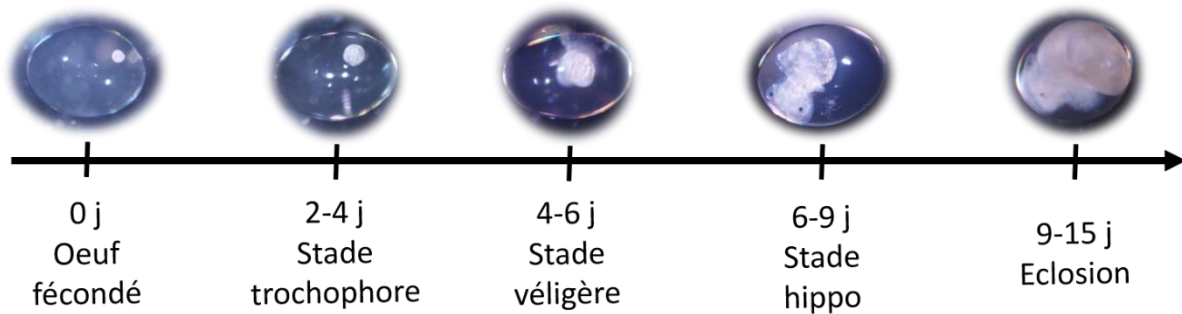


Figure 1-18 : Les grandes étapes de l'embryogénèse de *Radix balthica* (photographies personnelles).

Même si la vitesse de développement peut varier en fonction de la température d'incubation (Meshcheryakov, 1990), il est estimé qu'à 22°C, l'œuf débute sa première division environ 2-3 heures après la ponte et que la seconde division survient 2 heures après la première. Les divisions mitotiques se succèdent par la suite pour aboutir au stade blastula après environ 25 heures. Au bout de 2 à 3 jours, l'embryon atteint le stade trochophore et mesure environ 150 à 200 μm . C'est à ce stade que se forment les couronnes ciliaires, responsables de la rotation

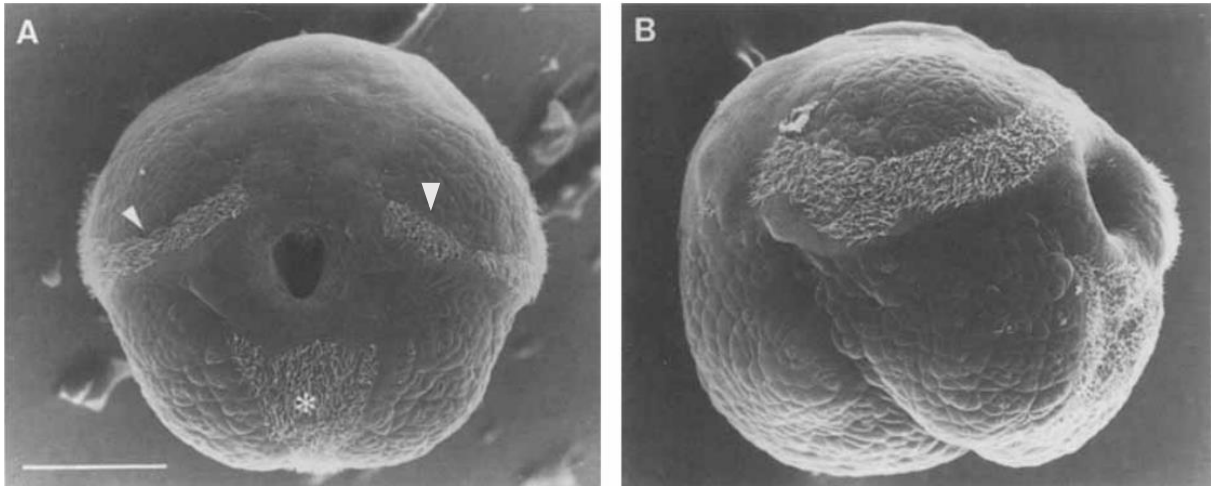


Figure 1-19 : Photographie de microscopie électronique d'un embryon de *Helisoma trivolvis* au stade trochophore en vue antérieure (A) et latérale droite (B). Les bandes ciliaires dorsolatérales sont indiquées par des flèches et la bande ventrale est indiquée par un astérisque. Echelle : 50 μm (d'après Diefenbach et al., 1991).

de l'embryon. Trois couronnes ciliaires sont visibles à ce stade ; deux couronnes dorsolatérales (droite et gauche) et une couronne ventrale (Figure 1-19).

Une hypothèse, émise par Goldberg et al. (2008), avance l'idée que les rotations embryonnaires seraient un comportement de réponse à l'hypoxie et permettraient une bonne oxygénation du fluide vitellin. De plus, il a été démontré qu'il existait deux types de rotations embryonnaires ; des rotations lentes et basales, dues aux battements ciliaires constitutifs et des périodes de rotations plus rapides appelés « surges », dues à une stimulation par les motoneurones cilio-exciteurs (Diefenbach et al., 1991). Ces accélérations de rotation seraient sous contrôle sérotoninergique (Diefenbach et al., 1991; Goldberg et al., 2011; Hiripi and Elekes, 2010; Uhler et al., 2000) et de nombreuses études ont montré l'implication de l'oxyde nitrique synthase (NOS), du Ca^{2+} , de la protéine kinase C dans la stimulation de rotation (Christopher et al., 1996, 1999; Doran and Goldberg, 2006).

Le stade véligère est atteint 4 à 6 jours après fécondation. A ce stade, le pied se différencie du complexe viscéral et le processus de torsion démarre. Le cœur est fonctionnel et les yeux commencent à être visibles. Au stade hippo (6 à 9 jours post-fécondation), l'embryon a globalement sa forme adulte. Le pied est complètement différencié, la coquille est formée et les organes sont en place (Meshcheryakov, 1990). Les battements cardiaques sont bien visibles à travers la coquille. Ils sont contrôlés par l'acétylcholine, la sérotonine, la dopamine, les SCP (Small Cardioactive Peptides) ainsi que les peptides associés aux FMRFamide (Buckett et al., 1990).

Les embryons éclosent en général entre 9 et 15 jours post fécondation mais le pic d'éclosion a lieu en général au 11^{ème} jour au cours duquel environ 30% des embryons éclosent chez *L. stagnalis* (Marois and Croll, 1991). Il a été démontré que les mécanismes de déclenchement de l'éclosion étaient à la fois mécaniques et moléculaires. En effet, l'éclosion est déclenchée par la rupture de la membrane embryonnaire, provoquée par la répétition de mouvements de radula de l'embryon le long de la paroi (Meshcheryakov, 1990). Il a également été montré que la sérotonine et la dopamine augmentait le nombre de mouvements de radula (Elekes et al., 2018; Filla et al., 2009). Chez de nombreuses espèces de gastéropodes aquatiques, la sécrétion de substances protéolytiques à l'approche de l'éclosion ainsi qu'un changement osmotique favoriseraient également la rupture membranaire (Andrade-Villagrán et al., 2018a; Hawkins and Hutchinson, 1988; Sullivan and Bonar, 1984).

D) Caractérisation du stade juvénile

Au stade juvénile, la croissance de *Radix balthica* suit « normalement » l'équation de von Bertalanffy, c'est à dire une phase de croissance exponentielle, suivie d'une phase de ralentissement puis l'atteinte d'un plateau. Les suivis de croissance de *Radix balthica* en laboratoire sont assez restreints. Wullschleger et Jokela (2002) ont réalisé un suivi de croissance de *Lymnaea peregra* (renommé aujourd'hui *Radix balthica*) et ont montré que la phase de ralentissement de croissance se situait entre 5,5 et 6 mm. L'âge n'a pas été clairement explicité dans cette étude. Il a également été montré que la croissance était contrôlée en partie par les « light green cells » qui produiraient des hormones de croissance (Geraerts, 1976).

A ce stade, une locomotion fonctionnelle est particulièrement importante, notamment pour la recherche de nourriture. La locomotion des Lymnaeidae est liée à trois mécanismes : les contractions de muscles lisses, les battements ciliaires au niveau de la sole pédieuse et la sécrétion de mucus (Pavlova, 2010; Winlow and Haydon, 1986). La locomotion est assurée par une activité basale spontanée des cils pédieux mais elle est stimulée par l'action de la sérotonine, qui agit notamment sur l'activité ciliaire (McKenzie et al., 1998; Pavlova, 2010, 2001; Syed et al., 1988). La dopamine semble également jouer un rôle dans le contrôle de l'activité locomotrice (McKenzie et al., 1998).

La prise alimentaire chez les Lymnaeidae est caractérisée par une série de mouvements répétés : la bouche s'ouvre et la radula racle le substrat alimentaire (phase de « protraction ») puis la nourriture est acheminée dans la bouche (phase de « rétraction »). La nourriture est ensuite avalée (phase de déglutition) puis la séquence est répétée (Elliott and Benjamin, 1989). Les mouvements musculaires liés à la prise alimentaire sont contrôlés par une série de motoneurones qui sont eux-mêmes contrôlés par le réseau d'interneurones du « feeding central pattern generator » (CPG) (Benjamin, 2012). Il a également été montré que la sérotonine, l'acétylcholine et des FMRFamides inhibaient le rythme d'activité buccale (Kyriakides and McCrohan, 1989).

E) Utilisation de *Radix balthica* comme organisme d'étude

De par sa distribution d'habitats large et variée, sa position trophique de consommateur primaire et sa facilité d'élevage en laboratoire, le gastéropode *Radix balthica* a été utilisé de nombreuses fois en tant qu'organisme d'étude en écotoxicologie. Ces études écotoxicologiques sont variées et traitent aussi bien des effets des plastiques (Ehlers et al., 2020; Vosshage et al., 2018) que des produits phytosanitaires (Gething et al., 2020; López-Doval et al., 2019) ou des perturbateurs endocriniens (de Kermoisan et al., 2013; Hallgren et al., 2012). La problématique des psychotropes a également fait l'objet de quelques travaux chez *R. balthica* (Hedgespeth et al., 2018; Mazzitelli, 2017; Mazzitelli et al., 2018, 2017).

Du point de vue moléculaire, le génome mitochondrial de *Radix balthica* a été séquencé en 2010 (Feldmeyer et al., 2010) et le transcriptome embryonnaire a été réalisé en 2015 (Tills et al., 2015), ce qui a permis d'acquérir de nombreuses informations moléculaires. Les bases de données issues de ces travaux pourront également être utilisées pour de futures analyses moléculaires.

Enfin, *Radix balthica* est utilisé depuis quelques années dans notre laboratoire, notamment depuis la thèse de Jean-Yves Mazzitelli (Mazzitelli, 2017) et l'expérience et les connaissances acquises sur cette espèce nous ont permis d'approfondir les études au fur et à mesure.

IV - Objectifs de la thèse

Au cours de cette revue bibliographique, nous avons pu observer l'importance de la consommation des psychotropes. Parmi ces psychotropes, les benzodiazépines, et notamment l'oxazépam, présente une forte rémanence dans l'environnement et est très fréquemment détectée dans les cours d'eaux Européens. Nous avons également pu nous rendre compte du peu d'études toxicologiques de cette molécule sur les organismes aquatiques. Cependant, l'équipe du Pr. Brodin est celle ayant le plus publié sur les effets de l'oxazépam mais ces travaux se sont focalisés sur le comportement des vertébrés (poissons). En revanche, très peu de données sont disponibles concernant les effets de l'oxazépam sur les invertébrés. Il apparaît donc important de combler cette lacune en apportant des informations de toxicité sur un organisme invertébré, benthique et à la base de la chaîne trophique. De par sa large distribution sur le territoire européen et l'intérêt grandissant pour l'utilisation de cette espèce en écotoxicologie, notre choix s'est porté sur le gastéropode d'eau douce *Radix balthica*.

L'objectif de cette thèse est donc d'étudier les effets de concentrations environnementales d'oxazépam sur le gastéropode d'eau douce, *Radix balthica*.

Ayant très peu d'informations de toxicité sur cet organisme, il est apparu nécessaire de réaliser une étude à large échelle, en analysant de nombreux paramètres représentatifs des grandes fonctions de l'organisme, et ce, à trois étapes clés du cycle de vie : la reproduction, l'embryogénèse et le stade juvénile. Nous nous demanderons donc quels sont les effets de l'oxazépam sur la reproduction, l'embryogénèse et la croissance du gastéropode ?

Pour répondre à ces questions, l'impact de l'exposition à l'oxazépam sera observé tant au niveau comportemental que physiologique. En ce qui concerne l'impact de l'oxazépam sur la reproduction de *Radix balthica*, on peut émettre l'hypothèse que la molécule perturbe la quantité et qualité des spermatozoïdes, le comportement reproducteur, la fertilité et la fécondité. De la même façon, si l'oxazépam impacte l'embryogénèse, on peut s'attendre à observer une perturbation des battements cardiaques, des malformations embryonnaires et une perturbation de l'éclosion. Enfin, concernant les effets de l'oxazépam sur le stade juvénile, il est possible que le psychotrope induise une perturbation de la croissance, de l'alimentation ou encore du déplacement. Tous ces paramètres feront donc l'objet d'un suivi au cours des

différentes expériences mises en œuvre. Une étude moléculaire viendra compléter les observations aux stades embryonnaires et juvéniles, dans le but de définir au mieux les mécanismes d'actions de l'oxazépam sur cet organisme.

Ce manuscrit sera donc organisé en trois parties, correspondant aux trois étapes du cycle de vie. La première partie traitera de l'impact de l'oxazépam sur la reproduction de *Radix balthica* au travers d'une exposition longue durée et en ciblant un large panel de paramètres. Cette première étude regroupe une caractérisation de l'appareil reproducteur de *R. balthica* ainsi que l'analyse toxicologique du point de vue comportemental (analyse de la locomotion et des interactions sociales) et physiologique (état de l'appareil reproducteur, densité de spermatozoïdes, suivi de la fertilité et fécondité). La seconde partie concernera le développement embryonnaire du gastéropode. Ce chapitre sera essentiellement axé sur la méthodologie et la mise en place de marqueurs du développement. Enfin, la troisième partie traitera de l'effet de l'oxazépam sur le stade juvénile de *R. balthica*, avec une analyse comportementale, physiologique et moléculaire, ciblant les grandes fonctions essentielles à ce stade de vie telles que la croissance, la prise alimentaire et la locomotion.

L'ensemble de ces résultats permettra de compléter les données de toxicité de l'oxazépam et d'avoir une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action sur les gastéropodes aquatiques.

Partie 2 : Identification des effets de l'oxazépam sur *Radix balthica*

Préambule : Caractérisation génétique de l'espèce *Radix balthica*

I - Introduction

Comme évoqué dans l'état de l'art, les critères morphologiques sont considérés comme insuffisants pour caractériser l'espèce du fait d'une importante variabilité phénotypique interindividuelle. Il est donc apparu nécessaire, dès les premiers mois de thèse, de vérifier l'espèce des individus prélevés sur le terrain. Pour cela, nous nous sommes basés sur l'article de Schniebs et al. (2011) qui avait pour objectif de différencier l'espèce de *R. balthica* des autres espèces de *Radix* sur la base des séquences moléculaires de deux fragments de gènes : ITS-2 et cyt-b. Une analyse moléculaire a été menée par séquençage d'un fragment de gène cyt-b puis par création d'un arbre phylogénétique comprenant les 6 séquences de nos individus d'intérêt ainsi que les séquences des différentes espèces issues de la publication de Schniebs et al. (2011).

II - Méthodologie

A) Sélection des individus à analyser

Les individus ont été échantillonnés en octobre 2017 sur les bords de la Garonne, sur la commune de Saint Nicolas de la Balherme (44°08'23.7"N 0°45'32.0"E). Six individus présentant des différences morphologiques ont été sélectionnés pour l'analyse moléculaire : trois adultes directement prélevés sur la Garonne et trois juvéniles, issus de géniteurs prélevés sur la Garonne. Les individus présentent des différences morphologiques, notamment au niveau de la pigmentation du manteau et au niveau de la forme de la coquille. Chaque individu a été photographié, mesuré au pied à coulisse, pesé, puis sacrifié. Le tableau 2-1 reprend les données de chaque individu.

Tableau 2-1 : Caractéristiques des individus sélectionnés pour la caractérisation génétique

N° individu	Provenance	Photographie	Taille (mm)	Poids (mg)
-------------	------------	--------------	-------------	------------

1	Adulte Garonne		13,6	288,6
2	Adulte Garonne		11	192,4
3	Adulte Garonne		9,4	124,9
4	Juvenile Garonne		4,3	10,6
5	Juvenile Garonne		4,6	16,2
6	Juvenile Garonne		4,4	11,2

B) Extraction ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée selon le protocole de Winnepenninckx et al. (1993) en apportant quelques modifications. Un morceau de pied a été prélevé sur les individus adultes (N° 1, 2, 3) tandis que les juvéniles (N° 4, 5, 6) ont été décoquillés et l'ensemble des tissus a été prélevé. Les tissus ont été pesés puis placés dans 497,5 µL de tampon CTAB (2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% v/v 13-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM TrisHCl pH 8) préchauffé à 65°C. Les tissus ont ensuite été broyés au broyeur à bille (3 x 30 sec, 30 Hz avec pause de 30 secondes entre chaque pulse). De la protéinase K est ajoutée (1 mg/mL final), suivi d'une incubation 24 h à 65°C. Un traitement à la RNase est ensuite réalisé (0,2 mg/mL final, incubation 30 min à 37°C). L'extraction est réalisée par ajout de 550 µL de chloroforme : alcool isoamyl (24 : 1). La solution est secouée vigoureusement puis centrifugée 3 min à 12 000 g, 4°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et 300 µL d'isopropanol sont

ajoutés pour précipitation. Après 30 min d'incubation à -20°C, la solution est centrifugée 20 min à 11 200g, 4°C et le surnageant est éliminé. Le culot est lavé deux fois à l'éthanol 70% et centrifugé 10 min à 11 200g. Le culot est finalement séché à l'air puis remis en suspension dans 20 µL d'eau ultra pure. La quantité d'ADN et la qualité de l'extraction sont vérifiés au Nanodrop.

C) PCR avec couple d'amorces dégénérées

Des amorces dégénérées ont été créées à partir de l'alignement des 75 séquences du gène *cyt-b* des différentes espèces de *Radix* de l'étude de Schniebs et al. (2011) et de la séquence du même gène provenant du séquençage du transcriptome de *R. balthica* réalisé au laboratoire lors de la thèse de J-Y Mazzitelli. L'amorce sens (5'-CWTTTRACNCGWTTTTATTC-3') fait 19 pb et présente 32% de dégénérescence. L'amorce anti-sens (5'-GDGTRACTTTRATRTTHGC-3') de 19 pb présente 72% de dégénérescence. Les amorces ont été dessinées à la main puis vérifiées sur Primer3.

Une PCR a été réalisée afin d'amplifier le fragment d'intérêt. Pour cela ont été mélangés du tampon PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 2 µM de chacune des amorces, 1U/µL de Taq polymérase (Invitrogen) et 200 ng d'ADN, pour un volume final de 25 µL. Le programme PCR est présenté dans le tableau 2-2.

Tableau 2-2 : Programme PCR utilisé lors de l'amplification des fragments d'intérêt.

Etapes	Température	Temps	Nombre cycles
Dénaturation initiale	95°C	5 min	
Préamplification	95°C	30 sec	8 cycles
	45°C + 1°C/cycle	30 sec	
	72°C	1 min	
Amplification	95°C	30 sec	32 cycles
	52°C	30 sec	
	72°C	1 min	
Elongation finale	72°C	10 min	
Conservation	4°C	∞	

D) Vérification de l'amplification et purification de l'amplicon d'intérêt

L'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. L'amplification n'ayant pas été totalement sélective, il a été nécessaire de procéder à une excision du gel contenant l'amplicon d'intérêt et de purifier le fragment. Cette étape a été réalisée selon le protocole PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). La présence de sels issus du gel d'agarose et du bleu de charge étant importante à la suite de cette extraction, une purification des produits PCR a été nécessaire et a été réalisée selon le protocole du Charge Switch Pro PCR Cleanup Kit (Invitrogen). Une fois la qualité des produits PCR jugée satisfaisante après passage au Nanodrop, les fragments ont été séquencés par le plateau Génomique Get-Purpan (Toulouse).

E) Construction de l'arbre phylogénétique

Une fois les produits PCR séquencés, les amplicons de 240 pb ont été alignés avec les séquences de la publication de Schniebs et al. (2011), ainsi qu'avec la séquence du fragment du gène de *cty-b* issu du transcriptome de *R. balthica* réalisé lors de la thèse de J-Y Mazzitelli et avec la séquence du même gène séquencé par Feldmeyer et al. (2010) chez *R. balthica*. De la même manière que dans la publication de référence, un arbre phylogénétique utilisant la méthode du Maximum de Parsimonie a été réalisé grâce au logiciel MEGAX (V 10.1.1).

III - Résultats de la caractérisation génétique

L'alignement de séquence est présenté en annexe 1 et une partie de l'arbre phylogénétique est présentée en figure 2-1 (figure complète en annexe 2). Le résultat de cet arbre nous informe sur le fait que sur les 6 individus sélectionnés, tous semblent appartenir à l'espèce *R. balthica*. L'ensemble des individus prélevés à Saint Nicolas de la Balherme appartiennent à l'espèce *Radix balthica*. En conclusion, il apparaît nécessaire pour la suite des expérimentations d'utiliser les individus prélevés dans la Garonne, au niveau de Saint Nicolas de la Balherme ou de faire une nouvelle vérification moléculaire dans le cas d'individus prélevés sur d'autres sites.

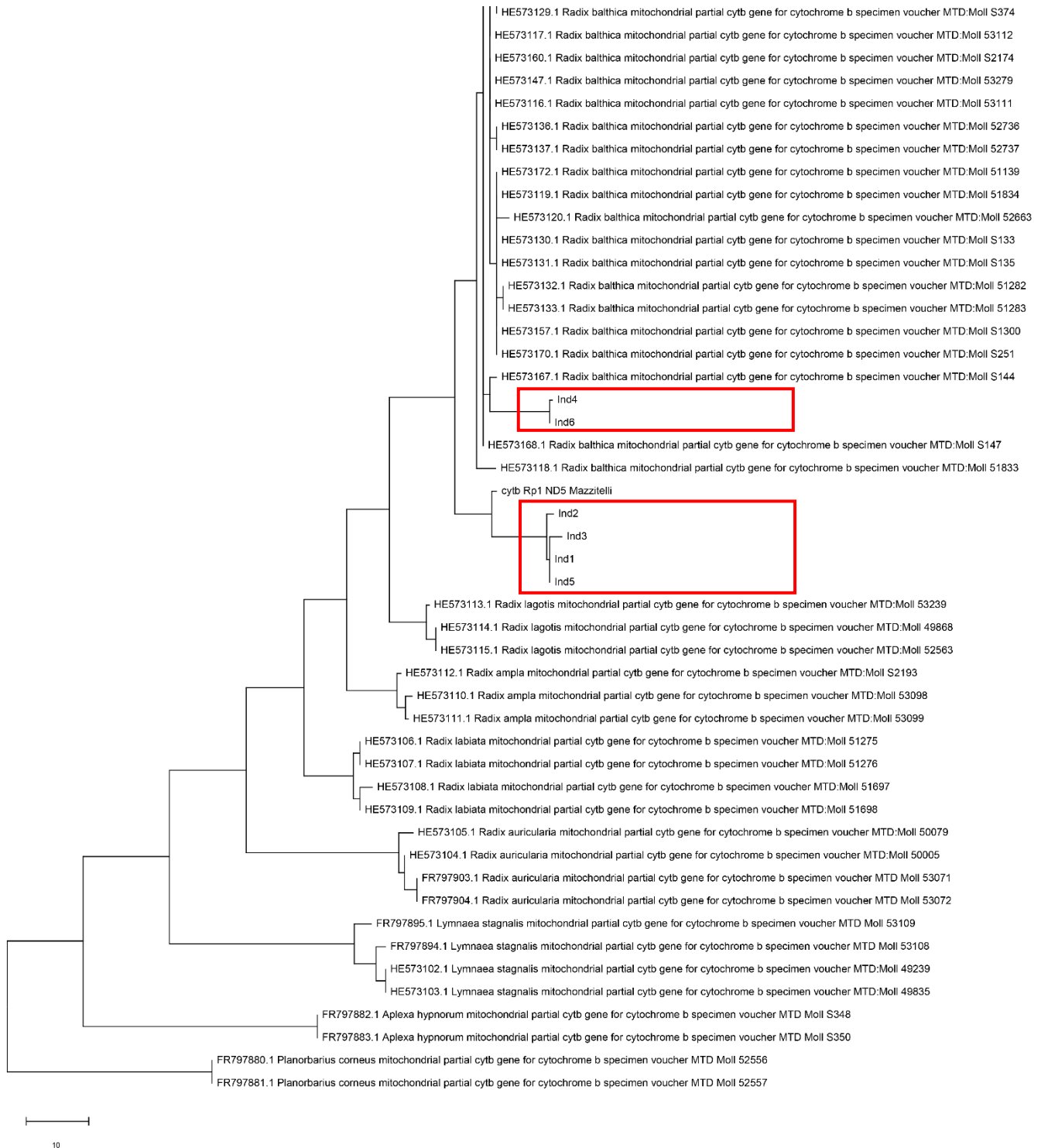


Figure 2-1 : Arbre phylogénétique du genre *Radix* basé sur la méthode du Maximum de Parsimonie de fragments séquencés du marqueur mitochondrial *cyt-b* (240 pb, longueur de l'arbre : 305, indice de consistance : 0,685, indice de rétention : 0,896). L'arbre a été réalisé en utilisant l'algorithme de Subtree-Pruning-Regrafting dans lequel l'arbre initial a été obtenu par additions aléatoires de séquences (1000 réplicats).

Chapitre I : Effets de l'anxiolytique oxazépam
sur la reproduction d'un gastéropode d'eau
douce : une étude prospective

Synthèse

La reproduction est une étape clé dans la vie d'un organisme et toute perturbation de cette fonction peut avoir des répercussions importantes sur la population et par répercussion, sur les écosystèmes. Ainsi, l'objectif de ce chapitre est de déterminer l'impact d'une exposition en laboratoire à l'oxazépam sur cette étape clé du cycle de vie de *Radix balthica*. Pour mener à bien cette étude, je me suis appuyée sur le test normalisé OCDE (2016) pour la lymnée (*Lymnaea stagnalis*) qui se base sur la production et la viabilité des œufs pondus. A ce test, j'ai ajouté deux paramètres : l'anatomie des organes reproducteurs et l'analyse du comportement reproducteur. Cette étude propose donc un panel de marqueurs permettant d'évaluer les étapes de la reproduction éventuellement impactées par l'oxazépam (formation des organes reproducteurs empêchant une éventuelle reproduction, comportement social empêchant une rencontre des gamètes et enfin, nombre de ponte et viabilité des embryons liés à un potentiel impact sur la qualité des gamètes et le développement).

Pour le bon déroulé de ce test, les individus ont dû être isolés assez tôt au stade juvénile. Cet isolement avait pour objectif premier d'éviter une reproduction incontrôlée et de stimuler le comportement reproducteur lors de la mise en contact des mollusques. A l'approche de la maturité sexuelle (caractérisée précédemment en fonction de la taille des individus), les jeunes adultes ont été exposés à l'oxazépam (0,8 et 10 µg/L) en système individuel durant 3 semaines. A l'issue de ces trois semaines d'exposition, 8 individus ont été prélevés et disséqués afin de définir l'état de l'appareil reproducteur (mesure des aires de chaque organe et pesée de l'ensemble du système reproducteur). La glande hermaphrodite a également été prélevée sur ces individus afin de déterminer la densité de spermatozoïdes. Les 25 individus restants ont été mis en contact et répartis dans 5 béchers par concentration à raison de 5 individus par bécher. Dès les premières minutes de la mise en contact, un suivi continu des interactions a été réalisé durant 6 heures afin de déterminer la longueur et la fréquence des interactions sociales après la période d'isolement. Afin de vérifier que ces interactions ne sont pas modifiées par une perturbation des déplacements, un suivi de locomotion a été réalisé sur la même plage horaire (6 heures de suivi continu). L'apparition des pontes a été relevée quotidiennement dans chacun des béchers. Le nombre d'œufs par ponte a également été

compté. La figure 2-I-1 expose le protocole mis en œuvre pour l'ensemble de cette expérimentation.

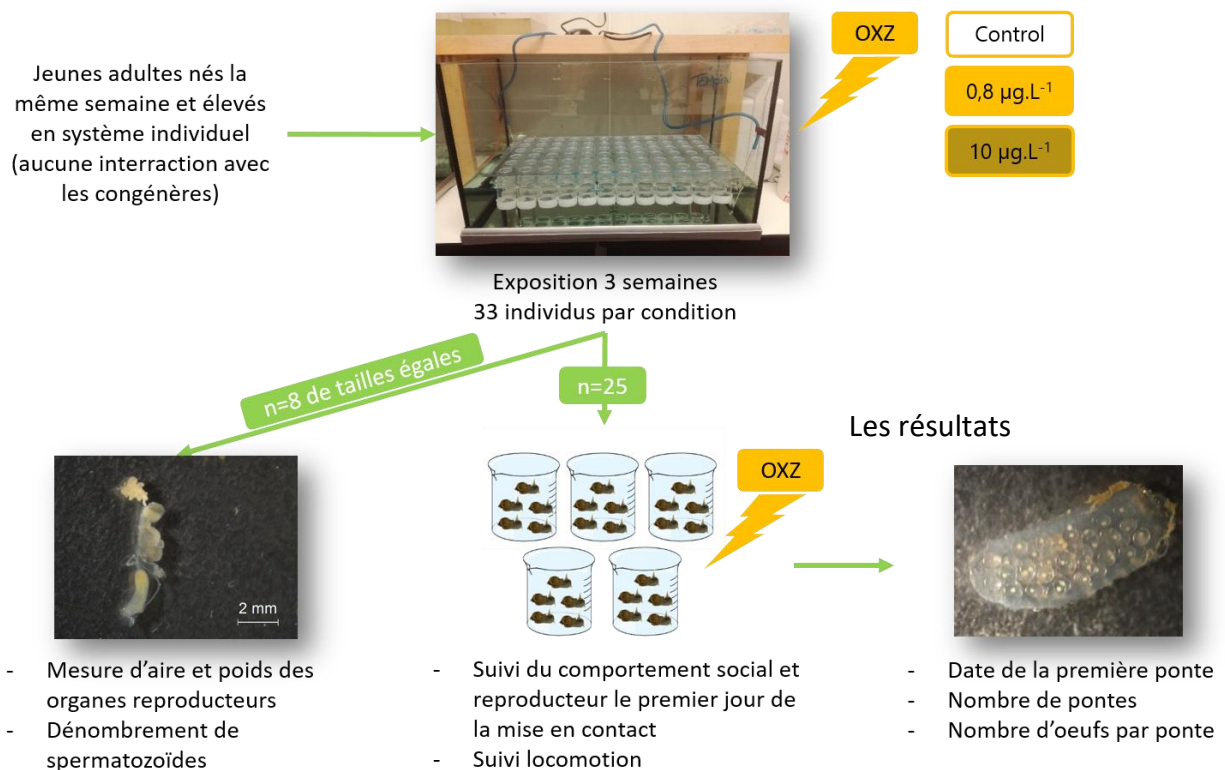


Figure 2-I-1 : Mise en œuvre du protocole d'expérimentation pour analyser les effets de l'oxazépam sur la reproduction de *Radix balthica*.

Cette étude sur la reproduction de *R. balthica* a tout d'abord permis de caractériser l'appareil reproducteur de cette espèce, ce qui complète une étude récente (Tair-Abbaci et al., 2017). L'exposition à l'oxazépam a permis de mettre en évidence un effet sur la densité de spermatozoïdes dans l'ovotestis à la plus forte concentration (10 µg/L). De plus, une diminution du nombre d'œufs par ponte au cours du temps a été observée, spécialement à la plus faible concentration (0,8 µg/L). Aucun effet n'a été observé sur la taille des organes sexuels et sur le comportement social lors de la mise en contact après isolement. Il est également à noter un effet important de l'oxazépam sur la locomotion, avec un effondrement de la distance parcourue avec le temps. Cet effet pourrait potentiellement traduire un impact de l'oxazépam sur l'activité exploratoire des gastéropodes.

L'ensemble de ces informations nous a permis de déterminer pour la première fois les effets d'un anxiolytique sur la reproduction d'un gastéropode d'eau douce, et de proposer de

nouveaux biomarqueurs potentiels (nombre de spermatozoïdes notamment) pouvant être utilisés dans des études ultérieures.

Article 1 : Effects of the anxiolytic benzodiazepine oxazepam on freshwater gastropod reproduction: a prospective study

Morgane Lebreton^{1*}, Jean-Michel Malgouyres¹, Jean-Luc Carayon¹, Elsa Bonnafé¹, Florence Gélet¹

¹ *Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Albi, France.*

E-mail addresses: lebreton.morgane.35@gmail.com (M. Lebreton), jean-michel.malgouyres@univ-jfc.fr (J-M. Malgouyres), jean-luc.carayon@univ-jfc.fr (J-L. Carayon), florence.geret@univ-jfc.fr (F. Gélet), elsa.bonnafe@univ-jfc.fr (E. Bonnafé).

*Corresponding author. Address: Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Place de Verdun, 81 012 Albi, France. Tel.: +33 563481700; E-mail address: lebreton.morgane.35@gmail.com (M. Lebreton).

Article accepté - Ecotoxicology

Abstract

Psychoactive drugs have emerged as contaminants over the last few decades. These drugs are frequently prescribed and poorly eliminated by wastewater treatment plants, and many are present at non-negligible concentrations in surface waters. Several studies have investigated the non-target organism toxicity of one such drug, oxazepam, a benzodiazepine anxiolytic frequently detected in rivers. However, very little is known about the impact of this drug on reproduction. We investigated the effects of environmentally relevant concentrations of oxazepam on *Radix balthica*, a freshwater gastropod widespread in Europe. We identified the reproductive organs of *Radix balthica*. We then exposed this gastropod to oxazepam for two months and assessed several reproductive parameters, from reproductive organ status to behavioral parameters. We found that adults exposed to 10 µg/L oxazepam display an increase in the density of spermatozoa, and that adults exposed to 0.8 µg/L oxazepam displayed a decrease in the number of eggs per egg mass over time. By contrast, oxazepam had no effect on shell length, the size of male reproductive organs or social interactions. Finally, a locomotor activity analysis showed the distance covered over time decreased in all conditions of exposure to oxazepam, potentially reflecting a disturbance of exploratory activity. These results shed light on the effects of oxazepam on the reproduction of a non-target freshwater mollusk.

I - Introduction

Psychotropic drugs, such as antidepressants, antiepileptics and anxiolytics, are widely prescribed and consumed. These molecules are poorly eliminated by wastewater treatment plants (Cunha et al., 2017), and their persistence in the environment (Calisto and Esteves, 2009; Calisto et al., 2011) has led to their being considered emerging contaminants over the last few years (Silva et al., 2015). The biological activity of these drugs targets the nervous system, and they may, therefore, alter numerous physiological functions, including reproduction, an essential function of population fitness in freshwater organisms.

Many studies have focused on the effects of antidepressants, including SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors) in particular, on the reproduction of non-target freshwater organisms. Most of these studies concerned fish reproduction, with various antidepressants reported to have effects on social (Ansai et al., 2016; Giacomini et al., 2016; Thoré et al., 2020; Weinberger and Klaper, 2014) and mating behavior (Fursdon et al., 2019; Martin et al., 2019; Thoré et al., 2020; Weinberger and Klaper, 2014; Wiles et al., 2020), adult sexual physiology (Dorelle et al., 2017; Henry and Black, 2008; Schultz et al., 2011), vitellogenin production (Schultz et al., 2011) and egg production (Parrott and Metcalfe, 2017). A smaller number of studies have reported effects on aquatic invertebrates (see Fong and Ford (2014) for review). In particular, fluoxetine exposure has been shown to disturb gamete production in freshwater mollusks (Gust et al., 2009; Lazzara et al., 2012; Nentwig, 2007; Péry et al., 2008; Sánchez-Argüello et al., 2009).

Anxiolytics are known to affect mammalian reproduction (Drobnis and Nangia, 2017; Guerriero and Fox, 1976; McElhatton, 1994), but surprisingly little is known about their toxicity to aquatic organisms. A few studies have shown that diazepam decreases social interactions in zebrafish (*Danio rerio*) (Giacomini et al., 2016), but no significant impact of this drug on reproductive behavior in fathead minnow (*Pimephales promelas*), or of oxazepam in Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Hellström et al., 2020; Lorenzi et al., 2014) was reported. In addition, exposure to carbamazepine and diazepam has been shown to increase the total number of offspring in *Daphnia magna* (Rivetti et al., 2016). Benzodiazepines, therefore, seem to affect the reproduction of aquatic organisms.

However, there have been no studies to date on the impact of benzodiazepine on mollusk reproduction, despite freshwater mollusks, and gastropods in particular, being regarded as reference organisms for ecotoxicological studies (Amorim 2019, Tallarico 2019) due to their widespread presence in continental surface waters, their benthic habitat and primary consumer status. Moreover, freshwater gastropod reproduction has been extensively studied for almost a century (Crabb, 1927), with detailed descriptions extending from the structure and characteristics of the reproductive system (Duncan, 1958; Ohbayashi-Hodoki et al., 2004; Tair-Abbaci et al., 2017), to mating and egg-laying behaviors (De Boer et al., 1996; Ter Maat, 1992) and the associated nervous and endocrine regulation (Koene, 2010; Morishita et al., 2010). Moreover, gastropod egg masses are transparent, making it easy to observe and count eggs, facilitating monitoring. The freshwater snails of the family Lymnaeidae are protandrous hermaphrodite gastropods. Fraser (1946) described the organogenesis of the reproductive system of *Lymnaea stagnalis* as a function of snail age and size, and Holm (1946) reported that the male activity occurs before female activity in this species. Fewer studies have focused on the reproduction of *R. balthica*. This species is considered as a self-fertile hermaphroditic organism, which can reproduce by both selfing and outcrossing. Indeed, although it was initially considered to reproduce predominantly by outcrossing (Jarne and Städler, 1995), it has been shown that population variation can influence the mating system (Coutellec-Vreto et al., 1997). Moreover, despite the morphological differences between this species and *L. stagnalis*, the reproductive organs of *R. balthica*, including the gonads in particular, have been shown to be histologically similar to those of *L. stagnalis* (Tair-Abbaci et al., 2017). Schniebs et al. (2011) characterized the individual variability of some of the reproductive organs (bursa copulatrix and preputium) of *R. balthica*. *R. balthica* has been used as a model species in our laboratory for several years, initially for assessments of the effects of pharmaceuticals on embryonic development (Mazzitelli, 2017; Mazzitelli et al., 2018, 2017), but we have since expanded our studies to investigations of its reproductive function.

The aim of this study was to evaluate reproduction in the freshwater gastropod *R. balthica* following exposure to environmentally relevant concentrations of oxazepam, a drug from the benzodiazepine family frequently detected in surface freshwater (up to 0.8 µg/L in rivers and up to 10 µg/L in effluent from wastewater treatment plants (WWTPs) (Mazzitelli et al., 2018)). We first identified reproductive organs of *R. balthica*, and we then assessed the toxic effects

of oxazepam on various parameters associated with reproduction, from behavioral characteristics to the status of the reproductive system. We also assessed locomotion, which plays an important role in the search for sexual partners and in egg-laying behavior (Koene, 2010).

II - Materials and methods

A) Test organisms

Radix balthica (Linnaeus, 1758) adults were sampled during the reproductive season from the Garonne river (France) and used as genitors for the experimental generation. They were acclimated for two weeks in a growth chamber with a constant temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and a photoperiod regime of 16 h light: 8 h dark. Egg masses laid over a period of two weeks were detached and placed in a glass jar with 300 mL ISO 6341:2012 water (64 mg/L NaHCO_3 ; 294 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 63 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6 mg/L KCl) (OECD, 2016) until hatching. Thirty newly hatched juveniles were placed in each of six 1 L glass jars filled with 300 mL ISO 6341: 2012 water for six weeks. The six-week-old juveniles (3 mm) were then raised for six more weeks in isolation system to prevent contact with other juveniles. The isolation system consisted of a Perspex slab mounted on feet, into which holes were drilled. Tubes ending in a grid at the bottom were inserted into each hole (Figure 2-I-2). Each juvenile was allowed a volume of 57 cm^3 and each system was covered with wire mesh to prevent the animals from escaping. The isolation system was then partially submerged in a 50 L aquarium filled with 16 L ISO 6431 water. The system was semi-static, with a water replaced weekly and the juveniles were fed *ad libitum* with boiled organic lettuce.

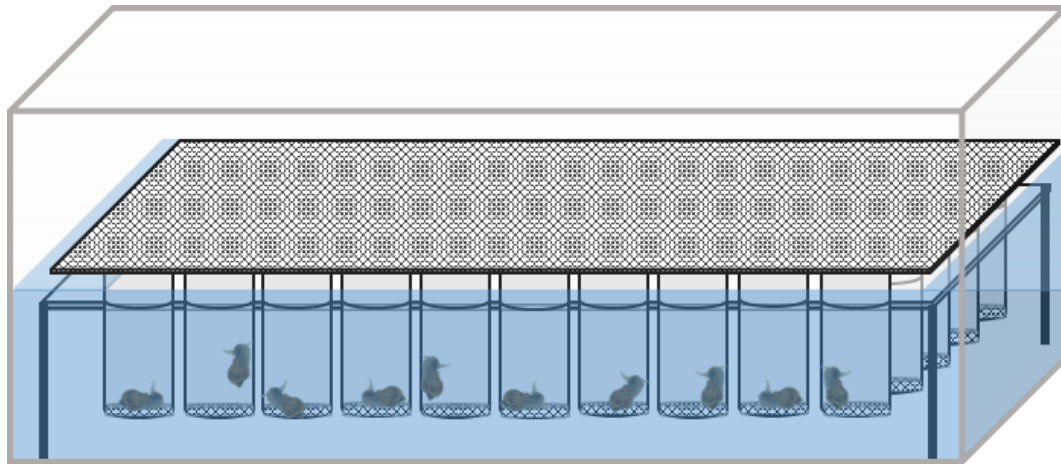


Figure 2-I-2 : Drawing of the isolation system which consisted of a Perspex slab mounted on feet, into which holes were drilled. Tubes ending in a grid at the bottom were inserted into each hole. Each juvenile was allowed a volume of 57 cm³ and each system was covered with wire mesh to prevent the animals from escaping. The isolation system was then partially submerged in a 50 L aquarium filled with 16 L ISO 6431 water.

B) Experimental design

We assessed three sets of conditions: control condition (ISO water), environmentally relevant concentration of oxazepam in rivers (0.8 µg/L), and environmentally relevant concentration of oxazepam in effluents (10 µg/L) (Mazzitelli et al., 2018) and the total exposure time was eight weeks (three weeks of individual exposure and five weeks of additional exposure in jars). We first randomly assigned 33 twelve-week-old juveniles of similar size to each of the three sets of conditions (Control: 6.88 ± 0.06 mm, 0.8 µg/L: 6.90 ± 0.07 mm, 10 µg/L: 6.88 ± 0.06 mm). Each individual was placed for three weeks in the isolation system partially submerged in 50 L aquariums containing 16 L of exposure medium. This individual isolation prevented precocious copulation, as described by Coutellec and Lagadic (2006). After the individual exposure, the fifteen-week-old juveniles were called young adults and eight of them per set of conditions were sampled to evaluate the status of the reproductive system. The shell size of the sampled young adults was 7.1 mm (± 0.1 mm), which corresponds to the size at which all reproductive organs have reached maturity, as determined previously. The other animals were transferred into five 1 L glass jars per set of conditions containing 600 mL of exposure medium and were exposed during five additional weeks. As previously determined in laboratory, five snails were placed per glass jar, corresponding to the best density for an optimal reproductive activity. Social interactions were monitored beginning immediately after the animals were placed in contact and the locomotor activity was assessed 24 h after transfer into the glass jars. Egg masses laid were removed daily from jars and exposed in 10 mL Petri

dishes until hatching. The system was semi-static, with the water of aquariums, jars and Petri dishes replaced weekly and the snails were fed *ad libitum* with boiled organic lettuce.

C) Water contamination

Oxazepam (CAS No 604-75-1) was purchased from Alsachim (purity > 98%). A 1 mg.L⁻¹ stock solution was prepared in ISO water, sonicated for 1 h and passed through a PTFE filter with 0.47 µm pores. Oxazepam concentration was determined by HPLC, and the solution was stored at 4°C.

Contaminated medium from glass jars was sampled at the time of water replacement and after seven days of exposure, during two weeks, for both doses, and was stored at -20°C until analysis. For each sample, we subjected 200 mL acidified contaminated water (pH 2) to extraction on a SPE Strata C18-E column (1 g/6 mL; Phenomenex). Columns were then rinsed with 4 mL deionized water (pH 2) and dried for 4 h in a laboratory oven at 45°C. Compounds were eluted with 4 mL hyper-grade methanol for LC/MS (Merk). The resulting extract was dried under a stream of nitrogen and reconstituted with 200 µL methanol. Analysis was performed with a Spectra system 130 (Thermo Scientific) equipped with a Spectra system UV8000 detector (Thermo Scientific) and a Venusil 131 XBP 5 µm C18 (4.6 x 250 mm) capillary column (Agela Technologies). The solvents were A) water + 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) and B) acetonitrile (ACN) + 0.05% TFA and the elution gradient was (t in min): t0, B = 30%; t11, B = 100%; t13, B = 100%, t13.5, B = 30%, t18, B = 30%. The oven temperature was set to 40°C, the injection volume was 20 µL, and the flow rate was 1 mL/min. The working UV wavelength was 230 nm. Data analyses were performed with ChromQuest 5.0 software. Oxazepam concentrations were determined relative to a calibration range.

D) Growth monitoring

Shell length, from the apex to end of the aperture, was measured with a caliper (± 0.03 mm) throughout the experiment. Measurements were made every two weeks during the breeding phase (pre-exposure), and during the exposure phase: at the beginning of exposure, at the end of individual caging period (after 3 weeks of exposure) and at the end of the experiment (after 8 weeks of exposure in total). At the end of the experiment, the snails were briefly dried on absorbent paper and weighted.

E) Reproductive organ status and spermatozoon counts

Preliminary dissections were performed to characterize the reproductive system of *R. balthica* and to determine the link between shell length and the appearance of sexual organs in our experimental conditions. Eighteen non-exposed laboratory-reared snails with different shell lengths were sampled. Three snails of each size, from 6.2 to 7.4 mm, were killed by freezing (20 minutes at -80°C). We selected snails with shells in this size range on the basis of previous observations showing snails to be sexually mature when they reach these sizes. The shells were removed and the individual snails were dissected under a stereomicroscope. The reproductive apparatus was isolated and the different reproductive organs were identified by analogy with the reproductive system of Basommatophoran described by Jackiewicz (1998) and Jarne et al. (2010).

At the end of the individual caging period, eight mature adults (as previously determined for each set of conditions (control: 7.08 ± 0.05 mm, $0.8 \mu\text{g/L}$: 7.06 ± 0.04 mm, $10 \mu\text{g/L}$: 7.11 ± 0.02 mm) were sampled and killed by freezing for 20 minutes at -80°C . The shells were then removed and the snails were dissected in 1X PSB under a stereomicroscope (ICC50 W, Leica), with isolation of the entire reproductive system. Each reproductive apparatus was photographed with a scale, and the area of the prostate, penial complex and ovotestis was calculated in triplicate with Image J software (National Institutes of Health, v. 1.8.0). The other organs, including the female organs in particular (oviduct, albumen gland, nidamental gland) were too dispersed (present on both the dorsal and ventral sides of the prostate) and could not be quantified with the technique used. The organs were too light to be weighed individually. Using modified versions of the methods described by Locher and Baur (1997) and Rudolph (1983), we cut up the ovotestis and spermooviduct, crushed them in a pestle and mortar with $100 \mu\text{L}$ 1X PBS, dispersed the fragments by repeated passages through a $100 \mu\text{L}$ pipette, and vortex the suspension for 10 seconds to ensure homogeneity and to prevent the formation of aggregates of spermatozoa. The resulting sperm suspensions were left undiluted or were diluted 1/2 in PBS, depending on sperm density, before the injection of $15 \mu\text{L}$ into a hemocytometer. Non-motile mature spermatozoa (identified as described by Joosse (1975)) were counted in 20 rectangles ($0.2 \mu\text{L}$), in duplicate, for each of the eight ovotestes examined per set of conditions. We took the variability of ovotestes size into account by presenting results as the number of spermatozoa per mm^2 of ovotestis, using areas of ovotestes

previously determined. The rest of the reproductive system was briefly dried on absorbent paper and weighted.

F) Behavioural analysis during initial encounters with other snails

Immediately after the transfer of snails into the glass jars (i.e., after three weeks of exposure in isolation system), social interactions were recorded every five minutes, for six hours, for each replicate. This social interaction assay was based on the OECD reproduction test for *L. stagnalis* (OECD 2016), which is usually used for assessing the impact of chemicals on fertility, and for which it is recommended to place five snails in each glass jar. This density of snails results in optimal reproduction. The recognition of individual snails was facilitated by numbering the shells with an indelible marker. Interactions were then classed into four categories, according to their duration: very short interactions (<5 min), short interactions (between 5 and 10 min), intermediate interactions (between 15 and 40 min) and long interactions (more than 45 min). The nature of contact varied from tentacle-only contact for very short interactions, to mounting on the shell of the congener for all other categories of interaction. Because of the difficulty to observe the preputium eversion and intromission in *R. balthica* (as described by Koene (2010) in *L. stagnalis*), the copulatory behavior could not be clearly identified. However, as described by Koene (2010), the mating behavior lasts 45-50 minutes in *L. stagnalis*. We can therefore hypothesize that long interactions could correspond to a reproduction.

The results are presented for each hour of monitoring, as the proportion of social interactions in each class relative to the total number of interactions in all glass jars. We focused on the first hour to assess initial contact, by determining the mean total contact time during this hour.

G) Monitoring of fecundity and fertility

We removed the egg masses from the glass jars each day and counted them. The number of eggs per egg mass was determined with a stereomicroscope. We assessed the impact of oxazepam exposure on fecundity and fertility. Fecundity is defined here as the capability of an individual to produce offspring whereas fertility is the number of offspring produced. For fecundity, data were pooled by week, with the first week corresponding to the first encounters between adults. Results were presented as the mean number of eggs laid per adult and per

week and as the mean number of eggs per egg mass. For fertility, we randomly sampled seven to eight egg masses for each set of conditions within 24 h of laying, and placing them in 10 mL Petri dishes for 18 days. Results were presented as the hatching rate on day 18.

H) Locomotion assessment

We analyzed locomotion activity 24 hours after behavioral monitoring, at the same time of day. We randomly sampled eight snails per set of conditions and placed them on their foot in glass Petri dishes (140 mm in diameter) filled with 100 mL of exposure medium. Their movements were recorded with a video camera and analyzed with the Ethovision image analysis system (Noldus, Wageningen, Netherlands). The mean distance moved (in cm) per hour was calculated.

I) Statistical analysis

Statistical analysis was performed and graphs were plotted with R v. 4.0.0 software (RC Team, 2020). A linear model was used for locomotion, with treatment and time as fixed factors. We checked that the residuals were normally distributed, and we then performed an analysis of variance (ANOVA) on the linear model, and a post-hoc test (Tukey's test for multiple comparisons, *agricolae* package of R software) was performed when necessary. For shell length, reproductive organ areas, spermatozoon counts, behavioral analysis, fecundity and fertility analyses, we performed a one-way ANOVA with Tukey post-hoc tests for multiple comparisons, provided that the normality and homoscedasticity criteria were satisfied. Otherwise, Kruskal-Wallis rank-sum tests were used, followed by Kruskal-Wallis multiple comparison tests (*pgirmess* package of R software). Mann-Whitney *U* tests were performed for the comparison of water contamination data. Differences were considered significant if $P < 0.05$. The results are presented as the mean \pm SEM, except for water contamination, for which the results are presented as the mean \pm SD.

III - Results

A) Chemical analysis

The concentration of oxazepam in glass jars remained stable between water replacement events (i.e., over a period of seven days). After water replacement, oxazepam concentration

were $0.81 \pm 0.05 \mu\text{g/L}$ and $8.87 \pm 0.54 \mu\text{g/L}$ for the lowest and the highest dose respectively. After seven days, the measured concentrations were $0.79 \pm 0.03 \mu\text{g/L}$ and $9.26 \pm 0.78 \mu\text{g/L}$ for the lowest and the highest dose respectively. No significant difference was observed over time (lowest dose: $P = 0.80$, highest dose: $P = 0.37$).

B) Growth monitoring

Shell length was similar in controls and exposed adults throughout the experiment (Figure 2-1-3). No significant difference between conditions was observed (week 0: $P = 0.92$, week 3: $P = 0.83$, week 8: $P = 0.86$). From the beginning to the end of exposure (8 weeks), adult shells increased in length by about 1 mm. However, growth rates were lower during the individual caging period than in glass jars, for all conditions. The overall shape of the growth curve was consistent with previous analyses on juveniles from the same species (Wullschleger and Jokela, 2002).

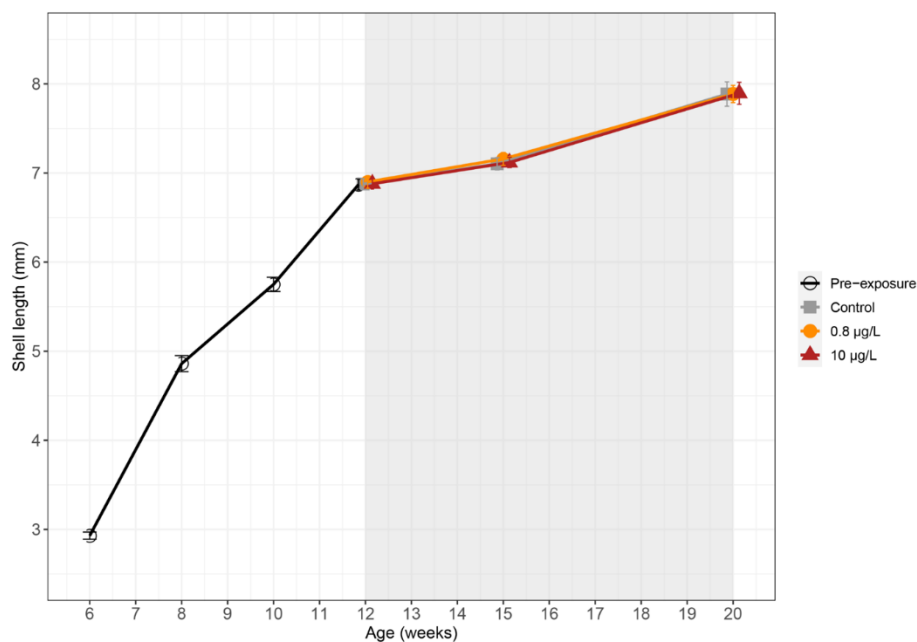


Figure 2-1-3 : Change in adult shell length (mm) after (black open circles) and during the experiment (gray zone). Individuals were measured from week 6 post hatching, at two-week intervals until exposure (week 12 post hatching). During the exposure period, adults were measured at the start of exposure (week 12 post hatching, $n = 33$), on transfer to glass jars (week 15 post hatching, $n = 33$) and at the end of experiment (week 20, $n = 24$). Error bars indicate the mean \pm SEM.

C) Organization and development of the reproductive system

We first characterized the different organs of the reproductive system of *R. balthica*. By analogy with the general scheme of the reproductive tract in Basommatophora provided by Jarne et al. (2010) and with the reproductive apparatus of a close species, *Radix peregra*, described by Jackiewicz (1998), we identified the position of each organ, as shown in Figure 2-I-8a (Supplementary Material). The ovotestis (or hermaphrodite gland), a follicular organ composed of numerous lobes, was observed in all individuals, but the seminal vesicle, usually detectable along the spermooviduct in *L. stagnalis*, was not visible (see Figure 2-I-8a, Supplementary Material). The female organs consisted of the oviduct (oothecal gland), nidamental gland (uterus) and albumen gland. The male part of genital tract consisted of the prostate, vas deferens and penial complex. The spermatozoa were immobile and found only in the ovotestis, as shown by Koene et al. (2009). The only difference with respect to *L. stagnalis* concerned the hermaphrodite gland (ovotestis, site of production of spermatozoa and oocytes) and the seminal vesicle (storage of spermatozoa). In *L. stagnalis*, the ovotestis could be distinguished from the seminal vesicle, whereas, in *R. balthica*, only ovotestis has been observed, no seminal vesicle-like organ appeared to be present.

Dissections of individuals of increasing size demonstrated a progression of organ maturity, particularly for female organs (Figure 2-I-8b, Supplementary Material). The ovotestis and male organs (penial complex and prostate) were present and had their mature shape and color in all individuals. By contrast, the female organs took on their mature form and color only in snails of at least 7 mm in length. These observations were used to determine the size at which exposed animals were dissected (7.1 ± 0.1 mm) to assess the impact of oxazepam exposure on the reproductive apparatus.

D) Reproductive organ status and spermatozoon counts

After exposure, we dissected eight animals from each set of conditions, and isolated their reproductive systems. All reproductive organs were present and developed at all concentrations, suggesting that oxazepam exposure does not prevent the development or maturation of the reproductive system. The weights of accessory reproductive organs (Figure 2-I-4a), and ovotestis area (Figure 2-I-4b) did not differ significantly between conditions. We

also observed no significant effect of oxazepam exposure on the area occupied by the male organs (prostate and penial complex) (Figure 2-I-9, Supplementary Material).

The ovotestis contained significantly larger numbers of spermatozoa in adults exposed to 10 µg/L oxazepam (125.75 ± 14.90 spermatozoa/mm² of ovotestis) than in non-exposed adults (75.80 ± 6.46 spermatozoa/mm² of ovotestis) ($P < 0.05$) (Figure 2-I-4c). No spermatozoa without flagellar structures were observed.

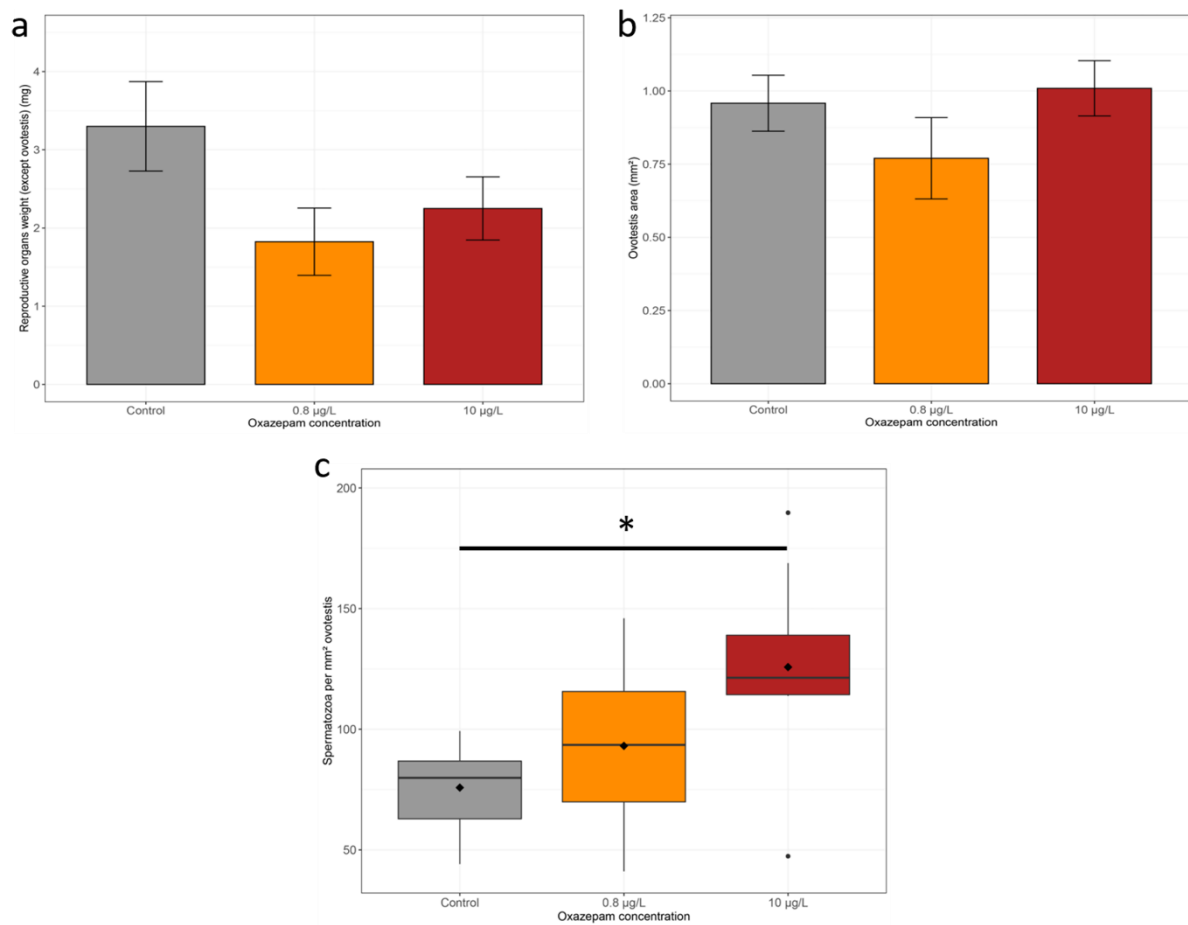


Figure 2-I-4 : Effects of oxazepam on reproductive organ status and spermatozoon density for each set of conditions ($n=8$ individuals per set of conditions). a) Weight of reproductive organs (in mg), b) area of ovotestis (in mm²). Bars and error bars indicate the mean \pm SEM. c) Number of spermatozoa per unit area of the ovotestis. The lower, central and upper horizontal bars of the boxes indicate the 1st, 2nd (median) and 3rd quartiles, respectively. Black diamonds represent the mean number of spermatozoa.

E) Behavioral analysis during initial encounters with other snails

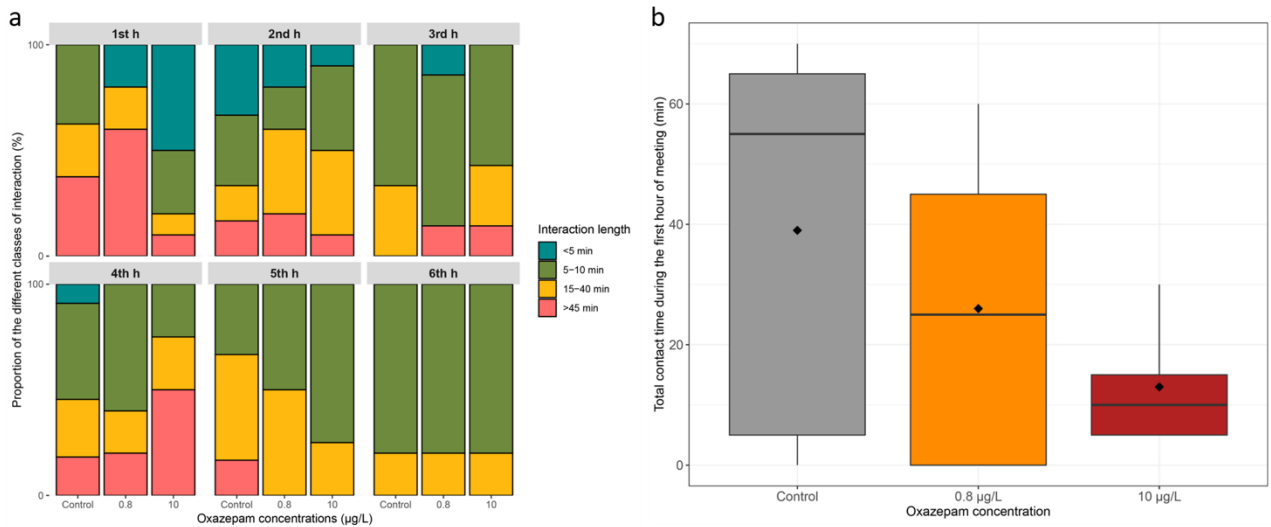


Figure 2-I-5 : Analysis of adult social behavior after a long period of isolation. a) Proportion of each class of social interaction (very short: < 5 min, short: 5-10 min, medium: 15-40 min and long: > 45 min) relative to the total of new interactions occurring in all glass jars per condition and for each hour of the monitoring. b) Focus on the first hour of meeting. Box plot represents the total time of interactions (all mixed) occurred in each glass jars (n = 5) for each condition. The lower, central and upper horizontal bars of the boxes indicate the 1st, 2nd (median) and 3rd quartile respectively. Black diamonds represent the mean.

The monitoring of social interactions for six hours after an isolation period revealed no significant differences between conditions (Figure 2-I-5a). The proportions of the various categories did not differ between conditions, throughout the experiment. A different pattern of behavior was observed only in the first hour, during which the proportion of very short interactions appeared to be greater in adults exposed to 10 µg/L oxazepam than in non-exposed animals, but this difference remained non-significant. Total interaction times (all categories considered together) for each level of oxazepam exposure during the first hour are shown in Figure 2-I-5b. These findings confirmed the results shown in Figure 2-I-5a, but considerable inter-glass jar variability was observed, particularly for the control and 0.8 µg/L oxazepam conditions.

F) Monitoring of fecundity and fertility

We monitored egg-laying daily, from the day on which the animals were placed in glass jars together. The first egg masses were observed after nine days in control conditions and after 10 days in exposed conditions. The mean number of eggs laid per individual did not differ significantly between conditions or over time (Figure 2-I-6a). Nevertheless, exposure to 0.8 µg/L oxazepam decreased the number of eggs per egg mass, resulting in significant differences

with respect to control conditions in week 4 ($P < 0.05$) and week 5 ($P < 0.001$) (Figure 2-I-6b). At this lower dose, the mean number of egg masses per individual increased significantly over time ($P < 0.01$) (Figure 2-I-6c). Fertility monitoring revealed a total embryo hatching rate (18 days post fertilization) of $70.72 \pm 11.76\%$ for control condition, $53.66 \pm 14.33\%$ for $0.8 \mu\text{g/L}$ oxazepam and $80.57 \pm 5.32\%$ for $10 \mu\text{g/L}$ oxazepam (Figure 2-I-6d), with no significant differences between conditions (Kruskal-Wallis, $P = 0.299$). However, the comparison of these values of hatching rate with theoretical hatchability (considered 100%) highlighted a significant difference for control condition (Chi-2 test, $P < 0.001$) and for $0.8 \mu\text{g/L}$ oxazepam (Chi-2 test, $P < 0.001$).

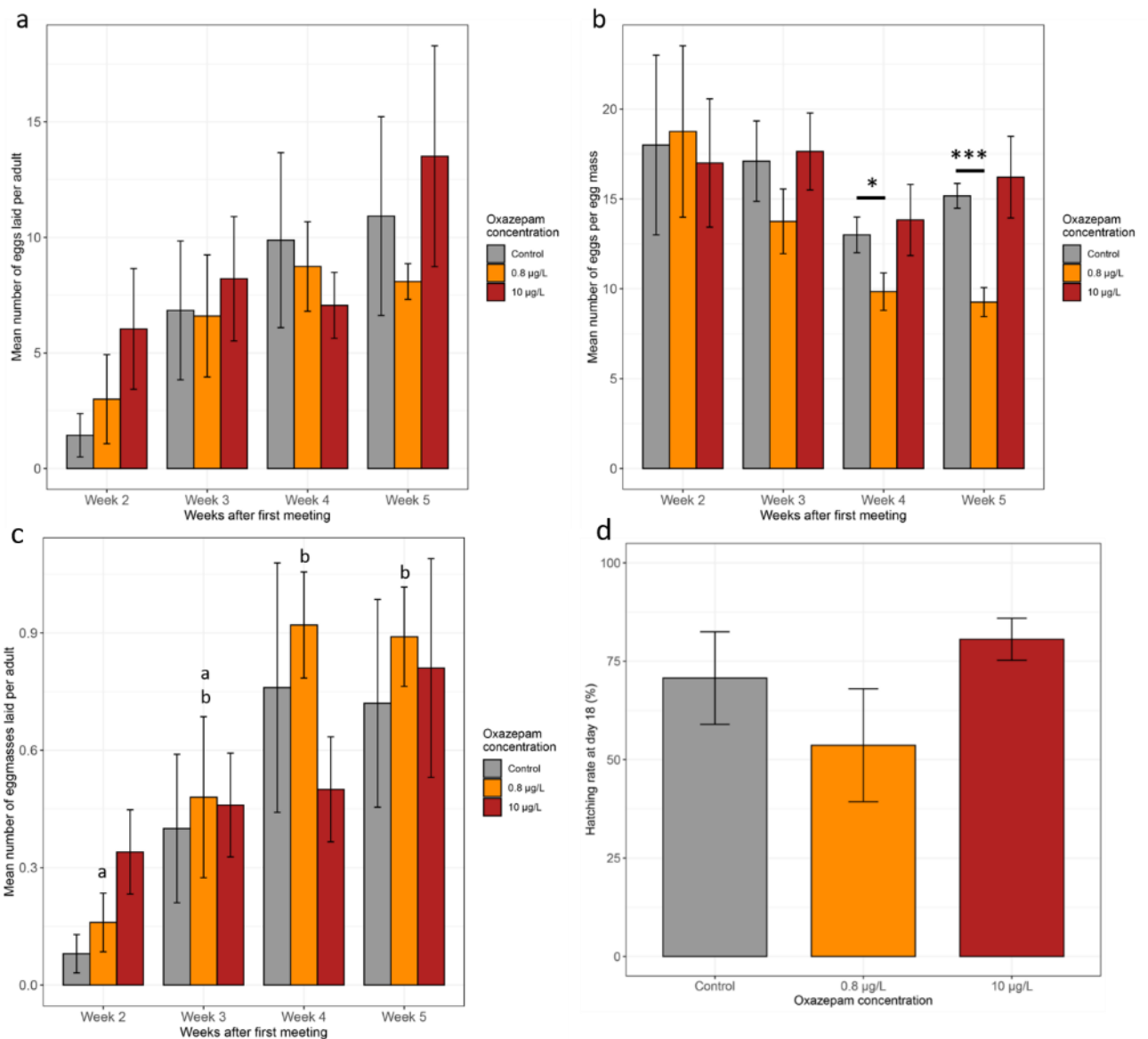


Figure 2-I-6 : Effects of oxazepam exposure on fecundity and fertility. a) Mean number of eggs laid per adult for each week after transfer to glass jars and for each set of conditions. b) Mean number of eggs per egg mass for

each week after transfer to glass jars and for each set of conditions. c) Mean number of egg masses laid per adult for each week after transfer to glass jars and for each set of conditions. d) Hatching rate (18 days post-fertilization). Bars and error bars represent the mean \pm SEM

G) Locomotion assessment

We monitored locomotion the day after the animals were first placed in together in glass jars, at the same time of day. The linear model revealed a significant effect of treatment on the distance covered by the adult snail ($F = 9.79$, $P = 0.0002$). Post-hoc comparison revealed a significant difference between control conditions and the two sets of exposed conditions, where exposed snails were less active than non-exposed ones ($P < 0.001$) (Figure 2-I-7). A time effect was observed ($F = 3.52$, $P = 0.01$), with a significant difference in locomotion between the first hour and the fourth and fifth hours ($P < 0.05$), highlighting a decrease in locomotor activity over. The interaction between time and treatment was not significant ($F = 0.41$, $P = 0.91$).

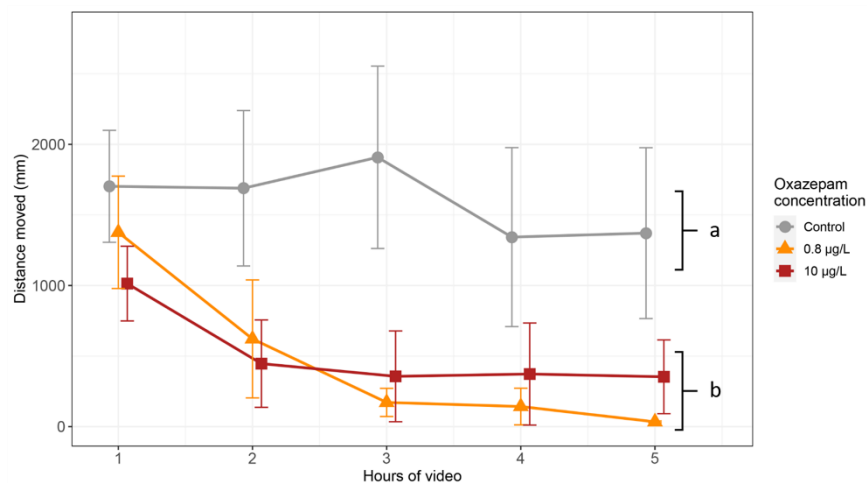


Figure 2-I-7 : Mean distance moved per snail during each hour of monitoring and for each oxazepam concentration ($n = 5$ to 7 snails). Letters represent statistically different groups. Error bars indicate the SEM.

IV - Discussion

Information about the toxic effects of oxazepam are scarce, particularly for freshwater non-vertebrates. We therefore carried out a long-term exposure study, in which we assessed various physiological and behavioral parameters relating to reproductive function. Reproduction is a key step in the life cycle and is vital for the survival of the population. We found that exposure to oxazepam at the highest dose used (10 µg/L) induced an increase in the number of spermatozoa in the ovotestis with no effect on the number of eggs or egg

masses laid. By contrast, adult fecundity was disturbed at the environmentally relevant concentration of 0.8 µg/L, at which the number of eggs per egg mass decreased with no detectable effect on the number of spermatozoa in the ovotestis. In our experimental conditions, oxazepam had no effect on shell growth, the size of reproductive organs, social interactions after isolation, or fertility. Finally, an analysis of locomotion showed that levels of activity were lower in adults exposed to either of the oxazepam doses tested than in adults kept in control conditions.

A reproductive organ identification as a function of shell size revealed that all organs were detectable in animals with a shell length of at least 7 mm. The first eggs were laid 10 days after the end of isolation, indicating that the snails were sexually mature from this size. The few studies performed to date on reproductive size or age in *R. balthica* (*Lymnaea peregra*) have highlighted the considerable variability of these two parameters (Coutellec-Vreto et al., 1998; Escobar et al., 2011; Hallgren et al., 2012). Photoperiod, food availability and population origin have been shown to influence the reproduction of the freshwater gastropod *L. stagnalis* (Bohlken and Joosse, 1981; Lam and Calow, 1989; Ter Maat et al., 2007). Thus, sexual maturity may be reached at different times in different experimental conditions and snail populations, highlighting the importance of characterizing the reproductive status of each population before performing experiments.

The sizes of the male reproductive organs (prostate and penial complex) and of the hermaphrodite gland were not significantly affected by oxazepam exposure. The effects of oxazepam on *R. balthica* have never before been investigated, but some studies have shown that exposure to endocrine disruptors affects the length of male organs in the gastropod *Marisa cornuarietis* (Oehlmann et al., 2000; Schulte-Oehlmann et al., 2000; Tillmann et al., 2001). However, it has to be noted that *M. cornuarietis* is a prosobranch, with a reproductive system different from those of the Lymnaeidae. Several studies have also revealed an impact of psychoactive pharmaceuticals on the development of sexual morphology and the presence of male secondary sex characteristics in fish (Henry and Black, 2008; Schultz et al., 2011).

The highest dose of oxazepam used here induced an increase in the density of the spermatozoa in the ovotestis. No such effect of benzodiazepine on spermatozoon density has ever been reported in previous studies. One possible reasons for the increase in spermatozoa

production is that oxazepam may disturb the secretion of gonadotropic hormones or testosterone. Dong et al. (2002) suggested a possible role for the GABAergic system in the regulation of gonadotropin-releasing systems in rodents. Moreover, it has been shown that GABA has a stimulatory effect on luteinizing hormone (known to stimulate testosterone production) in fish, through inhibition of the dopaminergic system (Trudeau et al., 2000). However, the study of Omran (2012) would have demonstrated the existence of a role for gonadotropins and testosterone in gonadal development in the mollusk *Biomphalaria alexandrina*, even if the occurrence of endogenous steroids in mollusks is still a matter of debate (Scott, 2018, 2013). Nothing is known about the effects of benzodiazepines on sperm density in other freshwater organisms. However, benzodiazepine-contaminated rodents have been shown to have a smaller number of spermatozoon heads in the testis and a higher frequency of head abnormalities (Kar and Das, 1983; Kishi et al., 1995). The differences between our results and those of this previous study may be due to the differences in control over spermatogenesis between mollusks and mammals. Other psychotropic agents, such as fluoxetine, are known to disturb spermatozoa production in fish, through effects on serotonergic regulation (Bertram et al., 2018; Lazzara et al., 2012).

Social interactions after a month of isolation did not seem to be affected by oxazepam exposure. According to the study of De Boer et al. (1996), we hypothesized that only the fourth category, 'long interactions', reflected copulation behavior, but the eversion of the preputium and intromission were very difficult to see due to the small size of *R. balthica*. Moreover, it has been shown that isolation may facilitate the monitoring of social interactions (more copulations and a shorter total copulation sequence) (Van Duivenboden and Maat, 1985) but it may also disturb other parameters such as the willingness of snails to mate as a male role (Boer et al., 1997) and the quantity of sperm transferred by the sperm donor (Loose and Koene, 2008). To optimize the monitoring of copulation behavior, it would be relevant to use optimal conditions that have already been determined for the observation of the reproduction of small gastropod species, such as *Physa acuta* and *Radix auricularia* (Facon et al., 2006; Swart et al., 2020).

Daily monitoring of the number of eggs laid revealed a decrease in the number of eggs per egg mass over time at the lowest concentration (0.8 µg/L) of oxazepam. The mean number of eggs per egg mass in non-exposed *R. balthica* (approximately 15-20 eggs) was consistent with

published findings (López-Doval et al., 2019), and this number is known to increase with animal size and age (Lam & Calow 1988, Janse 1989). Despite an effect on the number of eggs per egg mass, the total number of eggs per adult was not affected by oxazepam exposure. These results suggest a possible increase in the frequency of egg mass laying by individuals. The p -value was non significant, but the number of egg masses per individual was greater for 0.8 µg/L oxazepam than for control conditions in weeks 4 and 5, accounting for the similar numbers of eggs per adult between concentrations. The control of egg-laying has been studied in freshwater gastropods (Ferguson 1993, Ter Maat 1992, Herman 1994). In *L. stagnalis*, the neuroendocrine cells controlling egg-laying are the caudodorsal cells, located in the cerebral ganglia; these cells release the ovulatory caudodorsal cell hormone and other peptides (Ter Maat 1983). GABA does not directly influence the production of ovulatory hormone in *L. stagnalis* (Ter Maat and Lodder, 1980), but the GABA system may nevertheless influence the neuroendocrine regulation of egg-laying. No data are available concerning the effect of benzodiazepine on the number of eggs per egg mass in aquatic organisms. The only studies performed on benzodiazepine to date have shown that low doses of diazepam induce an increase in total offspring production in *D. magna* (Fuertes et al., 2019; Rivetti et al., 2016). The difference between these results and ours may be linked to the different sexual strategy between species. Furthermore, the fecundity of *R. balthica* does not seem to be disturbed by oxazepam exposure. Similar observations have already been reported for fathead minnows exposed to diazepam (Lorenzi 2014). However, it should be noted that hatching rates in control and the lowest concentration were significantly lower than expected. A potential self-fertilization of genitors could explain this phenomenon, selfing being a strong factor of fecundity variation (Coutellec and Lagadic, 2006).

Locomotion assays over a period of five hours showed that both oxazepam doses decreased the distance covered over time by exposed adults. Only one other study has reported a decrease in activity in zebrafish exposed to diazepam, but this effect occurred at a very high dose (1200 µg/L) (Wu et al., 2020). Other studies have reported the opposite finding, with a stimulation of adult locomotor activity following exposure to oxazepam at environmental concentrations, in both aquatic vertebrates and non-vertebrates (Brodin et al., 2017, 2014; Kubec et al., 2019; Mazzitelli, 2017). However, none of these studies considered the variation of locomotor behavior over time in a new environment, in which such behavior could be

considered to correspond to exploratory behavior. We found that, during the first hour of monitoring, the snails covered a similar distance in all conditions. However, activity decreased thereafter in the snails exposed to oxazepam. A similar pattern of behavior has been observed in fish exposed to oxazepam (4.7 µg/L) (Huerta et al., 2016), providing additional support for our results. To deal with these results in depth, it would be interesting to explore the possibility that the decrease in locomotor activity after oxazepam exposure could affect the outcrossing ability by observing copulatory behaviors.

V - Conclusion

In summary, we describe here, for the first time, the impact of a benzodiazepine drug on the reproduction of a freshwater gastropod mollusk widespread throughout Europe, *R. balthica*. After characterizing the reproductive system of this snail, we showed that exposure led to an increase in spermatozoa density at the highest dose used, and a decrease in the number of eggs per egg mass over time for the lower, environmentally relevant concentration. The monitoring of locomotion activity over several hours revealed a decrease in locomotor activity after exposure, potentially due to a decrease in exploratory activity. Taken together, these results highlight the adverse effects of a benzodiazepine drug on a freshwater gastropod. However, some questions remain unanswered, as for example the fact that we observed effects at cellular level at the highest concentration (spermatozoon counts) whereas at higher biological level, effects were observed at the lowest concentration (number of eggs per egg mass). To improve understanding, more concentrations should be tested.

Acknowledgments

Funding for this work was provided by a grant from the Region Occitanie (Toulouse, France) for 80% and from Jean-François Champollion University Institute (Albi, France) for 20%. We are grateful to Alex Edelman & Associates for English language proofreading.

References

Ansai, S., Hosokawa, H., Maegawa, S., Kinoshita, M., 2016. Chronic fluoxetine treatment induces anxiolytic responses and altered social behaviors in medaka, *Oryzias latipes*. *Behav. Brain Res.* 303, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.050>

- Bertram, M.G., Ecker, T.E., Wong, B.B.M., O'Bryan, M.K., Baumgartner, J.B., Martin, J.M., Saaristo, M., 2018. The antidepressant fluoxetine alters mechanisms of pre- and post-copulatory sexual selection in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Environ. Pollut.* 238, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.006>
- Boer, H., Plesch, B., De Jong-Brink, M., 1970. Histological and histochemical observations on the reproductive tract of the hermaphrodite pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands J. Zool.* 21, 180–201.
- Bohlken, S., Joosse, J., 1981. The effect of photoperiod on female reproductive activity and growth of the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* kept under laboratory breeding conditions. *Int. J. Invertebr. Reprod.* 4, 213–222. <https://doi.org/10.1080/01651269.1981.10553430>
- Brodin, T., Nordling, J., Lagesson, A., Klaminder, J., Hellström, G., Christensen, B., Fick, J., 2017. Environmental relevant levels of a benzodiazepine (oxazepam) alters important behavioral traits in a common planktivorous fish (*Rutilus rutilus*). *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 80, 963–970. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1352214>
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130580–20130580. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0580>
- Calisto, V., Domingues, M.R.M., Esteves, V.I., 2011. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. *Water Res.* 45, 6097–6106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.008>
- Calisto, V., Esteves, V.I., 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77, 1257–1274. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.021>
- Coutellec-Vreto, M.-A., Jarne, P., Guiller, A., Madec, L., Daguzan, J., 1998. Inbreeding and fitness in the freshwater snail *Lymnaea peregra*: an evaluation over two generations of self-fertilization. *Evolution (N. Y.)* 52, 1635–1647. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb02244.x>
- Coutellec-Vreto, M.A., Madec, L., Guiller, A., 1997. Selfing and biparental inbreeding: A mating system analysis in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Heredity (Edinb.)* 79, 277–285. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.155>
- Coutellec, M.-A., Lagadic, L., 2006. Effects of self-fertilization, environmental stress and exposure to xenobiotics on fitness-related traits of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Ecotoxicology* 15, 199–213. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0049-x>
- Crabb, E.D., 1927. Anatomy and function of the reproductive system in the snail *Lymnaea stagnalis appressa* say. *Biol. Bull.* 53, 55–66. <https://doi.org/10.2307/1537030>
- Cunha, D.L., de Araujo, F.G., Marques, M., 2017. Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 24076–24091. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0170-4>
- De Boer, P.A.C.M., Jansen, R.F., Ter Maat, A., 1996. Copulation in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*: A review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 30, 167–176. <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672542>
- Dong, E., Matsumoto, K., Watanabe, H., 2002. Diazepam binding inhibitor (DBI) reduces testosterone and estradiol levels in vivo. *Life Sci.* 70, 1317–1323. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01502-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01502-8)
- Dorelle, L.S., Da Cuña, R.H., Rey Vázquez, G., Höcht, C., Shimizu, A., Genovese, G., Lo Nostro, F.L., 2017. The SSRI fluoxetine exhibits mild effects on the reproductive axis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Chemosphere* 171, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.141>
- Drobnis, E.Z., Nangia, A.K., 2017. Psychotropics and male reproduction, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 63–101. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69535-8_8
- Duncan, C.J., 1958. The anatomy and physiology of the reproductive system of the freshwater snail *Physa fontinalis* (L.). *Proc. Zool. Soc. London* 131, 55–84. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1958.tb00633.x>
- Escobar, J.S., Auld, J.R., Correa, A.C., Alonso, J.M., Bony, Y.K., Coutellec, M.A., Koene, J.M., Pointier, J.P., Jarne, P., David, P., 2011. Patterns of mating-system evolution in hermaphroditic animals: Correlations among selfing rate, inbreeding depression, and the timing of reproduction. *Evolution (N. Y.)* 65, 1233–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01218.x>
- Fong, P.P., Ford, A.T., 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Aquat. Toxicol.* 151, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.003>
- Fraser, L.A., 1946. The embryology of the reproductive tract of *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 65, 279–298. <https://doi.org/10.2307/3223539>

- Fuertes, I., Campos, B., Rivetti, C., Pinã, B., Barata, C., 2019. Effects of Single and Combined Low Concentrations of Neuroactive Drugs on *Daphnia magna* Reproduction and Transcriptomic Responses. *Environ. Sci. Technol.* 53, 11979–11987. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03228>
- Fursdon, J.B., Martin, J.M., Bertram, M.G., Lehtonen, T.K., Wong, B.B.M., 2019. The pharmaceutical pollutant fluoxetine alters reproductive behaviour in a fish independent of predation risk. *Sci. Total Environ.* 650, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.046>
- Giacomini, A.C.V.V., Abreu, M.S., Giacomini, L. V., Siebel, A.M., Zimerman, F.F., Rambo, C.L., Mocelin, R., Bonan, C.D., Piato, A.L., Barcellos, L.J.G., 2016. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. *Behav. Brain Res.* 296, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.027>
- Guerrero, F.J., Fox, K.A., 1976. Benzodiazepines and reproduction of Swiss Webster mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 13, 601–610.
- Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R., Garric, J., 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environ. Pollut.* 157, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.040>
- Hallgren, P., Sorita, Z., Berglund, O., Persson, A., 2012. Effects of 17 α -ethinylestradiol on individual life-history parameters and estimated population growth rates of the freshwater gastropods *Radix balthica* and *Bithynia tentaculata*. *Ecotoxicology* 21, 803–810. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0841-8>
- Hellström, G., Brodin, T., Jonsson, M., Olsen, H., Leander, J., Fahlman, J., Fick, J., Klaminder, J., 2020. Environmentally relevant concentrations of the common anxiolytic pharmaceutical oxazepam do not have acute effect on spawning behavior in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *J. Appl. Ichthyol.* 36, 105–112. <https://doi.org/10.1111/jai.13980>
- Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9018-0>
- Holm, L.W., 1946. Histological and Functional Studies on the Genital Tract of *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 65, 45. <https://doi.org/10.2307/3223285>
- Jarne, P., Städler, T., 1995. Population genetic structure and mating system evolution in freshwater pulmonates. *Experientia.* <https://doi.org/10.1007/BF02143200>
- Joesse, J., 1975. Structural and Endocrinological Aspects of Hermaphroditism in Pulmonate Snails, with Particular Reference to *Lymnaea stagnalis* (L.), in: *Intersexuality in the Animal Kingdom*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 158–169. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66069-6_16
- Kar, R.N., Das, R.K., 1983. Induction of sperm head abnormalities in mice by three tranquilizers. *Cytobios* 36, 45–51.
- Kishi, K., Kanamori, S., Maruyama, T., Sasaki, K., Hara, K., Kawai, M., Ikeuchi, K., 1995. Potential parameters of male reproductive toxicity: reproductive performance, histopathology and sperm evaluation in SD rats given nitrazepam. *J. Toxicol. Sci.* 20, 329–339. <https://doi.org/10.2131/jts.20.329>
- Koene, J.M., 2010. Neuro-endocrine control of reproduction in hermaphroditic freshwater snails: Mechanisms and evolution. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 167. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00167>
- Koene, Joris M, Kora, A.E., Ae, M.-W., Roelofs, Dick, Andries, A.E., Maat, T., Koene, J M, Montagne-Wajer, Á.K., Roelofs, Á.D., Maat, Á.A. Ter, Montagne-Wajer, K., Roelofs, D, Maat, A. Ter, 2009. The fate of received sperm in the reproductive tract of a hermaphroditic snail and its implications for fertilisation. *Evol Ecol* 23, 533–543. <https://doi.org/10.1007/s10682-008-9253-5>
- Kubec, J., Hossain, M., Grabicová, K., Randák, T., Kouba, A., Grabic, R., Roje, S., Buřič, M., 2019. Oxazepam alters the behavior of crayfish at diluted concentrations, venlafaxine does not. *Water* 11, 196. <https://doi.org/10.3390/w11020196>
- Lam, P.K.S., Calow, P., 1989. Intraspecific Life-History Variation in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata). II. Environmental or Genetic Variance. *J. Anim. Ecol.* 58, 589. <https://doi.org/10.2307/4850>
- Lazzara, R., Blázquez, M., Porte, C., Barata, C., 2012. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.11.003>
- Locher, R., Baur, B., 1997. A new technique to assess the number of spermatozoa in spermatophores of stylommatophoran gastropods. *J. Molluscan Stud.* 63, 555–556. <https://doi.org/10.1093/mollus/63.4.555>

- López-Doval, J.C., Freixa, A., Santos, L.H.M.L.M., Sanchís, J., Rodríguez-Mozaz, S., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2019. Exposure to single and binary mixtures of fullerenes and triclosan: Reproductive and behavioral effects in the freshwater snail *Radix balthica*. *Environ. Res.* 176, 108565. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108565>
- Lorenzi, V., Choe, R., Schlenk, D., 2014. Effects of environmental exposure to diazepam on the reproductive behavior of fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol.* 31, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/tox.22069>
- Martin, J.M., Bertram, M.G., Saaristo, M., Ecker, T.E., Hannington, S.L., Tanner, J.L., Michelangeli, M., O'Bryan, M.K., Wong, B.B.M., 2019. Impact of the widespread pharmaceutical pollutant fluoxetine on behaviour and sperm traits in a freshwater fish. *Sci. Total Environ.* 650, 1771–1778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.294>
- Mazzitelli, J.-Y., 2017. Évaluation de la toxicité de molécules médicamenteuses par une étude des réponses comportementales, physiologiques et transcriptomiques d'un mollusque dulçaquicole (*Radix balthica*) et d'un plathelminthe (*Schmidtea polychroa*). <http://www.theses.fr>. Toulouse 2.
- Mazzitelli, J.-Y., Bonnafe, E., Klopp, C., Escudier, F., Geret, F., 2017. De novo transcriptome sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover genes and pathways affected by exposure to oxazepam. *Ecotoxicology* 26, 127–140. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1748-1>
- Mazzitelli, J.-Y., Budzinski, H., Cachot, J., Geffard, O., Marty, P., Chiffre, A., François, A., Bonnafe, E., Geret, F., 2018. Evaluation of psychiatric hospital wastewater toxicity: what is its impact on aquatic organisms? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 26090–26102. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2501-5>
- McElhatton, P.R., 1994. The effects of benzodiazepine use during pregnancy and lactation. *Reprod. Toxicol.* [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0890-6238(94)90029-9)
- Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O., Minakata, H., 2010. Regulatory actions of neuropeptides and peptide hormones on the reproduction of molluscs. *Can. J. Zool.* 88, 825–845. <https://doi.org/10.1139/Z10-041>
- Nentwig, G., 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 163–170. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-7190-7>
- OECD, 2016. Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* reproduction test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264264335-en>
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., 2000. Effects of endocrine disruptors on Prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* 9, 383–397. <https://doi.org/10.1023/A:1008972518019>
- Ohbayashi-Hodoki, K., Ishihama, F., Shimada, M., 2004. Body size--dependent gender role in a simultaneous hermaphrodite freshwater snail, *Physa acuta* 976–981.
- Omran, N.E.S.E.S., 2012. Testosterone, gonadotropins and androgen receptor during spermatogenesis of *Biomphalaria alexandrina* snails (Pulmonata: Basommatophora). *Reprod. Biol.* 12, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2012.10.002>
- Parrott, J.L., Metcalfe, C.D., 2017. Assessing the effects of the antidepressant venlafaxine to fathead minnows exposed to environmentally relevant concentrations over a full life cycle. *Environ. Pollut.* 229, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.009>
- Péry, A.R.R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., Garric, J., 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere* 73, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.029>
- Rivetti, C., Campos, B., Barata, C., 2016. Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 170, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.019>
- Rudolph, P.H., 1983. Copulatory activity and sperm production in *Bulinus* (*Physopsis*) *globosus* (Gastropoda: Planorbidae). *J. Molluscan Stud.* 49, 125–132. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a065702>
- Sánchez-Argüello, P., Fernández, C., Tarazona, J. V., 2009. Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water-sediment test. *Sci. Total Environ.* 407, 1937–1946. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.004>
- Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., Oehlmann, J., Watermann, B., Scherf, S., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (mollusca: gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology* 9, 399–412. <https://doi.org/10.1023/A:1008924602089>

Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 104, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.011>

Silva, B., Costa, F., Neves, I.C., Tavares, T., 2015. Psychiatric Pharmaceuticals as Emerging Contaminants in Wastewater. *Springer*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20493-2>

Tair-Abbaci, K., Joachim, S., Garric, J., Boisseaux, P., Exbrayat, J.-M., Porcher, J.-M., Geffard, O., 2017. Anatomical and histological characterization of the gametogenesis of *Radix balthica* (Linnaeus, 1758) in comparison with *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). *J. Histol. Histopathol.* 4, 5. <https://doi.org/10.7243/2055-091X-4-5>

Ter Maat, A., 1992. Egg laying in the hermaphrodite pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Prog. Brain Res.* 92, 345–360. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61188-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61188-7)

Ter Maat, A., Lodder, J.C., 1980. A biphasic cholinergic input on the ovulation hormone producing caudo-dorsal cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 66, 115–119. [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(80\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0306-4492(80)90082-9)

Ter Maat, A., Zonneveld, C., de Visser, J.A.G.M., Jansen, R.F., Montagne-Wajer, K., Koene, J.M., 2007. Food intake, growth, and reproduction as affected by day length and food availability in the pond snail *Lymnaea stagnalis**. *Am. Malacol. Bull.* 23, 113–120. <https://doi.org/10.4003/0740-2783-23.1.113>

Thoré, E.S.J., Philippe, C., Brendonck, L., Pinceel, T., 2020. Antidepressant exposure reduces body size, increases fecundity and alters social behavior in the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Environ. Pollut.* 265, 115068. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115068>

Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., Oehlmann, J., 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10, 373–388. <https://doi.org/10.1023/A:1012279231373>

Trudeau, V.L., Spanswick, D., Fraser, E.J., Lariviere, K., Crump, D., Chiu, S., MacMillan, M., Schulz, R.W., 2000. The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish, in: *Biochemistry and Cell Biology*. National Research Council of Canada, pp. 241–259. <https://doi.org/10.1139/o99-075>

Van Duivenboden, Y.A., Maat, A. Ter, 1985. Masculinity and receptivity in the hermaphrodite pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Anim. Behav.* 33, 885–891. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(85\)80022-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(85)80022-1)

Weinberger, J., Klaper, R., 2014. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquat. Toxicol.* 151, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>

Wiles, S.C., Bertram, M.G., Martin, J.M., Tan, H., Lehtonen, T.K., Wong, B.B.M., 2020. Long-Term Pharmaceutical Contamination and Temperature Stress Disrupt Fish Behavior. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01625>

Wullschleger, E.B., Jokela, J., 2002. Morphological plasticity and divergence in life history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *J. Molluscan Stud.* 68, 1–5. <https://doi.org/10.1093/mollus/68.1.1>

Supplementary information

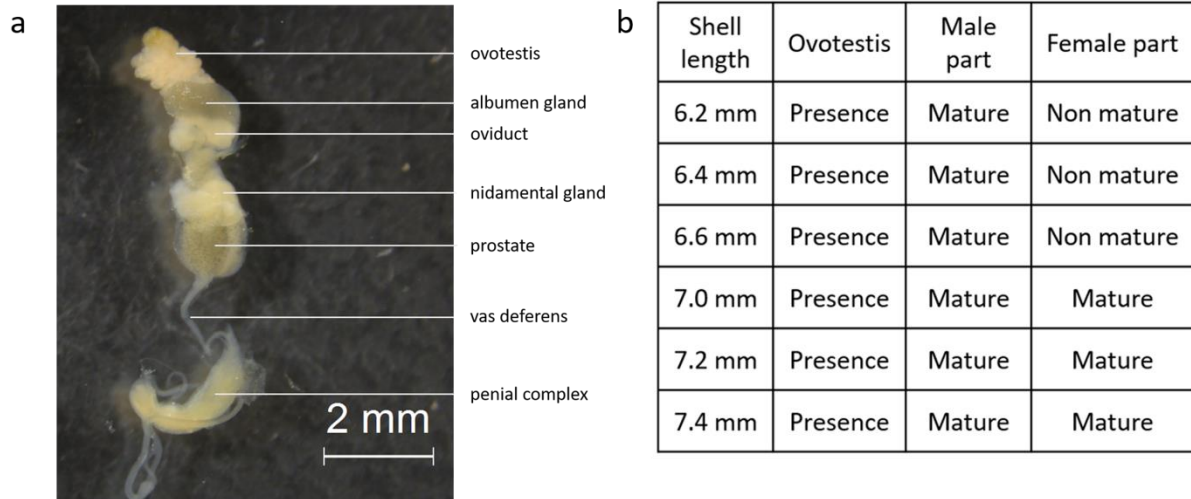


Figure 2-I-8 : a) Identification of the reproductive apparatus of *Radix balthica*. The female organs consisted of the oviduct (oothecal gland), nidamental gland (uterus) and albumen gland. The mature albumen gland was graybeige in color and kidney-shaped, whereas the oviduct and nidamental were cream-colored. The male part of genital tract consisted of the prostate (pear-shaped and beige with black spots), vas deferens and penial complex. b) Organ maturity as a function of shell length. The ovotestis was visible in all individuals of at least 6.2 mm in length. The male organs (penial complex and prostate) were present and had their mature shape and color in all individuals. The female organs (oviduct, nidamental gland and albumen gland) were still forming in the smallest snails and took on their mature form and color only in snails of at least 7 mm in length.

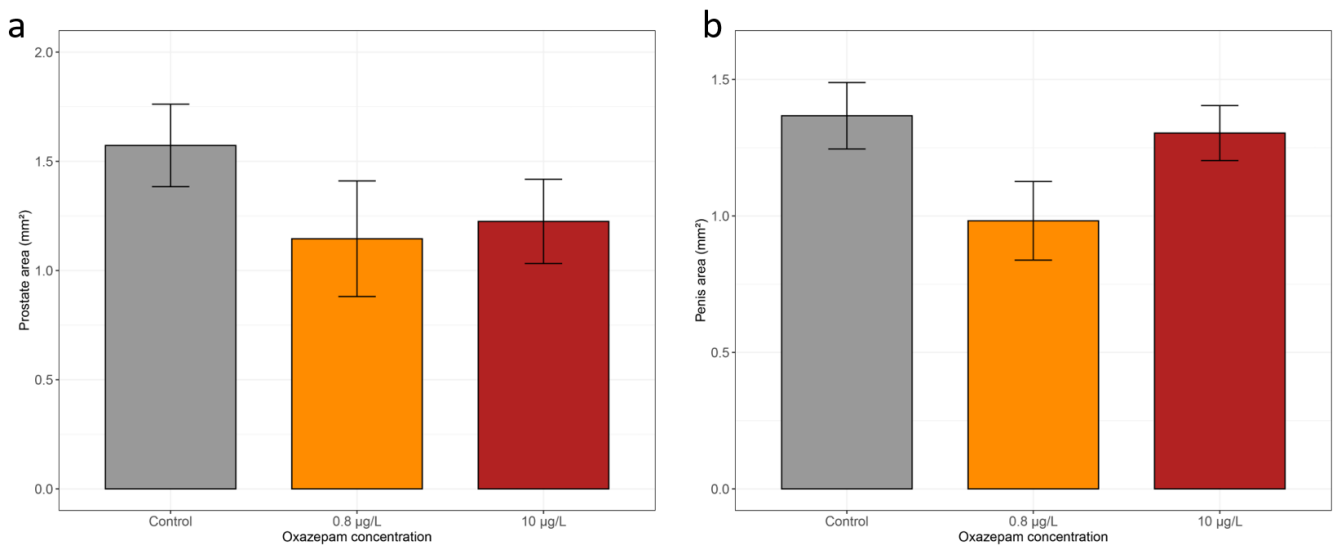


Figure 2-I-9 : Effects of oxazepam on the area (mm²) of male reproductive organs: a) prostate gland and b) penis, for each set of conditions (n=8 individuals per set of conditions). Bars and error bars indicate the mean \pm SEM

Chapitre II : Effets de l'oxazépam sur l'embryogénèse de *R. balthica*

I - Introduction

Le stade embryonnaire est une étape clé de la vie d'un organisme. C'est à ce stade crucial qu'a lieu l'organogénèse et la formation du système nerveux. C'est également à ce stade que peuvent apparaître des malformations pouvant induire de la mortalité embryonnaire ou impacter la suite du développement, perturbant ainsi la population. Il apparaît donc indispensable d'étudier les effets des polluants sur ce stade de vie.

Les tests d'embryotoxicité sont en constant développement et prennent une place de plus en plus importante dans la gestion des risques environnementaux. Ils présentent de nombreux avantages tels que la courte durée d'expérimentation, la facilité de mise en œuvre en condition de laboratoire ainsi que leur faible coût. Ces tests sont d'autant plus intéressants qu'ils ciblent un stade de vie particulièrement sensible aux variations environnementales.

Chez les gastéropodes d'eau douce, quelques publications ont déjà fait l'objet de développement de tests embryotoxiques (Bandow and Weltje, 2012; Liu et al., 2013), mais ces études se sont majoritairement focalisées sur l'étape d'éclosion, en observant les taux d'éclosion et de mortalité. En revanche, il est rare que des tests d'embryotoxicité s'intéressent aux stades plus précoces de développement. Dans cette étude, nous avons fait le choix d'évaluer la toxicité de l'oxazépam sur trois paramètres, chacun représentatif d'un stade de développement : les accélérations de rotations embryonnaires au stade trochophore (3 jours de développement), les battements cardiaques au stade hippo (8 jours de développement) et l'éclosion.

Comme mentionné dans l'état de l'art (partie 1-III-C), au stade trochophore, les couronnes ciliaires des embryons permettent une rotation constante durant lesquelles surviennent des accélérations de rotation, décrites chez *Helisoma trivolvis* comme étant sous contrôle sérotoninergique et dopaminergique (Christopher et al., 1996; Diefenbach et al., 1991, Goldberg et al., 2011). Ces accélérations de rotations ont été largement décrites mais n'ont encore, à notre connaissance, jamais été utilisées comme marqueur de toxicité des embryons. Seule l'étude de Uhler et al. (2000) a montré que l'application de SSRI induisaient une perturbation des rotations totales de l'embryon, avec des effets variables selon les molécules, mais sans se focaliser sur les accélérations de rotation.

Les battements cardiaques sont visibles dès 7 jours de développement, au stade hippo (Bandow and Weltje, 2012). Il a été montré que les battements cardiaques sont régulés de manière complexe au niveau du système nerveux. De nombreux neuromodulateurs interviennent tels que la sérotonine, la dopamine et l'acétylcholine mais également de nombreux neuropeptides comme le FMRFamide et peptides associés (FMRFamide related peptide), les SCP A et B (Small Cardio Peptide) ainsi que les SDPFLRFamide et GDPFLRFamide (Buckett et al., 1990). Même si ce paramètre est encore peu utilisé en écotoxicologie, quelques études l'ont cependant pris en compte dans leur analyse d'embryotoxicité (Hallett et al., 2016; Khangarot and Das, 2010).

Enfin, l'analyse de l'éclosion embryonnaire est beaucoup plus répandue dans les analyses toxicologiques (Das and Khangarot, 2011; Gao et al., 2017; Gomot, 1998; Johnston et al., 2017; Khangarot and Das, 2010; Oliveira-Filho et al., 2010) et elle est souvent associée à un suivi de la mortalité et des malformations embryonnaires. Comme décrit en Partie 1 (III-C), les mécanismes induisant l'éclosion des embryons chez les gastéropodes sont à la fois mécaniques et moléculaires, avec une répétition de mouvements de la radula autour de la paroi, médiés par la sérotonine et la dopamine, couplé à la sécrétion de substances protéolytiques (Andrade-Villagrán et al., 2018b; Elekes et al., 2018; Filla et al., 2009; Hawkins and Hutchinson, 1988; Sullivan and Bonar, 1984).

En conclusion, ces trois marqueurs ont été sélectionnés pour la représentativité de leur stade de développement et pour leur régulation par le système nerveux qui pourrait être perturbé par des benzodiazépines. Il a en effet été montré que, chez la moule d'eau douce, le diazépam induisait une diminution du taux de sérotonine ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase sensible à la dopamine (Gagné et al., 2010). De plus, il a été montré que le diazépam induisait une augmentation des niveaux de dopamine chez la daphnie (Rivetti et al., 2019). Ces études suggèrent que les marqueurs ciblés dans notre étude pourraient être impactés par une exposition à l'oxazépam.

Ce chapitre est divisé en quatre sections. Je présenterai dans un premier temps les résultats obtenus sur la caractérisation des accélérations de rotation et des battements cardiaques dans le temps et au cours du développement afin de définir les conditions nécessaires à leur utilisation dans des tests d'embryotoxicité. Je présenterai en seconde section, les résultats des

trois études d'embryotoxicité menées sur différentes populations en faisant varier un paramètre tel que la provenance des géniteurs (sauvages ou d'élevage) ou encore l'exposition ou non des géniteurs à la molécule, dans le but d'apporter des informations sur la sensibilité de chaque population à l'oxazépam. La troisième section concernera les résultats d'une étude complémentaire à la seconde partie, qui aura pour objectif de caractériser les fenêtres de sensibilité des embryons à l'oxazépam. Enfin, je présenterai en quatrième section les résultats d'une étude transcriptomique visant à évaluer l'impact moléculaire d'une exposition à l'oxazépam sur des gènes impliqués dans le développement embryonnaire, la régulation nerveuse, la détoxification. L'ensemble de ces résultats permettra d'évaluer les effets de l'oxazépam sur le développement embryonnaire de *R. balthica* et d'apporter quelques éléments de réponse aux mécanismes de toxicité de la molécule.

II - Matériels et méthodes

A) Détermination des moments clés pour l'analyse des accélérations de rotation et des battements cardiaques

Les gangues, issues de géniteurs cultivés en laboratoire depuis une génération, ont été récoltées au maximum 14 heures après la ponte puis placées en boîtes de Pétri en verre dans 10 mL d'eau ISO. Les boîtes ont été recouvertes de parafilm percé de quelques trous afin de permettre les échanges gazeux tout en évitant le phénomène d'évaporation. Les boîtes sont incubées dans une chambre thermostatée à 21°C, avec une photopériode de 16h jours / 8h nuit. Quatre pontes ont été utilisées pour caractériser les accélérations de rotations et trois pontes pour les battements cardiaques.

Quarante-huit heures après la récupération des pontes, le suivi des accélérations de rotation a débuté. De 9h à 17h, toutes les heures, entre 25 et 30 embryons, répartis sur les 4 pontes, ont été filmés durant 1 minute grâce à une caméra couplée à une loupe binoculaire (Leica ICC50 W). Les accélérations de rotations ont ensuite été dénombrées pour chaque embryon par visionnage des vidéos en accéléré. Ce protocole a été reproduit les deux jours suivants (J3 et J4), sur les mêmes pontes.

Sept jours après récupération des pontes, les battements cardiaques ont été observés, de 9h à 17h, toutes les heures, sur 25 embryons répartis sur les 3 pontes et dénombrés durant une

période de 20 secondes chacun. Il est apparu très difficile de réaliser le comptage sur plus de 20 secondes à cause des mouvements des embryons qui peuvent empêcher la bonne visualisation du cœur.

B) Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de différentes populations de géniteurs

Les effets de l'oxazépam sur les accélérations de rotations, les battements cardiaques et le taux d'éclosion ont été étudiés en faisant varier la provenance des géniteurs (sauvages ou d'élevage), la saison de prélèvement, et l'exposition ou non des géniteurs à l'oxazépam.

D'une manière générale, les embryons ont été exposés à 3 concentrations : 0 (témoin) ; 0,8 µg/L (concentration environnementale) et 10 µg/L (forte concentration). Même s'il a été démontré que les embryons étaient plus sensibles hors de leur gangue (Liu et al., 2013), nous avons fait le choix d'exposer les embryons en gangues entières afin d'être plus représentatif d'une exposition en milieu naturel. Les œufs ont été récoltés juste après la ponte (maximum 24 heures) et exposés en boîtes de Pétri en verre recouvert de parafilm (10 mL d'eau ISO 6341:2012) durant tout le développement à 21 °C, avec une photopériode de 16h jour / 8h nuit. Le nombre de gangues par condition varie entre 3 et 8 selon les expérimentations pour suivre entre 100 et 200 œufs par condition.

Comme justifié précédemment, trois stades de développement ont été ciblés. Au stade trochophore (3 jours post fécondation (jpf)), les accélérations de rotations des embryons ont été suivies en début d'après-midi. Durant 1 min, ces accélérations de rotation ont été comptées sur 60 à 65 embryons par condition (selon Diefenbach et al., 1991). Le second paramètre analysé sont les battements cardiaques au stade hippo (8 jpf) qui ont été mesurés sur 40 à 45 embryons par condition durant 20 secondes (Liu et al., 2013). Enfin, un suivi quotidien d'éclosion a été réalisé, entre 8 et 15 pour l'analyse préliminaire et entre 8 et à 18 jours pour les trois expériences suivantes.

Une analyse préliminaire a permis de définir les meilleures conditions d'analyses pour ces différents paramètres dans le cadre d'une exposition à l'oxazépam. Celle-ci a été réalisée sur des embryons issus de géniteurs prélevés dans la Garonne en Juin 2018. Les accélérations de rotation ont été dénombrées à l'œil nu, sans enregistrement des vidéos et les pontes ont été

écrasées entre deux lames de verres pour observer au mieux les battements cardiaques. Le suivi d'éclosion a été réalisé jusqu'à 15 jours.

Les études embryotoxiques en général pouvant aussi bien être réalisées sur des embryons issus de géniteurs sauvages que sur des géniteurs d'élevage, il nous est apparu important d'acquérir cette donnée de toxicité sur les deux types de populations d'embryons. Cette question est apparue d'autant plus intéressante depuis qu'une étude a montré une différence de réponse importante à l'oxazépam entre des poissons zèbres sauvages et d'élevage (Vossen et al., 2020b). Ainsi, nous avons évalué l'impact de l'oxazépam sur les embryons issus de géniteurs élevés en laboratoire (expérience réalisée en janvier 2019), et sur les embryons issus de géniteurs prélevés dans l'environnement (expérience réalisée en août 2019). Comme déterminé dans l'analyse préliminaire, les accélérations de rotation ont été filmées et les pontes n'ont pas été écrasées pour le suivi de la fréquence cardiaque. Le suivi d'éclosion a été réalisé jusqu'à 18 jours.

Enfin, il nous est également apparu intéressant d'évaluer les effets d'une exposition parentale sur l'embryogénèse. Ainsi, les pontes issues de géniteurs préalablement exposés à l'oxazépam depuis deux mois (Cf chapitre II) ont été récupérées et elles-mêmes exposées à la molécule. Le protocole d'analyse des différents paramètres a été identique aux expériences précédentes.

La figure 2-II-1 résume schématiquement les différentes conditions d'expérimentations pour chacune des quatre expérimentations (analyse préliminaire, comparaison de l'origine des géniteurs (élevage et sauvage) et exposition parentale).

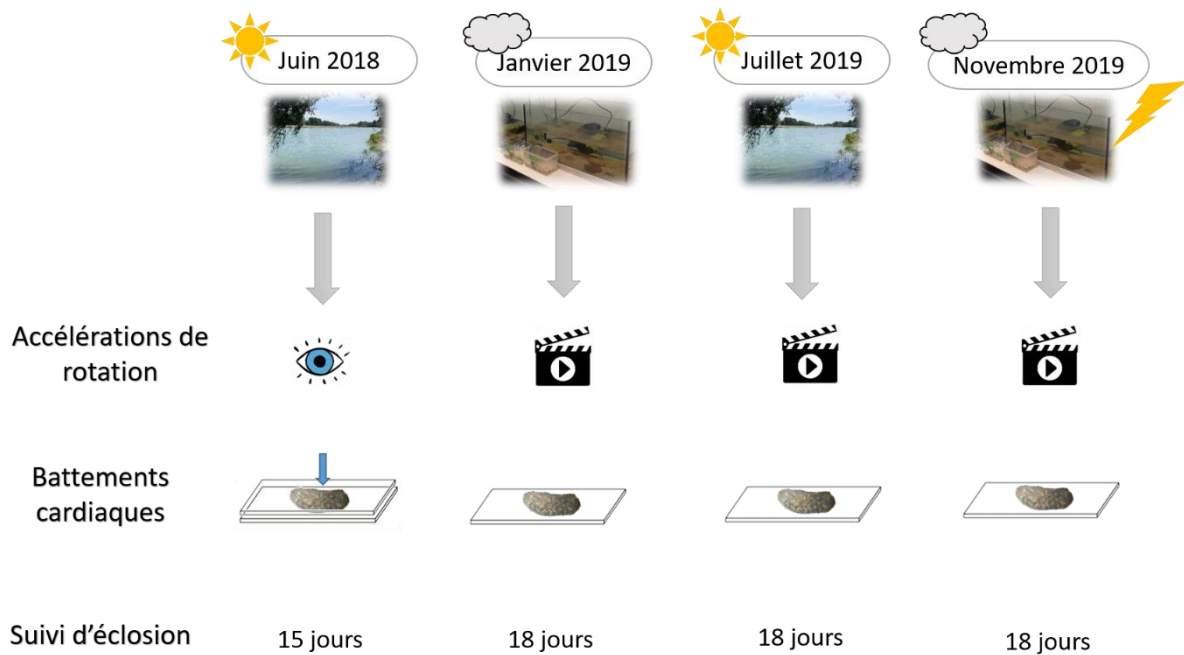


Figure 2-II-1 : Schéma résumant les conditions expérimentales de chacune des quatre expérimentations embryotoxiques. Pour l'analyse préliminaire, réalisée sur des embryons issus de géniteurs sauvages, les accélérations de rotations ont été comptées en direct (sans enregistrement vidéo). Pour le suivi des battements cardiaques, les gangues ont été pressées entre deux lames et le suivi d'éclosion a été stoppé après 15 jours de développement. Pour les trois autres expérimentations, l'unique différence entre elles provient des géniteurs ; la seconde expérimentation a été réalisée à partir de géniteurs d'élevage, la troisième, à partir de géniteurs sauvages et pour la quatrième, les géniteurs d'élevages ont été préalablement exposés à la molécule. Pour chacune des trois dernières expériences, les accélérations de rotations ont été filmées, les gangues n'ont pas été écrasées pour le suivi des battements cardiaques et le suivi d'éclosion a duré 18 jours.

C) Etude des fenêtres de sensibilité des embryons face à l'oxazépam

Afin d'identifier les moments les plus sensibles du développement des embryons de *R. balthica* vis-à-vis de l'oxazépam, une exposition ciblant des fenêtres de développement précises a été réalisée (Figure 2-II-2) et les effets ont été mesurés en observant le taux d'éclosion. Cette expérience s'est inspirée de l'étude de Johnston et al. (2017).

Les gangues ont été récoltées auprès de géniteurs préalablement échantillonnés sur la Garonne. Quatre gangues contenant au total environ 150 œufs ont été récupérées pour chacune des conditions testées, présentées en figure 2-II-8. Immédiatement après récolte, les gangues ont été placées en boîtes de Pétri en verre dans 10 mL d'eau ISO et exposées ou non en fonction des conditions. La concentration d'exposition à l'oxazépam est unique et a été fixée à 10 µg/L. De la même façon que précédemment, un suivi quotidien d'éclosion est réalisé

entre les jours 8 et 18 de développement. La cinétique d'éclosion ainsi que le temps moyen d'éclosion ont été réalisés.

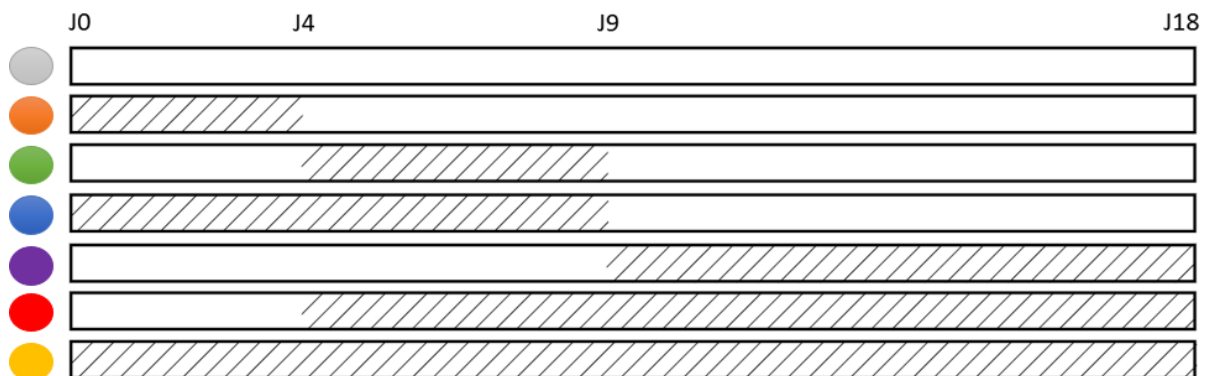


Figure 2-II-2 : Schéma indiquant les différentes conditions d'exposition. Les rectangles en hachurés correspondent aux périodes d'exposition tandis que les rectangles vides correspondent aux périodes d'incubation en eau saine.

D) Effets de l'oxazépam sur l'expression de gènes impliqués dans la signalisation calcique, l'interaction cellule/MEC et la détoxification

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires associés aux effets physiologiques de l'oxazépam sur les embryons, une étude de transcriptomique ciblée a été réalisée sur les embryons de l'analyse préliminaire. Cette étude a été menée sur des embryons au stade pré-éclosion (8 jours de développement) et au stade éclos (15 jours de développement). Afin de prendre en compte la variabilité inter-individuelle, nous avons fait le choix de n'utiliser qu'un seul embryon par échantillon grâce à un protocole d'extraction ARN adapté pour les microquantités (Yaffe et al., 2012).

1. Extraction ARN et traitement DNase

Le protocole d'extraction ARN est tiré de l'article de Yaffe et al. (2012). Chaque embryon est broyé au pilon dans 250 μ L de solution tampon (MES 20 mM final, EDTA 20 mM final, Guanidine 7,5 M final) puis centrifugé 20 min à 15 000g, 4°C. La phase liquide est extraite en mesurant le volume et transférée dans un nouveau tube. Un volume d'éthanol 96% est ajouté, la solution est brièvement centrifugée, puis réhomogénéisée et transférée sur colonne (Kit MiniPrep, Invitrogen). La colonne est centrifugée 1 min, à 8 000g, 21°C, le tube est vidé puis 450 μ L d'acétate de sodium 3 M sont ajoutés. La colonne est de nouveau centrifugée puis un second lavage à l'acétate de sodium est réalisé. Après avoir transféré la colonne dans un tube propre, 320 μ L d'éthanol 70% sont ajoutés pour le rinçage et le tube est centrifugé deux fois

2 min à 15 000 g, 21°C. Enfin, l'ARN est élué par ajout de 20 µL d'eau traitée au DEPC et centrifugé 2 min à 8 000g, 21°C.

Un traitement DNase est par la suite réalisé, avec le protocole du kit DNA-free kit (Ambion), selon les recommandations du fournisseur.

2. Transcription inverse et PCR quantitative BioMark

La transcription inverse des ARN a été réalisée selon les recommandations fournisseur du kit M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen). Brièvement, 150 ng d'ARN ont été ajoutés à 2,5 µM de random hexamer et à 0,5 mM de dNTP, pour un volume final de 12 µL. Une étape de dénaturation à 65°C pendant 5 minutes est réalisée puis du tampon de reverse transcription (1X final), du DTT (10 mM final), 1 U de RNase out et 1 U d'enzyme M-MLV sont ajoutés avant de finir le programme de transcription (10 min à 25°C, 50 min à 37°C, 15 min à 70°C).

Une PCR quantitative sur puce Biomark a été réalisée au plateau de Génotoul (Toulouse) en ciblant 95 gènes impliqués dans le développement, le système nerveux, la détoxification, et en testant de nouveau des gènes utilisés dans la thèse de J-Y Mazzitelli, impliqués dans la voie NOTCH par exemple (Figure 2-II-3). Le gène *ribosomal protein L18* (RPL18) a été choisi comme gène de référence. Le protocole utilisé est détaillé dans le chapitre III.

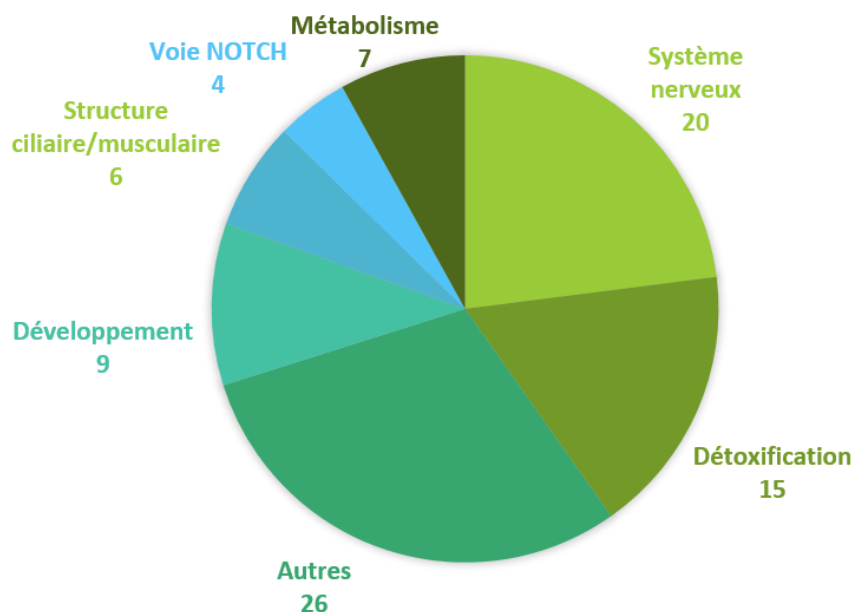


Figure 2-II-3 : Grandes fonctions ciblées pour l'analyse en PCR quantitative. Le nombre de gènes ciblés est indiqué sous chaque fonction.

III - Détermination des moments clés pour l'analyse des accélérations de rotation et des battements cardiaques

Les accélérations de rotations survenant principalement au stade trochophore, nous avons focalisé notre suivi sur les jours 2, 3 et 4 de développement (stades E20, E25 et E30 selon McKenney and Goldberg, 1989 et stades 19, 20 et 21 selon Mescheriakov, 1990).

Les battements cardiaques sont visibles à partir de 7 jours. Ainsi, le stade le plus approprié est situé aux environs de 8 jours ; l'embryon a atteint sa forme adulte tout en limitant le risque d'éclosion. Nous avons donc choisi de cibler l'analyse des battements cardiaques entre 7 et 9 jours de développement (stades 26, 27, 28 selon Mescheriakov, 1990).

A) Détermination des fenêtres temporelles pour l'étude des accélérations de rotation

Le suivi temporel des accélérations de rotation, réalisé durant 6 heures aux jours 2, 3 et 4 de développement est présenté en figure 2-II-4.

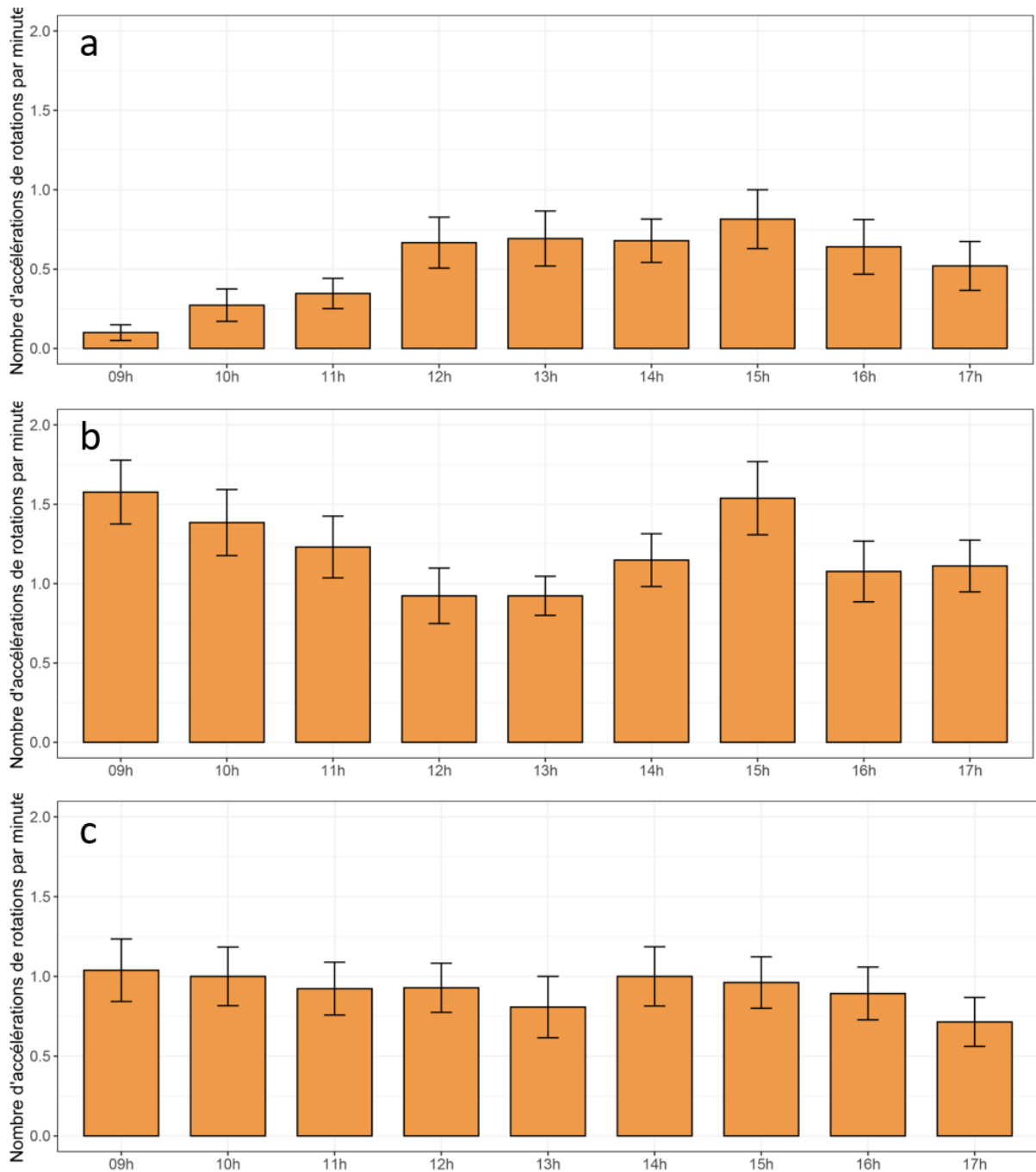


Figure 2-II-4 : Suivi temporel du nombre d'accélération de rotations des embryons de *R. balthica* aux stades a) E20, b) E25, c) E30 (stades selon McKenney and Goldberg, 1989).

Les résultats de ce suivi montrent une variation des accélérations de rotation en fonction du stade de développement des embryons. La figure 2-II-4a, correspondant aux embryons au stade 2 jours (E20 selon McKenney and Goldberg, 1989) permet de mettre en lumière une augmentation du nombre d'accélérations au cours du temps, notamment durant les quatre premières heures, de $0,1 (\pm 0,05)$ accélérations la première heure à $0,67 (\pm 0,16)$ quatre heures plus tard. Une stabilisation relative est par la suite observée, autour de 0,65 accélérations de

rotation par minute. Au jour 3 (E25 selon McKenney and Goldberg, 1989), les accélérations de rotations sont plus fréquentes en début de suivi ($1,58 \pm 0,2$), puis une diminution est observée jusqu'à atteindre environ 1 accélération de rotation par minute. Ce niveau semble se maintenir jusqu'à la fin de suivi quotidien, excepté à 15h où un pic est observé, avec un retour à $1,54 \pm 0,23$ accélérations de rotations (Figure 2-II-4b). Enfin, au jour 4 (E30 selon McKenney and Goldberg, 1989), aucune variation n'est observée au cours de la journée, avec environ 1 accélération de rotation par minute quel que soit l'heure de la journée (Figure 2-II-4c).

Ce suivi nous renseigne sur le fait que les accélérations de rotations ne sont pas constantes au cours du temps. Cette information avait déjà été mise en lumière chez les embryons de *Helisoma trivolvis* par Dienfenbach et al. (1991). Cette étude a montré des résultats similaires aux nôtres, avec, au stade E20, au taux d'environ 0,4 accélération par minute, au stade E25, environ 1,5 et au stade E30, 1 accélération par minute. L'origine de ces variations d'accélération en fonction du stade de développement n'a pas encore été élucidée. Il est probable que la régulation nerveuse soit à l'origine de ce phénomène. En effet, il a été démontré que la sérotonine jouait un rôle stimulateur dans ce phénomène d'accélérations (Dienfenbach et al., 1991) et l'étude de Cole et al. (2002) a montré que l'oxyde nitrique était également impliqué dans la stimulation de l'activité de ces accélérations.

Ces résultats nous permettent également de prendre conscience de l'importance du stade de développement choisi pour l'analyse de ce paramètre physiologique. En effet, il sera nécessaire, dans la mesure du possible, d'être attentif à ce que les embryons soient à la même étape du stade trochophore. De plus, afin d'éviter les variations naturelles d'accélérations de rotations aux stades les plus précoces (E20 et début E25), les embryons devront être exposés durant 3 jours après récupération des pontes.

Enfin, ces mesures ont permis d'écarter l'impact de la manipulation des embryons sur la fréquence d'accélération. En effet, il était légitime de se demander si les manipulations répétées (ouverture et aération des boîtes de Pétri, effets de la lumière de la loupe binoculaire) impactaient la réponse physiologique des embryons. La stabilité de la réponse au jour 4 donne un élément de réponse. On peut ainsi supposer que les conditions de manipulations n'impactent pas ou peu la fréquence des accélérations de rotation.

B) Détermination des fenêtres temporelles pour l'étude des battements cardiaques

cardiaques

Le suivi temporel des battements cardiaques, réalisé durant 6 heures aux jours 7, 8 et 9 de développement est présenté en figure 2-II-5.

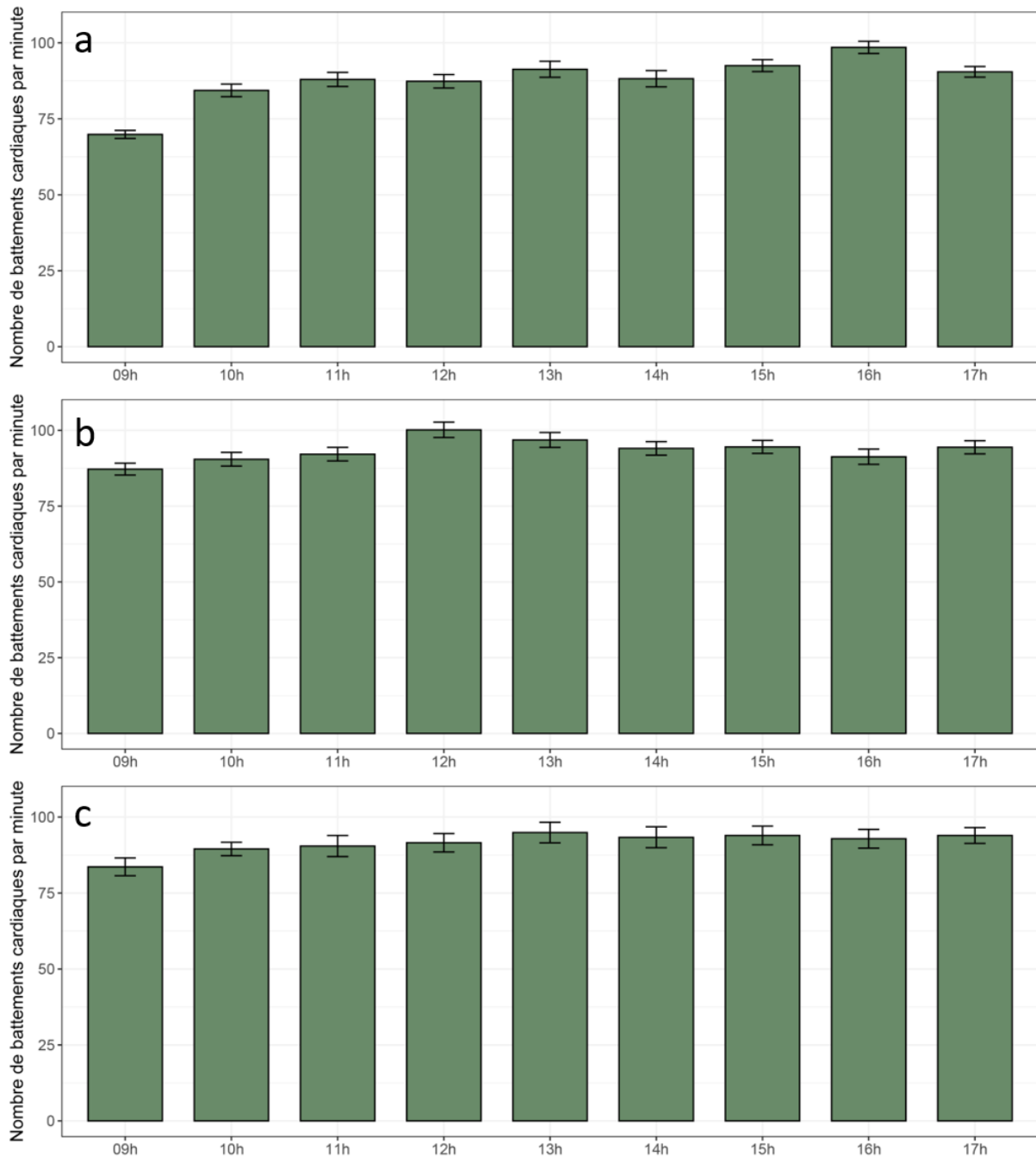


Figure 2-II-5 : Suivi temporel des battements cardiaques des embryons de *R. balthica* aux stades a) 26, b) 27, c) 28 (stades selon Mescheriakov (1990)).

Les résultats de suivi des battements cardiaques au cours du temps, contrairement aux accélérations de rotation, ne mettent pas en évidence de variation entre les stades 26 et 28 du stade hippo. La fréquence cardiaque est en moyenne de 90 battements par minute et est cohérente avec l'étude de Khabarova et Voronezhskaya (2012), réalisée sur des embryons de *Helisoma trivolvis*. Cependant, leur étude a montré une variation entre le stade 25, 26 et 27 (correspondants aux jours 7, 8 et 9 de notre étude), avec un pic de fréquence cardiaque à 110 battements par minute au stade 26, alors que les stades 25 et 27 présentent des fréquences de 85 à 95 battements par minute.

Il est également important de noter que lors de la première heure de suivi, la fréquence cardiaque est systématiquement plus faible. Cette donnée pourrait traduire le fait que les manipulations répétées des boîtes de Pétri et/ou la lumière de la loupe binoculaire induirait un stress, augmentant la fréquence cardiaque. Il est donc recommandé, pour les futures expérimentations d'embryotoxicité, de limiter les mouvements de boîtes de Pétri et de limiter au maximum le temps passé sous loupe binoculaire.

IV - Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de différentes populations de géniteurs

A) Analyse préliminaire de la caractérisation des effets de l'oxazépam sur les embryons

Les résultats de l'analyse préliminaire ayant pour objectif de définir les conditions d'analyse optimales pour les accélérations de rotation, les battements cardiaques et le suivi d'éclosion sont présentés dans la figure 2-II-6.

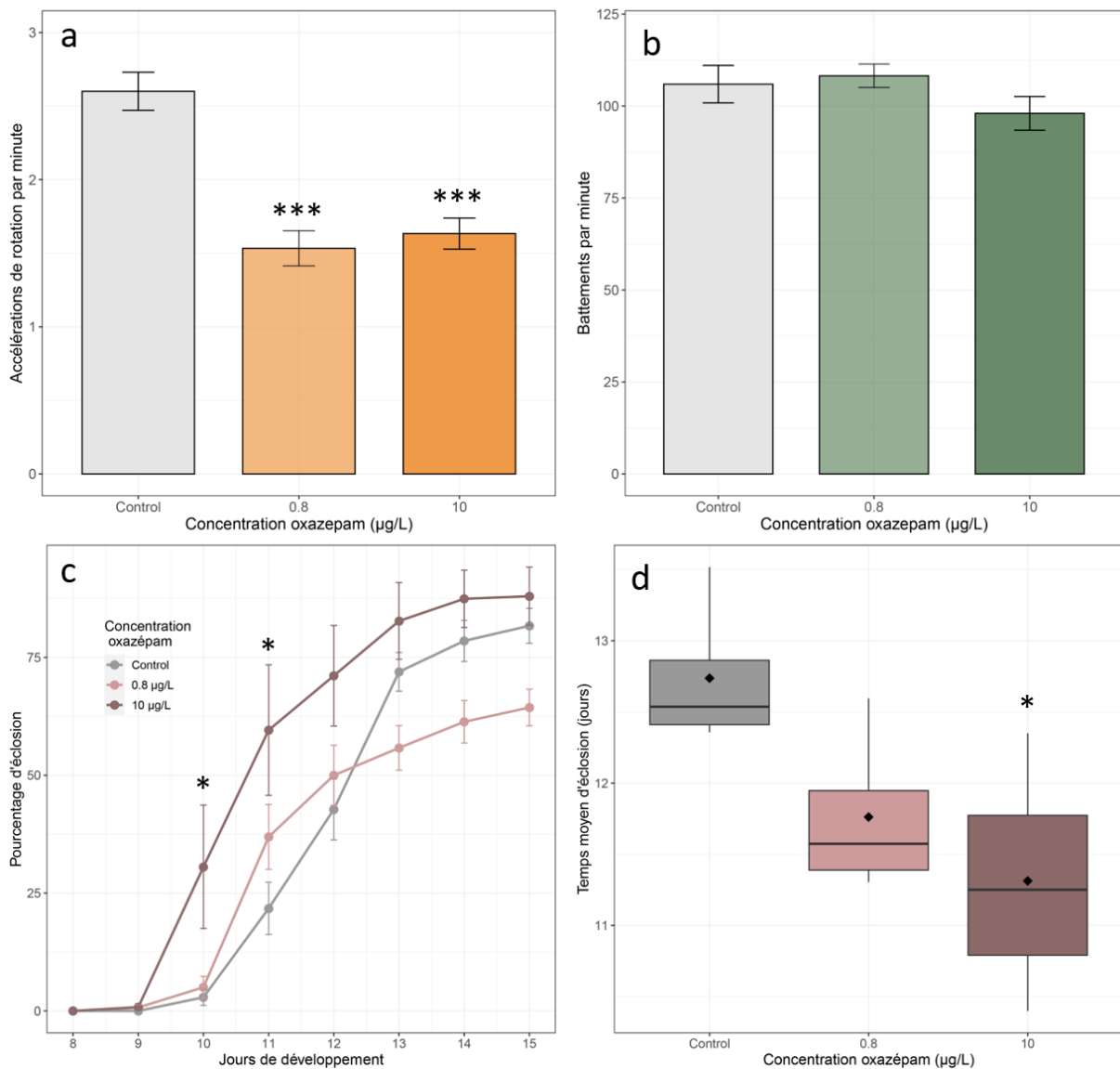


Figure 2-II-6 : Caractérisation des effets de l'oxazépam sur les embryons. a) Nombre d'accélérations de rotation par minute pour chaque condition d'exposition à l'oxazépam ($n=60$, moyenne \pm SEM). b) Fréquence cardiaque enregistrée pour chaque condition ($n=35$, moyenne \pm SEM). c) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J8 et J15 pour chacune des conditions ($n=4$, moyenne \pm SEM). d) Temps moyen d'éclosion (jours). Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. * : $P < 0,05$; *** : $P < 0,001$.

Les résultats de l'exposition menée en juin 2018 sur des embryons issus de géniteurs sauvages montrent une forte diminution du nombre d'accélérations de rotation des embryons exposés, quel que soit la concentration d'exposition, passant d'environ 2,5 à 1,5 accélérations par minute (Figure 2-II-6a). Concernant les battements cardiaques, aucun effet significatif n'est observé entre le témoin et les conditions d'exposition (Figure 2-II-6b). Enfin le taux d'éclosion des pontes exposées à 10 µg/L est plus important que celui des pontes témoins aux jours 10

et 11 (Figure 2-II-6c), ce qui se traduit par un temps moyen d'éclosion plus faible (11,3 jours contre 12,7 jours pour les témoins) (Figure 2-II-6d). Aucun effet sur l'apparition de malformations n'a été observé.

Cette analyse préliminaire présente le taux le plus élevé chez les contrôles, avec environ 2,5 accélérations de rotation par minute. Ces résultats sont assez surprenants en comparaison avec la caractérisation de ce paramètre réalisée en seconde partie de ce chapitre, puisque ce taux n'a jamais été atteint au cours des trois jours de suivi. Les accélérations de rotations n'ayant pas été filmées pour cette analyse préliminaire, il est malheureusement impossible de réanalyser ces données.

Concernant la méthodologie appliquée au cours de cette expérience préliminaire, il apparaît que plusieurs points méritaient d'être améliorés. Tout d'abord, il semblerait plus judicieux de réaliser un film des rotations embryonnaires afin de garder une trace et de pouvoir par la suite comparer les expériences entre elles. De plus, n'ayant pas de recul sur les effets de l'écrasement des gangues sur le rythme cardiaque, il semble préférable de ne pas intervenir sur les pontes lors du suivi cardiaque en les laissant en boîte de Pétri. Enfin, il sera préférable pour les expériences suivantes, de poursuivre le suivi d'éclosion quelques jours de plus afin de s'assurer que le plateau d'éclosion est bien atteint.

B) Comparaison des effets de l'oxazépam sur des embryons issus de géniteurs d'élevage et sauvages

1. Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de géniteurs d'élevage

Les effets de l'oxazépam sur les embryons issus de géniteurs d'élevage sont présentés en figure 2-II-7. Ces résultats seront mis en parallèle avec ceux concernant les effets sur les embryons issus de géniteurs sauvages, présentés en figure 2-II-8.

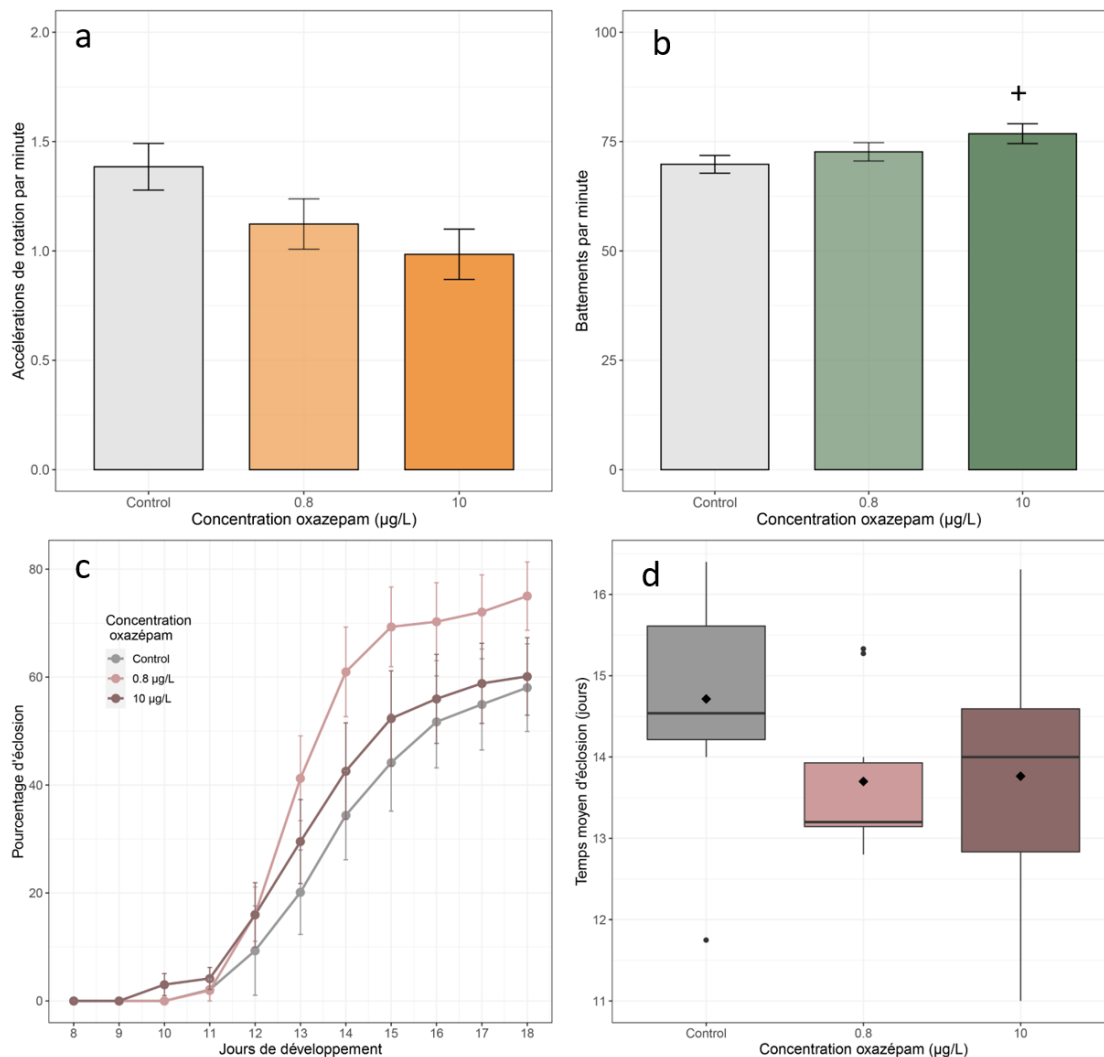


Figure 2-II-7 : Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de géniteurs d'élevage. a) Nombre d'accélérations de rotation par minute pour chaque condition d'exposition à l'oxazépam (n=65, moyenne ± SEM). b) Fréquence cardiaque enregistrée pour chaque condition (n=45, moyenne ± SEM). c) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J8 et J18 pour chacune des conditions (n=11, moyenne ± SEM). d) Temps moyen d'éclosion (jours). Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. + : $P < 0,1$.

Les résultats de l'exposition menée en janvier 2019 sur des embryons issus de géniteurs d'élevage ne mettent pas en évidence de perturbation du nombre d'accélérations de rotations pour les conditions exposées (Figure 2-II-7a). Il est important de noter que les témoins présentent une moyenne d'accélération (1,38 environ) proche de celle observée au cours de la caractérisation de ce paramètre au cours du temps. La fréquence cardiaque montre une tendance à l'augmentation à la concentration la plus élevée (Figure 2-II-7b). On peut également noter une fréquence cardiaque basale du groupe contrôle plus faible (70 bpm) que celle observée au cours de la caractérisation de ce paramètre au cours du temps (environ 90

bpm). Enfin, aucun effet significatif n'a été observé sur l'éclosion qui présente un taux d'éclosion de 58% chez les témoins (Figure 2-II-7c, Figure 2-II-7d), ni sur les malformations.

2. Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de géniteurs sauvages

Les résultats de l'exposition des embryons issus de géniteurs sauvages sont présentés en figure 2-II-8.

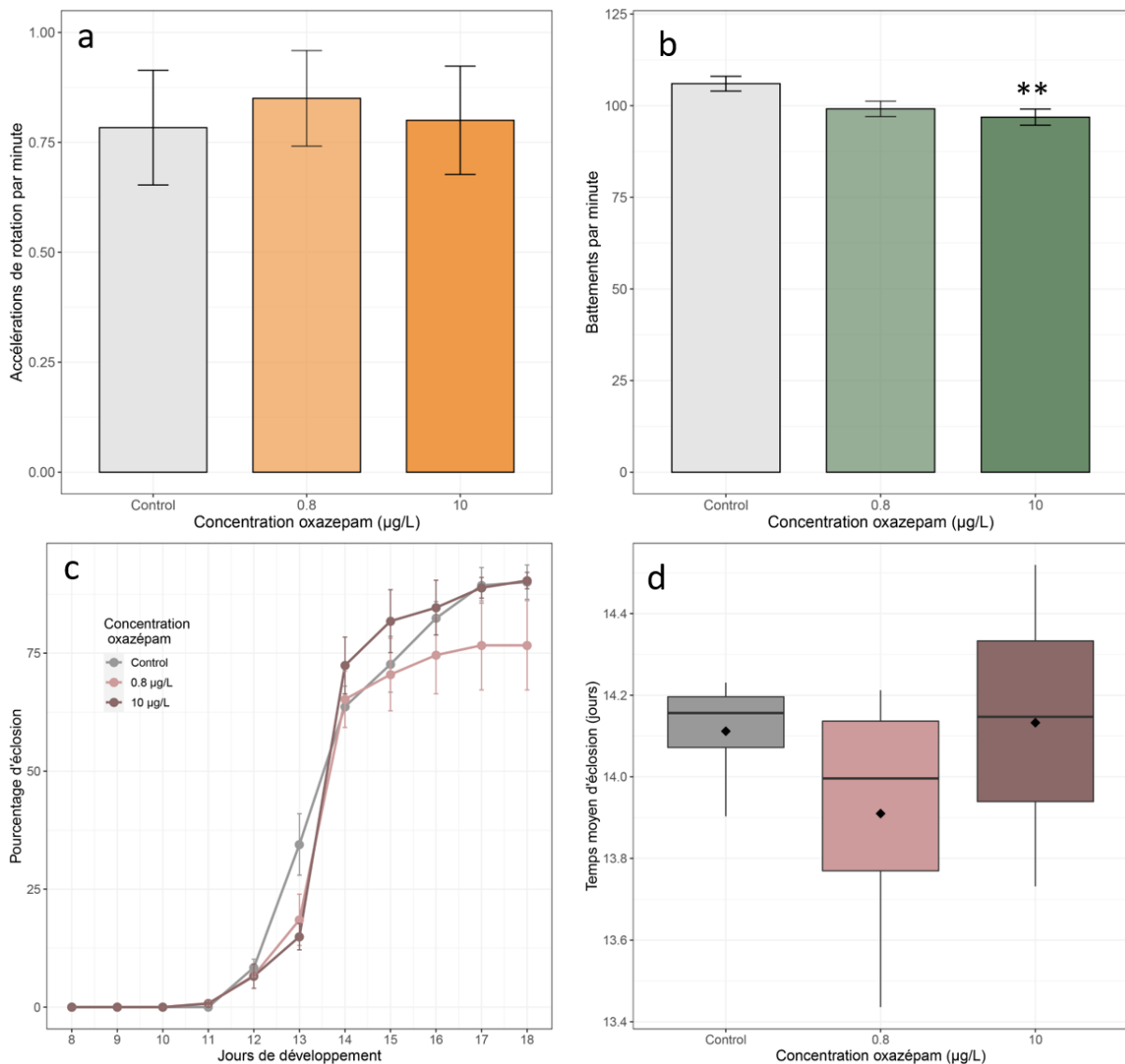


Figure 2-II-8 : Effets de l'oxazépam sur les embryons issus de géniteurs sauvages. a) Nombre d'accélérations de rotation par minute (moyenne ± SEM) pour chaque condition d'exposition à l'oxazépam (n=65). b) Fréquence cardiaque enregistrée pour chaque condition (n=45, moyenne ± SEM). c) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J8 et J18 pour chacune des conditions (n=11, moyenne ± SEM). d) Temps moyen d'éclosion (jours). Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. **: P < 0,01.

Les résultats de cette exposition, menée en juillet 2019 sur des embryons issus de géniteurs sauvages ne mettent pas en évidence d'effet significatif sur le nombre d'accélération de rotation (Figure 2-II-8a). En revanche, le niveau basal des rotations est beaucoup plus faible qu'au cours de l'expérience d'exposition des embryons issus de géniteurs d'élevage (0,78 accélérations de rotation contre 1,38 respectivement). Au cours de cette expérience, l'exposition des embryons à l'oxazépam provoque une diminution de la fréquence cardiaque des embryons à la concentration la plus élevée (Figure 2-II-8b). Il est à noter que la fréquence cardiaque basale est, au contraire de l'expérience précédente, plus importante (environ 106 bpm) que lors de la caractérisation de ce paramètre au cours du temps. Enfin, aucun effet n'a été observé sur l'éclosion (Figure 2-II-8c, Figure 2-II-8d), ni sur les malformations. On peut cependant noter que le taux d'éclosion chez les témoins est plus important (90%) que dans l'expérience précédente (58%).

3. Mise en parallèle des effets de l'origine des géniteurs sur la sensibilité des embryons

Afin d'avoir une vision globale de cette comparaison des deux populations, les taux de base des paramètres (moyenne des témoins \pm SEM) ainsi que les effets de l'oxazépam observés sont regroupés dans le tableau 2-II-1. Une comparaison statistique entre les témoins des deux populations a également été réalisée (Mann-Whitney) pour chacun des paramètres.

Tableau 2-II-1 : Tableau récapitulatif des taux de base (moyenne \pm SEM) pour chaque paramètre analysé et pour chaque population d'embryon. Les effets de l'oxazépam observés sont notés entre parenthèses. * : $P < 0,05$; *** : $P < 0,001$.

	Accélération de rotation	Battements cardiaques	Taux d'éclosion
Embryons issus d'élevage	1,38 (\pm 0,11)	70 (\pm 2) (\nearrow NS à 10 μ g/L)	58 % (\pm 8)
Embryons issus de sauvages	0,78 (\pm 0,13)	106 (\pm 2) (\searrow à 10 μ g/L)	90 % (\pm 4)
Comparaison statistique des deux populations (témoins)	***	***	*

Cette étude avait pour objectif d'observer les effets de l'oxazépam sur l'embryogénèse, tout en vérifiant que l'origine des géniteurs pouvait influencer la réponse des embryons. Il est cependant important de rappeler que, pour des raisons d'accessibilité des géniteurs (saison pour la récolte des sauvages, atteinte de la maturité sexuelle pour les géniteurs d'élevage), les deux expériences n'ont pu être réalisées à la même période. Cette mise en parallèle des deux études a tout d'abord permis de mettre en évidence, malgré des conditions d'expérimentations similaires, des taux de base variables d'une expérimentation à l'autre. En effet, malgré toutes les précautions prises pour avoir des embryons de stade similaires, il est surprenant d'observer une telle variation du taux d'accélérations entre les embryons contrôles des deux expériences. Cette observation a également été faite pour les battements cardiaques et pour les taux d'éclosion.

En ce qui concerne la sensibilité à l'oxazépam, il semblerait que les embryons issus de géniteurs sauvages soient plus sensibles à l'oxazépam, notamment en ce qui concerne les battements cardiaques. Cette sensibilité plus importante à l'oxazépam avait déjà été observée chez les poissons zèbres sauvages (Vossen et al., 2020b).

C) Effets d'une exposition parentale sur l'embryogénèse

Cette expérience, réalisée en novembre 2019 sur des embryons issus de géniteurs exposés, a permis de mettre en évidence une augmentation significative du nombre d'accélérations de rotations à la concentration la plus faible (0,8 µg/L) (Figure 2-II-9a). Le niveau basal des accélérations de rotations est encore plus faible que lors des précédentes (0,68 accélérations de rotation contre 1,38 et 0,78 pour les expérimentations sur embryons issus de géniteurs d'élevage et sauvages respectivement). La fréquence cardiaque ne semble pas impactée par l'exposition à l'oxazépam (Figure 2-II-9b) et la fréquence basale pour cette expérience est d'environ 73 bpm chez les contrôles, soit similaire à celle de l'étude des embryons issus de géniteurs d'élevage non exposés. Aucun effet sur l'éclosion (Figure 2-II-9c, 2-II-9d) ni sur les malformations n'est visible, malgré un taux d'éclosion faible chez les embryons exposés à 0,8 µg/L mais présentant une variabilité très importante.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'effet significatif observé sur les accélérations de rotation. La première serait l'action de l'oxazépam sur la voie de signalisation de ces accélérations. En effet, il n'a pas été démontré que le système gabaergique était fonctionnel

à ce stade de développement mais l'oxazépam pourrait potentiellement agir indirectement sur d'autres cibles sur les cellules ciliaires ou encore l'oxyde nitrique synthase (NOS) ou la protéine kinase-C (PKC) qui ont un rôle connu dans les rotations embryonnaires (Christopher et al., 1999; Cole et al., 2002). La seconde hypothèse pourrait être une modification de la structure de la gangue au moment de sa formation, due à l'exposition des géniteurs à l'oxazépam, ce qui entraînerait une perturbation des échanges gazeux au sein de l'œuf. En effet, Goldberg et al. (2008) ont émis l'hypothèse que les accélérations de rotation permettaient de stimuler les échanges gazeux et qu'elles étaient plus fréquentes en cas d'hypoxie. Il a également été montré qu'une exposition parentale au diazépam induisait une perturbation de la ventilation des rats nouveaux nés (da Silva et al., 2019). Il serait cependant nécessaire de reproduire cette expérience dans les mêmes conditions afin de vérifier ces résultats.

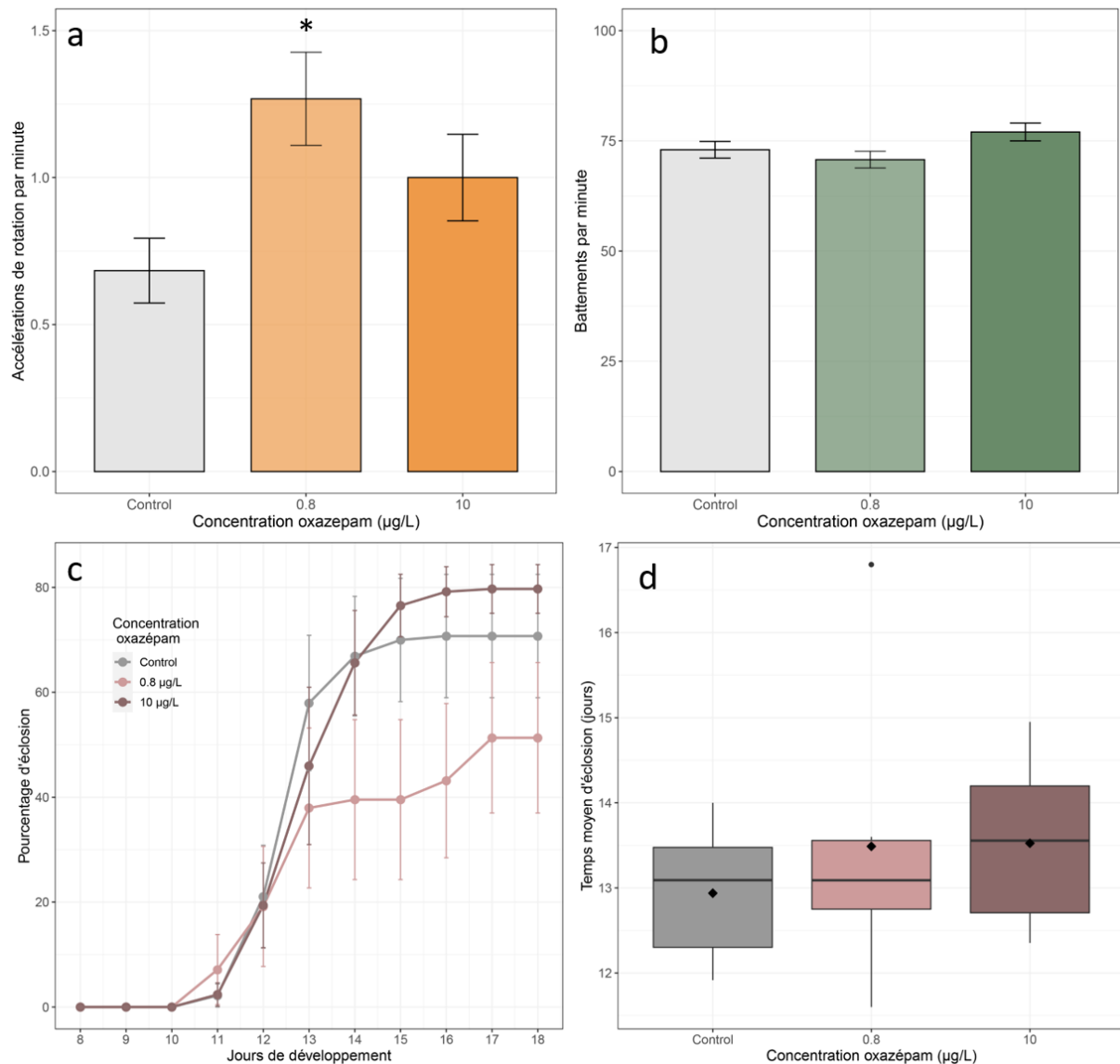


Figure 2-II-9 : Effets d'une exposition parentale sur l'embryogénèse. a) Nombre d'accélération de rotation par minute (moyenne ± SEM) pour chaque condition d'exposition à l'oxazépam (n=65). b) Fréquence cardiaque enregistrée pour chaque condition (n=45, moyenne ± SEM). c) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J8 et J18 pour chacune des conditions (n=11, moyenne ± SEM). d) Temps moyen d'éclosion (jours). Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale. * : $P < 0,05$.

D) Analyse globale des expositions menées sur les embryons de *R. balthica*

Cette étude multiple avait pour objectif de caractériser les effets de l'oxazépam sur l'embryogénèse de *Radix balthica*. Après avoir réalisé une étude préliminaire qui nous a permis de définir les meilleures conditions d'analyses des marqueurs suivis, trois études ont été réalisées. Pour les deux premières, le but était de vérifier si l'origine des géniteurs influençait la réponse des embryons face à la contamination à l'oxazépam. Enfin, la troisième

expérimentation avait pour but d'observer les potentiels effets d'une exposition parentale sur l'embryogénèse.

Un des points importants soulevé dans cet ensemble d'étude est la variabilité importante de certains paramètres entre les expériences. C'est notamment le cas des accélérations de rotation. Même si les trois expériences présentent des taux assez proches de ceux observés au cours de la caractérisation de ce paramètre, elles présentent entre elles de fortes disparités (du simple au double entre les contrôles des expériences 1 et 3). Ces disparités peuvent être dues à la variabilité entre les populations, mais également à un biais du manipulateur. En effet, même si le manipulateur est identique, les expérimentations ont été réalisées chacune à 6 mois de décalage et il est probable qu'un biais lié au comptage ait eu lieu, étant donné que l'analyse ne soit pas automatisée. Cependant, au sein de chaque expérimentation, les vidéos ont été traitées simultanément et ce biais n'est pas présent. En conclusion, du fait de l'importante variabilité de ce paramètre d'une expérimentation à l'autre, potentiellement due à sa trop grande sensibilité, il apparaît difficile de le proposer comme marqueur pouvant être couramment utilisé dans les tests embryotoxiques sur les gastéropodes. Les battements cardiaques présentent également une variabilité importante entre les expériences mais ils semblent tout de même être influencés par l'origine des géniteurs ; cette hypothèse restant cependant à confirmer par des études complémentaires.

Enfin, en ce qui concerne l'éclosion, nous avons également pu observer une importante variabilité entre les expériences, principalement liée à la variabilité inter-ponte. Seule l'analyse préliminaire a mis en évidence un effet de l'oxazépam sur l'éclosion, effet qui n'a pas été retrouvé au cours des autres expériences. Ces données soulèvent la question de la reproductibilité pour ce paramètre pourtant largement utilisé dans les études écotoxicologiques. La solution serait peut-être de réaliser le suivi sur un plus grand nombre de pontes, afin de réduire la variabilité.

Concernant les effets de l'oxazépam, l'étude comparative sur l'origine des géniteurs aurait tendance à montrer une sensibilité plus importante des embryons issus de géniteurs sauvages vis-à-vis de l'oxazépam. Cependant, ces deux études n'ayant pas été réalisées à la même période, il est difficile de tirer des conclusions. Il serait nécessaire de réaliser une véritable étude comparative pour valider ces résultats. L'exposition parentale à l'oxazépam a par

ailleurs montré un effet sur les accélérations de rotations. Cependant, comme décrit précédemment, du fait de la forte variabilité de ce paramètre, il nous est difficile d'en tirer des conclusions.

V - Etude des fenêtres de sensibilité des embryons face à l'oxazépam

L'exposition des embryons de manière ponctuelle à 10 µg/L n'a pas d'impact sur le taux d'éclosion. Comme nous l'avons observé lors de l'expérience avec les géniteurs sauvages ou d'élevage, une exposition en continu depuis la formation de l'œuf jusqu'à l'éclosion n'a pas permis de mettre en évidence un effet significatif sur l'éclosion (Figure 2-II-10). Le temps moyen d'éclosion des embryons non exposés est de 13,5 jours en moyenne et le taux d'éclosion est de 78% à 18 jours. En fonction des conditions d'exposition, les temps moyens d'éclosion varient entre 13,7 et 14,6 jours mais aucune différence significative n'est observée. Les taux d'éclosion varient entre 73% et 92,3%, sans différence significative avec la condition témoin.

Cette étude semble donc confirmer l'absence d'effet de l'oxazépam sur l'éclosion des embryons de *R. balthica*, observés lors des études précédentes (effets de l'origine des géniteurs et effets d'une exposition parentale).

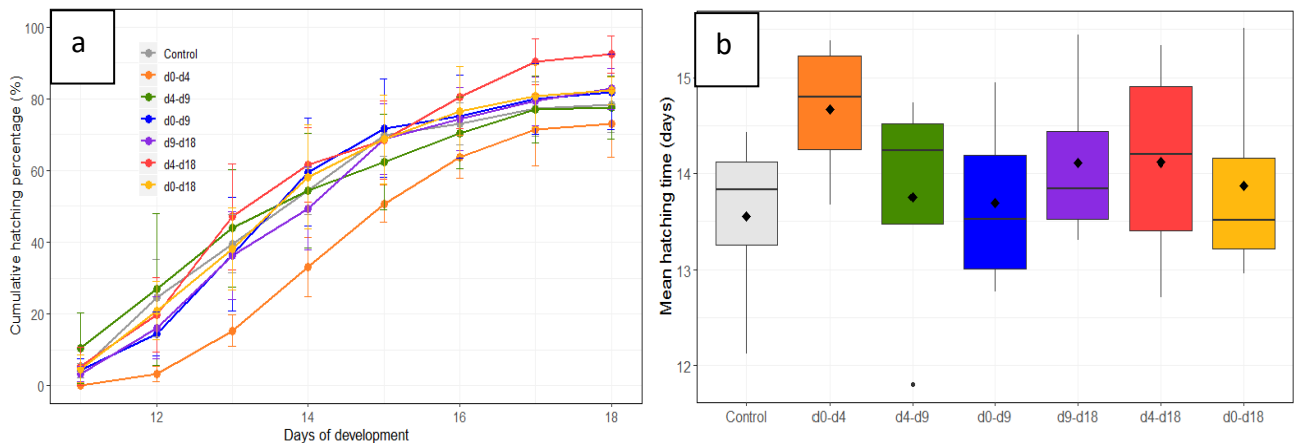


Figure 2-II-10 : Etude des fenêtres de sensibilité des embryons face à l'oxazépam. a) Pourcentage d'éclosion cumulé entre J11 et J18 pour chacun des types d'exposition (n=4). b) Temps moyen d'éclosion (jours) pour chacun des types d'exposition. Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale.

VI - Effets de l'oxazépam sur l'expression de gènes impliqués dans la signalisation calcique, l'interaction cellule/MEC et la détoxification

L'analyse des données transcriptomiques a montré que cette stratégie de travailler en individuel avait ses limites. Sur les 95 gènes testés, seuls une vingtaine sont analysables pour le stade pré-éclosion et une quarantaine pour le stade post-éclosion. Cette variation d'expression non-analysable pour de nombreux gènes s'explique en partie par la faible quantité d'ARN de départ, puisque nous avons fait le choix de travailler au niveau individuel et non en pool d'embryons. Cette méthode a conduit à avoir une expression en dessous du seuil de détection pour les gènes faiblement exprimés. Les gènes analysables sont donc uniquement les gènes suffisamment exprimés pour être visibles.

Parmi la vingtaine de gènes analysables au stade pré-éclosion, une dizaine présente des expressions variables d'une condition à l'autre. Les résultats montrent que suite à l'exposition à 10 µg/L, quelques gènes susceptibles d'être impliqués dans la biominéralisation, la signalisation et la différenciation cellulaire ainsi que dans le métabolisme des lipides sont surexprimés (Figure 2-II-11a). Ainsi, le gène de l'otopétrine présente une surexpression à 10 µg/L d'oxazépam, ce qui est cohérent avec l'étude de Mazzitelli et al. (2017) réalisée par RNAseq en différentiel sur des embryons de *R. balthica* tout juste éclos. Cependant, il est à noter que les embryons étaient exposés à 0,8 µg/L et non 10 µg/L d'oxazépam. Une étude de qPCR, en cours de publication au laboratoire a confirmé cette surexpression de l'otopétrine à 0,8 et 10 µg/L. Chez les vertébrés, l'otopétrine est nécessaire à la formation des otolithes et son rôle a été démontré dans la régulation du calcium ainsi que dans la régulation du métabolisme énergétique en réduisant l'inflammation des tissus adipeux (Hughes et al., 2007; Wang et al., 2014). Le gène de la calmoduline présente également une surexpression après exposition des embryons à 10 µg/L d'oxazépam. La calmoduline est une protéine capable de fixer 4 ions Ca²⁺ et joue un rôle important dans la signalisation cellulaire (Wang and Waisman, 1979). La calmoduline jouerait également un rôle dans la stimulation ciliaire induite par l'acétylcholine (Woodward and Willows, 2006; Zagoory et al., 2001). Il a également été montré que les benzodiazépines pouvaient se lier à la calmoduline, qui permettrait une régulation au niveau du récepteur, notamment lors d'administrations chroniques de psychotropes

(Lejoyeux and Maziere, 1991; Weiss et al., 1980). Le gène *neurogenic locus notch*, également connu sous le nom NOTCH est également surexprimé à 10 µg/L. Ce résultat est en contradiction avec l'étude de RNAseq en différentiel menée par Mazzitelli et al. (2017) qui avaient montré au contraire, une sous expression de 5 gènes impliqués dans la voie Notch après exposition à 10 µg/L d'oxazépam. L'analyse complémentaire par qPCR en cours de publication par le laboratoire confirme également cette sous expression. Cette différence pourrait potentiellement s'expliquer par les différences de conditions d'exposition des embryons entre les études. En effet, Mazzitelli et al. (2017) ont fait le choix d'exposer les embryons hors de leur gangue, ce qui est connu pour les rendre plus sensibles aux modifications extérieures (Liu et al., 2013). La surexpression du gène de la caluménine après exposition à 10 µg/L est en contradiction avec l'étude de Mazzitelli et al. (2017) qui avait montré, au contraire, une sous expression à la même concentration. Comme pour le gène *neurogenic locus notch*, cette différence peut s'expliquer par les différentes conditions d'exposition des embryons entre les deux études. La caluménine est une protéine du réticulum endoplasmique permettant le repliement des protéines. Sa structure « EF-hand » lui permet de lier les ions Ca^{2+} (Yabe et al., 1997). Enfin, le gène codant le facteur de transcription *myocyte enhancer factor-2C* (MEF-2C) présente également une surexpression à la plus forte concentration d'oxazépam. Les protéines de la famille MEF-2 sont connues chez les vertébrés pour être impliquées, entre autre, dans la myogénèse, notamment du coeur (Black and Olson, 1998; Yabe et al., 1997). Il a enfin été montré chez la drosophile qu'une synergie pouvait apparaître entre MEF-2 et NOTCH, influençant la prolifération cellulaire et les métastases (Pallavi et al., 2012). Ces deux gènes étant surexprimés à 10 µg/L, il se pourrait qu'une telle synergie ait lieu chez les embryons de *Radix balthica*. Le seul gène différentiellement sous-exprimé entre le témoin et les conditions d'exposition est le gène de la Glutathion-S-Transférase (GST) oméga. Les GST sont des enzymes de biotransformation de phase II dont la fonction est de conjuguer le glutathion réduit à des xénobiotiques pour faciliter leur excrétion. Les GST omega, possèdent un résidu cystéine sur le site actif qui leur permet de catalyser des réactions de réductions qui ne sont pas catalysées par les autres GST. Une perturbation de l'expression des GST pourrait retarder l'excrétion de l'oxazépam, et donc augmenter la bioconcentration. Il a déjà été montré une diminution globale de la réponse du stress oxydant chez le poisson moustique (*Gambusia holbrooki*) après exposition au diazépam (Nunes et al., 2008). Au contraire, l'étude de Brandão et al. (2013) a montré une augmentation

de l'activité de la GST après exposition de perches soleil (*Lepomis gibbosus*) à la même molécule. Ces différences peuvent être liées à la variabilité de réponses entre espèces. Cependant, ces résultats concernent l'activité globale des GST, ce qui est plus représentatif que nos résultats d'expression de gènes.

En ce qui concerne le stade post-éclosion, on peut noter un effet de l'oxazépam sur l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion, la migration et la respiration cellulaire et dans la détoxification (Figure 2-II-11b). Le gène contenant le domaine FAS1/BIgH3 présente une sous-expression à 0,8 µg/L. Le domaine FAS1/BIgH3 est connu pour jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire, notamment via les intégrines (Park et al., 2009). Le gène codant Mig17 présente une sur-expression après exposition des embryons à 0,8 µg/L d'oxazépam. La protéine Mig17 appartient à la famille de métalloprotéases ADAM, et joue un rôle important dans la matrice extracellulaire (MEC), plus particulièrement dans la migration cellulaire (Nishiwaki, 2001). Le gène de l'ATP synthase, impliqué dans la respiration cellulaire, présente quant-à lui une sur-expression significative à 10 µg/L. Aucun lien n'a encore été établi entre cette protéine et les benzodiazépines. Enfin, quatre gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification présentent des modifications d'expression à 0,8 µg/L. Deux GST (GST 3 et GST oméga) et un cytochrome (CyP450 2U1) sont sur-exprimés tandis que le gène du cytochrome P450 3A56 présente une sous-expression. Il a déjà été montré qu'une exposition à des effluents d'hôpitaux contenant un mélange de psychotropes, induisait une augmentation de l'activité des GST et d'EROD chez la corbicule, ainsi qu'une surexpression du *cyt4* (Bonnafé et al., 2015; Mohamed et al., 2017). L'ensemble de ces résultats montre une perturbation du système de détoxification en présence de psychotropes, et notamment d'oxazépam.

En bilan de cette étude transcriptomique, nous avons pu observer une sur-expression de nombreux gènes impliqués dans la signalisation calcique au stade pré-éclosion (otopétrine, calmoduline, caluménine). La voie de signalisation Notch pourrait également être impactée suite à une surexpression du gène *notch* à 10 µg/L au stade pré-éclosion. Enfin, deux gènes en lien avec l'interaction cellules/MEC sont surexprimés à 0,8 µg/L au stade post-éclosion. Les gènes impliqués dans la fonction de détoxification paraissent plus modulés au stade post-éclosion que pré-éclosion, ce qui suggère une activation plus importante des mécanismes de défense lorsque l'embryon n'est plus protégé de son enveloppe ni de la gangue gélatineuse.

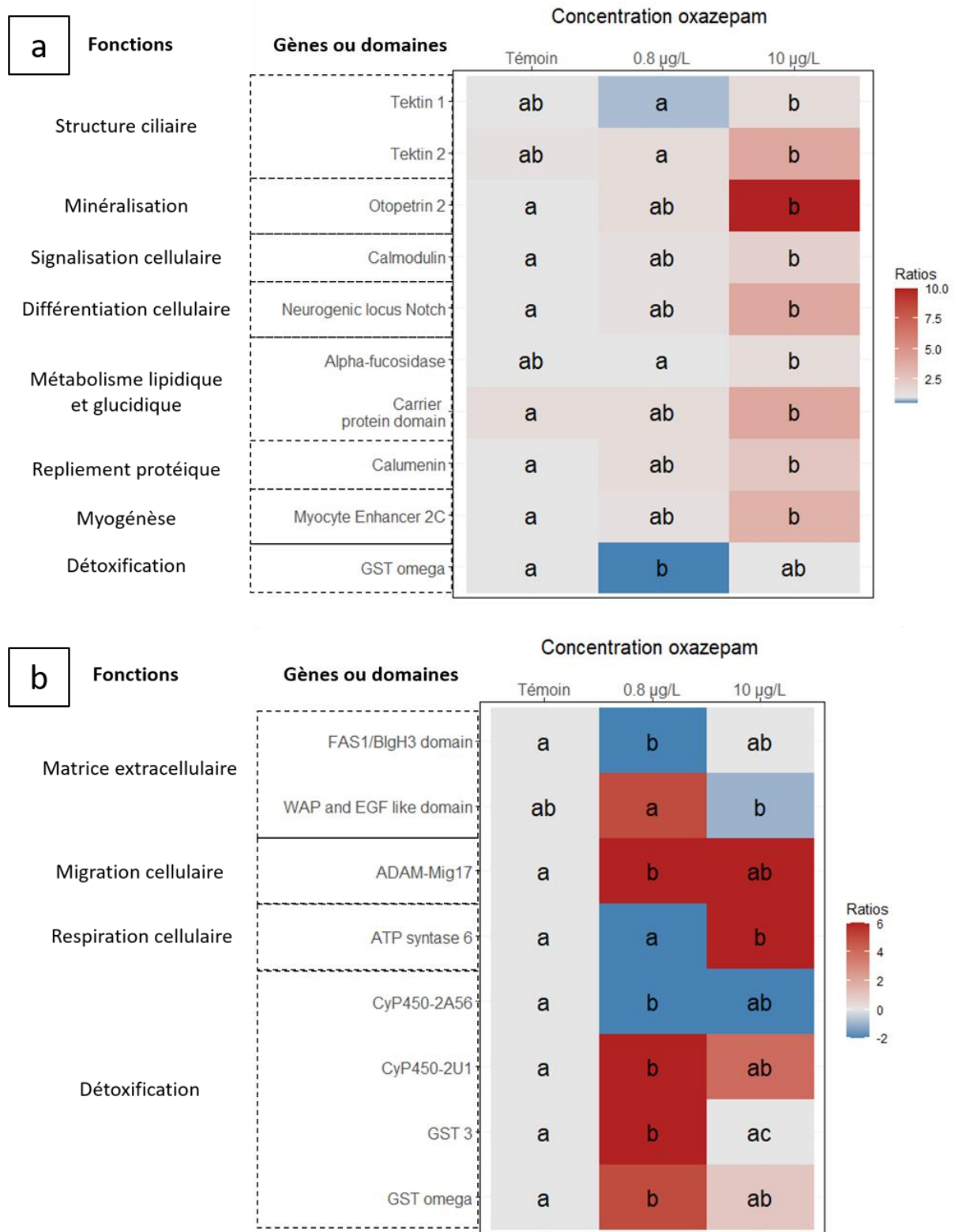


Figure 2-II-11 : Heatmap montrant les niveaux d'expression aux stades a) pré-éclosion et b) post-éclosion pour chaque gène et pour chaque concentration d'oxazépam, normalisés par rapport aux niveaux d'expression du gène de référence (RPL18). Les gradients de couleurs du bleu au rouge représentent les sous et sur-expression respectivement. Les lettres correspondent aux différences significatives entre les conditions. Statistiques : test de comparaison multiple de Kruskal-Wallis dans le cadre de données ne suivant pas la loi Normale, ANOVA et test post hoc de Tukey HSD dans le cadre de données suivant la loi Normale.

VII - Conclusion

Cet ensemble d'études mené sur le stade embryonnaire avait pour objectifs de i) déterminer l'impact d'une exposition à l'oxazépam sur le développement embryonnaire, ii) apporter des éléments de réponses quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse à l'exposition au psychotrope et iii) caractériser de potentiels nouveaux biomarqueurs d'embryotoxicité chez *Radix balthica*.

La caractérisation temporelle des deux paramètres physiologiques (accélérations de rotation et battements cardiaques) a mis en évidence une variabilité importante des accélérations de rotation au cours du temps et notamment en fonction du stade de développement, tandis que les battements cardiaques semblent être plus stables dans le temps. La variabilité des accélérations s'est retrouvée au moment des tests embryotoxiques pour lesquels les différentes expérimentations présentaient chacune un niveau basal d'accélération différent. Cette différence observée peut être effectivement due à la variabilité intrinsèque à ce paramètre physiologique, mais également à la variabilité inter-populationnelle puisque les expérimentations ont été réalisées sur des populations différentes. Quant aux battements cardiaques, ils semblent être influencés par l'origine des géniteurs, cette hypothèse restant cependant à confirmer par des études complémentaires.

La variabilité des paramètres physiologiques rend difficile l'analyse des effets de l'oxazépam sur l'embryogénèse. Cependant, on peut tout de même noter que les embryons issus de géniteurs sauvages semblent plus sensibles que les embryons issus de géniteurs d'élevage.

L'analyse des données transcriptomiques, bien que limitée aux seuls gènes suffisamment exprimés, révèle une modulation de l'expression de gènes impliqués dans la signalisation calcique avant l'éclosion et de ceux impliqués dans la voie Notch et la détoxification au stade post-éclosion. Ces perturbations pourraient avoir des répercussions notamment au niveau de la transmission nerveuse (relayée par la signalisation calcique) mais également au niveau de la différenciation cellulaire, pouvant provoquer des anomalies de développement. De manière à prendre en compte la réponse de plus de gènes, il serait plus judicieux, pour les prochaines analyses, de pooler les embryons, comme cela avait été le cas pour la thèse de J-Y Mazzitelli.

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et
modifications moléculaires chez *R. balthica*
juvéniles après exposition à de faibles
concentrations d'oxazépam

Synthèse

La période de croissance est une étape importante du cycle de la vie des organismes. Elle suit l'organogénèse et permet notamment aux individus d'atteindre une taille permettant la reproduction. L'impact des anxiolytiques n'a jamais été évalué sur ce stade de vie. Ainsi, l'objectif de ce chapitre est d'évaluer les effets de l'oxazépam sur la croissance du gastéropode *Radix balthica*, en analysant des paramètres physiologiques (croissance en taille, prise alimentaire, mortalité) comportementaux (locomotion) et moléculaires.

L'exposition des juvéniles a été réalisée durant 4 semaines à deux concentrations : 0,8 et 10 µg/L. Afin de réaliser un suivi individuel tout au long de l'expérimentation, les juvéniles ont été exposés dans un système d'encagement individuel partiellement immergé en aquarium. Deux fois par semaine, la taille de la coquille a été mesurée et un suivi de la prise alimentaire est réalisé grâce à un calcul d'aire de pastilles de salade consommée. Un suivi de la locomotion a été réalisé sur ces mêmes individus, à la même fréquence que les autres paramètres. Enfin, à l'issue des quatre semaines d'exposition, 16 individus (8 individus ayant subis les tests de locomotion et 8 individus ne les ayant pas subis) ont été sacrifiés pour l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans le système nerveux, la digestion ou encore la détoxification (Figure 2-III-1).

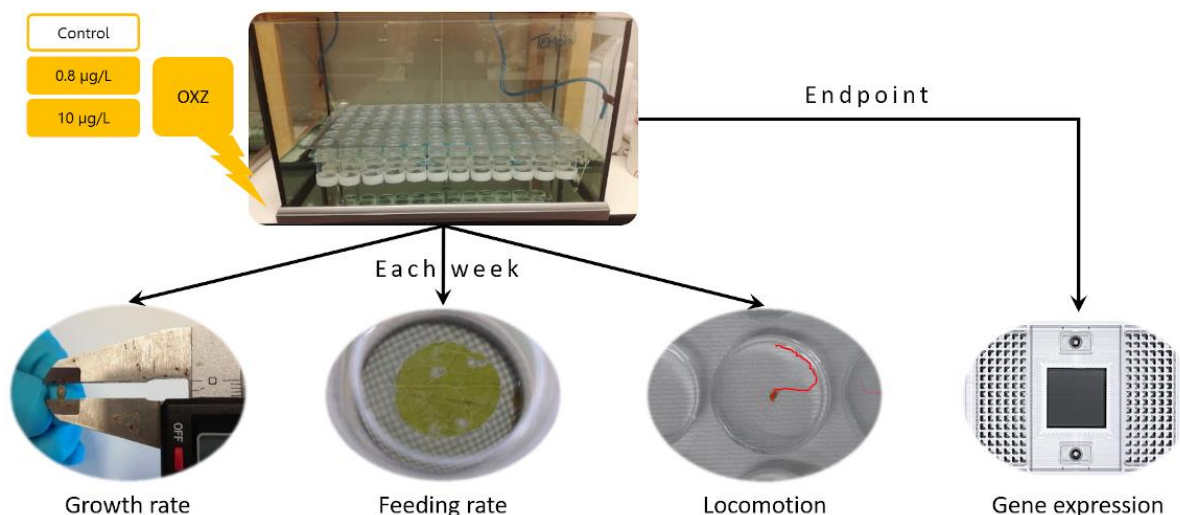


Figure 2-III-1 : Schéma récapitulatif des paramètres analysés au cours de l'expérimentation sur les juvéniles.

Les résultats de cette analyse ont tout d'abord démontré que la plus faible concentration d'oxazépam induisait une réduction de la mortalité totale des juvéniles. Une perturbation de la prise alimentaire a également été observée. En effet, à faible concentration (0,8 µg/L) et à court terme (la première semaine), la molécule d'oxazépam induit une stimulation de la prise alimentaire tandis qu'à forte concentration (10 µg/L), une inhibition est observée sur le long terme (les deuxième, troisième et quatrième semaines). La croissance et la locomotion ne semblent pas avoir été impactées par l'exposition à l'anxiolytique. L'analyse transcriptomique ciblée a tout d'abord permis de mettre en évidence une sous-expression globale de gènes impliqués dans la régulation nerveuse de grandes fonctions telles que l'alimentation, la digestion ou encore la locomotion après exposition des juvéniles à l'oxazépam. Cette analyse a également révélé une grande variabilité de la réponse moléculaire des individus en fonction de leur passé d'exposition. En effet, comme indiqué précédemment, les individus ayant été laissés dans leur système d'exposition durant toute la durée de l'expérimentation présentent une sous-expression globale des gènes du système nerveux. Au contraire, les individus exposés dans les mêmes conditions mais ayant subi des tests de locomotion répétés tout au long de l'exposition présentent quant à eux une sur-expression globale de gènes impliqués dans le système nerveux et la digestion ; les gènes différenciellement exprimés étant différents entre les deux cohortes. L'ensemble de cette étude nous a permis de définir le suivi de mortalité et la prise alimentaire comme les marqueurs les plus pertinents dans le cadre de cette exposition.

Article 2 : Low concentrations of oxazepam induce feeding and molecular changes in *Radix balthica* juveniles

Morgane Lebreton^{1*}, Sacha Sire¹, Jean-Luc Carayon¹, Jean-Michel Malgouyres¹, Caroline Vignet¹, Florence Géret^{1,‡}, and Elsa Bonnafé^{1,‡}

¹ *Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Albi, France.*
E-mail addresses : lebreton.morgane.35@gmail.com (M. Lebreton), sachasire@outlook.fr (S. Sire), jean-luc.carayon@univ-jfc.fr (J-L. Carayon), jean-michel.malgouyres@univ-jfc.fr (J-M. Malgouyres), caroline.vignet@univ-jfc.fr (C. Vignet), florence.geret@univ-jfc.fr (F. Géret), elsa.bonnafe@univ-jfc.fr (E. Bonnafé).

‡ These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author. Address: Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Place de Verdun, 81 012 Albi, France. Tel.: +33 563481700; E-mail address: lebreton.morgane.35@gmail.com (M. Lebreton).

Article publié dans le journal Aquatic Toxicology (2021), Volume 230
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105694>

Abstract

Psychotropics, especially benzodiazepines, are commonly prescribed worldwide. Poorly eliminated at wastewater treatment plants, they belong to a group of emerging contaminants. Due to their interaction with the GABA_A receptor, they may affect the function of the nervous system of non-target organisms, such as aquatic organisms. The toxicity of oxazepam, a very frequently detected benzodiazepine in continental freshwater, has been largely studied in aquatic vertebrates over the last decade. However, its effects on freshwater non-vertebrates have received much less attention. We aimed to evaluate the long-term effects of oxazepam on the juvenile stage of a freshwater gastropod widespread in Europe, *Radix balthica*. Juveniles were exposed for a month to environmentally-relevant concentrations of oxazepam found in rivers (0.8 µg/L) and effluents (10 µg/L). Three main physiological functions were studied: feeding, growth, and locomotion. Additionally, gene expression analysis was performed to provide insights into toxicity mechanisms. There was a strong short-term activation of the feeding rate at low concentration, whereas the high dose resulted in long-term inhibition of food intake. A significant decrease in mortality rate was observed in juveniles exposed to the lowest dose. Shell growth and locomotor activity did not appear to be affected by oxazepam. Transcriptomic analysis revealed global over-expression of genes involved in the nervous regulation of the feeding, digestive, and locomotion systems after oxazepam exposure. The molecular analysis also revealed a possible interference of animal manipulation with the molecular effects induced by oxazepam exposure. Overall, these results improve our understanding of the effects of the psychoactive drug oxazepam on an aquatic mollusc gastropod.

Keywords: pond snail, oxazepam, benzodiazepine, feeding rate, gene expression

I - Introduction

Psychoactive drugs, such as antidepressants, antiepileptics, and anxiolytics are widely prescribed and consumed. Conventional wastewater treatment plants (WWTPs) are unable to completely eliminate these compounds and they persist in the environment (Cunha et al., 2017; Hummel et al., 2006). These molecules have thus been considered to be emerging contaminants over the last several years. Among psychotropic drugs, benzodiazepines are generally used as nervous-system inhibitors to treat anxiety, insomnia, and epilepsy (Argyropoulos and Nutt, 1999). Indeed, they are agonists of gamma-aminobutyric acid (GABA) that bind to GABA_A receptors, keeping chloride-ion channels open and leading to membrane hyperpolarization of neural cells.

Among benzodiazepines, oxazepam is ranked among the 20 molecules showing the highest hazardous quotient (Orias and Perrodin, 2014). Indeed, it is a metabolite of other benzodiazepines (diazepam, nordazepam, and lorazepam) that are among the most highly consumed worldwide (Kosjek et al., 2012). Moreover, oxazepam is very poorly removed by WWTPs, and is frequently present at detectable levels (Cunha et al., 2017; Fick et al., 2017). It is commonly measured at concentrations of hundreds of ng/L in WWTP effluents (Calisto and Esteves, 2009; Cunha et al., 2017) and tens of ng/L in rivers (Fick et al., 2017; Hummel et al., 2006), but a recent study reported its presence at concentrations of up to 7.4 µg/L in WWTP effluents and 0.8 µg/L in a French river (Mazzitelli et al., 2018). Studies have also highlighted its resistance to photodegradation and its persistence in lake sediments in an unchanged form for at least 40 years (Calisto et al., 2011; Klaminder et al., 2015). Oxazepam thus requires monitoring because of its persistence in the environment, with high levels of bioaccumulation in aquatic organisms (Lagesson et al., 2016), and potential long-term effects on aquatic fauna.

Despite these data, ecotoxicological studies are scarce and most concern the bioaccumulation and impact of oxazepam on the development and behaviour of various species of fish. In fish, the highest concentrations in adults have been found in the brain, plasma, and liver (Huerta et al., 2016), whereas bioaccumulation is weak in embryos (Granger Joly de Boissel et al., 2017). Heynen et al. (2016) showed that the bioconcentration negatively correlates with the weight of perch. In terms of its impact, oxazepam exposure on Japanese medaka and Eurasian

perch causes spinal and cardiac malformations of embryos, delayed growth, and decreased mortality (Granger Joly de Boissel et al., 2017; Klaminder et al., 2014). It also has effects on behaviour, causing erratic swimming in medaka embryos, stimulating post-hatching and adult activity, increasing boldness and feeding rate in perch and roach, and disrupting migration behaviour in salmon (Brodin et al., 2017, 2013; Granger Joly de Boissel et al., 2017; Hellström et al., 2016; Klaminder et al., 2014; Saaristo et al., 2019). Nevertheless, Sundin et al. (2019) showed that these effects can be alleviated after a depuration phase.

Knowledge of the toxicity of oxazepam for invertebrates is limited. Garcia-Galan et al. (2017) reported a decrease of the mortality in the crustacean *Gammarus fossarum*, with a high level of bioaccumulation, and an increase in activity and distance travelled has been observed in the crayfish (*Procambarus virginalis*) (Kubec et al., 2019).

Because of their benthic habitat, primary consumer status, and widespread presence in continental surface waters (Seddon et al., 2014), the use of freshwater gastropods as a reference organism in ecotoxicology has been suggested (Amorim et al., 2019; Tallarico, 2016). The ecotoxicological response of these organisms is beginning to be understood, especially after heavy-metal and pesticide exposure (Bouétard et al., 2013; Cœurdassier et al., 2003; Coutellec et al., 2013; Das and Khangarot, 2011; Gupta and Singh, 2011). The effects of pharmaceuticals, in particular psychoactive drugs, are however not well documented. Pond snails are particularly amenable to studying the effects of exposure to psychoactive drugs, as their behaviour and nervous system are well characterized (Benjamin, 2012; Kodirov, 2011; Syed and Winlow, 1991), providing a great advantage for the understanding of toxicity mechanisms. The knowledge of such toxicity mechanisms can now be studied in more detail as the *de novo* transcriptome of *Radix balthica* has been obtained from juveniles exposed to oxazepam (Mazzitelli et al., 2017).

In this context, it is relevant to advance studies of oxazepam adverse effects on the freshwater gastropod *R. balthica*, which we have used over the last few years as a laboratory model to evaluate the effect of various psychoactive drugs (Mazzitelli et al., 2017). We aimed to evaluate the toxicity of oxazepam on the juvenile stage of *R. balthica* and gain insight into the mechanisms of toxicity by combining complementary physiological, behavioral and molecular

approaches. The physiological and behavioral approaches focused on three important endpoints: feeding, growth, and locomotion, and the molecular approach targeted genes involved in these three functions, as well as other systems, such as detoxification. This study is one of the first long-term analyses of both the physiological and molecular aspects of oxazepam exposure on a freshwater invertebrate.

II - Materials and methods

A) Test organisms

Radix balthica (Linnaeus, 1758) genitors were sampled from the bank of the Garonne river (France) (GPS coordinates: 44.139933, 0.758923, pH: 7.9, water temperature: 15.3°C). We placed 75 genitors in each 50 L aquarium. These individuals were allowed to acclimate for a period of two weeks in a controlled-temperature chamber ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), in ISO 6341: 2012 water (64 mg/L NaHCO_3 ; 294 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 63 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6 mg/L KCl) (OECD, 2016a). Egg masses were collected with a blade and placed in glass jars until hatching. We then placed 25 to 30 newly hatched juveniles in each of six glass jars containing 200 mL ISO water. The jars were incubated under a 16 h light: 8 h dark photoperiod, at a constant temperature of $21 \pm 1^\circ\text{C}$ for two months. The water was renewed weekly and the juveniles were fed boiled organic lettuce *ad libitum* for better assimilation.

B) Experimental design

Oxazepam (CAS No 604-75-1, Log KoW: 2.31, solubility in water: 20 mg/L (Yalkowsk and He, 2003)) was purchased from Alsachim (Illkirch Graffenstaden, France, purity > 98%). A 1 mg/L stock solution was prepared in ISO 6341 water, sonicated for 1 h, filtered on a 0.47 μm PTFE filter, the concentration measured, and solution stored at 4°C. For each concentration, 40 juveniles (two months old) were placed in an exposure system that allowed individual monitoring throughout the experiment. The exposure system consisted of a plexiglas slab mounted on feet and drilled with holes. Tubes with a grid at the bottom were inserted into each hole. Each individual had 57 cm^3 of volume available. Each system was covered with a wire mesh to avoid escape of the animals. The exposure system was then partially submerged in an aquarium containing 16 L ISO 6341 water supplied with bubbling air on both sides of the

aquarium. Three experimental conditions were assessed, a control (ISO water) and two oxazepam concentrations, consisting of a 'low' (0.8 µg/L) and 'high' (10 µg/L) concentration. At the beginning of the experiment, snails of similar size were evenly distributed between concentrations (control: 4.4 ± 0.5 mm, 0.8 µg/L: 4.6 ± 0.6 mm, 10 µg/L: 4.5 ± 0.5 mm). Individuals were exposed for 28 days in a light/dark cycle of 16/8 h at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and the culture medium was entirely renewed weekly. Water was sampled to assess the stability of the oxazepam over time. General parameters of the water (temperature, pH, conductivity) were monitored twice a week. Twice a week, mortality was assessed and the shell length was measured from the aperture to the apex, with a calliper (± 0.03 mm). The growth rate was calculated as the weekly gain in length (in mm).

C) Chemical analysis

For each concentration, four water samples were taken (two samples after two weeks and two samples after three weeks of exposure) immediately after renewal of the medium (day 0) and four samples were collected at the same time points but after seven days of exposure in the aquarium (day 7). The samples were stored at -20°C until analysis. For each sample, 200 mL acidified water (pH 2) was extracted on a SPE Strata C18-E column, 1 g/6 mL (Phenomenex, Le Pecq, France). Columns were then rinsed with 4 mL deionized water (pH 2) and dried for 4 h in a laboratory oven at 45°C . Components were eluted with 4 mL hyper-grade methanol for LC/MS (Merk, Molsheim, France). The extract was then dried with a stream of nitrogen and reconstituted with 200 µL methanol. Analysis was performed with a Spectra system (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) equipped with a Spectra system UV8000 detector (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) and a Venusil XBP 5 µm C18 (4.6 x 250 mm) capillary column (Agela Technologies, Torrance, USA). The solvents were A) water + 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) and B) ACN + 0.05% TFA and the elution gradient was (t in min): t₀, B = 30%; t₁₁, B = 100%; t₁₃, B = 100%, t_{13.5}, B = 30%, t₁₈, B = 30%. The column oven temperature was set to 40°C , the injection volume was 20 µL, and the flow rate was 1 mL/min. The working UV wavelength was 230 nm. Data analyses were performed using ChromQuest 5.0. For the quantification of oxazepam concentrations, a nine-point calibration curve, extending over the 3 ng/mL to 5 µg/mL range, was established in triplicate, with oxazepam dissolved in methanol (external standard method). For the evaluation of oxazepam recovery

after SPE extraction, we extracted and analyzed ISO water samples containing the same concentrations of oxazepam as used on the calibration curve (from 3 ng/mL to 5 µg/mL). Extraction efficiency was calculated by comparing areas for the solutions in methanol and the solutions after extraction. The limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) were determined by the signal-to-noise (S/N) approach. The instrumental detection limit for oxazepam was calculated as the lowest concentration giving a S/N ratio of at least 3, whereas the quantification limit was calculated as the lowest concentration giving a S/N ratio of at least 9 (three times the LOD). Instrumental stability was checked regularly, by injecting a concentration corresponding to a point on the calibration curve, in triplicate.

D) Feeding rate

Each organism was individually fed twice a week with a boiled organic standardized lettuce disc (16 mm diameter). The remaining food disc was photographed (α3000, Sony) twice a week and renewed. All images were rescaled and treated with Adobe Photoshop CS6 software by adjusting the colour range until obtaining a black and white image. Images were then analysed using ImageJ software (National Institutes of Health, version 1.8.0) and the consumed area of each lettuce disc calculated. Results are presented as the weekly surface of lettuce consumed (in cm²) relative to the volume of the individual (cubic shell length, in mm³).

E) Locomotion

Locomotor behaviour was monitored twice a week and on the same individuals for each concentration (n = 9 to 12, depending on treatment) at a fixed time (early afternoon) during the four weeks of the experiment. Each individual was removed from the exposure system and placed on its foot in a Petri dish (54 mm diameter) containing 10 mL of the water used for the exposure. Eight-minute videos were immediately recorded with a camera (α3000, Sony). Videos were analysed using an Ethovision image analysis system (Noldus, Wageningen, Netherlands). The average distance moved (in cm) during 8 min was calculated.

F) RNA extraction and RT-qPCR

At the end of the locomotion and feeding-rate experiments (day 28), the shells of 30 animals per concentration (including animals used for the locomotion assays for each concentration,

hereafter referred to as 'followed juveniles', and animals not used for the locomotion assays, hereafter referred to as 'non-followed juveniles') were removed, and the entire soft bodies of the individuals were dried on absorbent paper and weighed (wet weight).

Total RNA was extracted using an adapted protocol from Yaffe et al. (2012). Tissue was crushed in 500 mL TRIzol Reagent (Ambion) and centrifuged at 3,000 x g for 15 min at 4°C. The supernatant was recovered, chloroform/isoamylalcohol (24:1) (Sigma Aldrich) added (1/5 v), and the tube shaken strongly. After centrifugation (12,000 x g, 15 min, 4°C), 96% ethanol was added to the supernatant (v/v) and the mixture loaded onto Quick Plasmid Mini Columns (Pure Link, Invitrogen). The columns were then centrifuged (8,000 x g, 1 min, 21°C) and washed twice with 450 µL 3M sodium acetate to dissolve the polysaccharides and low-molecular-weight RNA. Finally, the columns were washed with 70% ethanol, centrifuged twice (15,000 x g, 2 min, 21°C), and the RNA eluted by adding 20 µL DEPC water and centrifuging at 8,000 x g for 2 min at 21°C. RNA was treated with amplification grade DNase I (Sigma Aldrich) following the manufacturer's instructions. Treated RNA was quantified by spectrometry (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA). Reverse transcription was carried out with 200 U/µL M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions on 300 ng total RNA.

Specific primers were designed using Primer 3 software (v 4.1.0) (Table 2-III-4, Supplementary information). The PCR efficiency of the primer pairs was estimated by serial dilution. Efficiencies were considered to be good if they were between 90 and 110%. *Tubulin* and *Ribosomal Protein L18* (RPL18) were selected as reference genes.

High-throughput real-time quantitative PCR was performed using the Biomark microfluidic system from Fluidigm, according to the Get-PlaGe (GenoToul, Toulouse, France) protocol, in which every sample-gene combination is quantified using a 96.96 Dynamic Array™ IFCs (BMK-M-96.96, Fluidigm). First, 6.5 ng of each cDNA was initially pre-amplified (10 min 95°C activation and 14 PCR cycles of 15 sec at 95°C and 4 min at 60°C) with PreAmp Master Mix (100-5581, Fluidigm) and a pool containing all primers targeting all genes (200 nM). Pre-amplified samples were diluted 1/5 after exonuclease treatment (M02935, NEB). To prepare samples for loading onto the IFC, a mix was prepared, consisting of 440 µL 2X TaqMan Master

Mix (Applied Biosystem, 4369016), 44 μ L 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (100-7609, Fluidigm), 44 μ L 20X Evagreen (31000, Biotium), and 132 μ L TE, and 6 μ L was dispensed into each well of a 96-well assay plate. Two microliters of pre-amplified and diluted cDNA sample were added to each well and the plate briefly vortexed and centrifuged. For the assays, 5 μ L of Assay (5 μ M each primer in primer-mix (2X assay loading reagent (100-7611, Fluidigm) and Tris EDTA)) was dispensed into each detector inlet of the 96.96 IFC. Following priming of the IFC in the IFC Controller HX, 5 μ L of the cDNA sample + reagent mix and 5 μ L of Assay were dispensed to each Sample Inlet of the 96.96 IFC. After loading the assays and samples into the IFC in the IFC Controller HX, the IFC was transferred to the BioMark and PCR performed using the following thermal protocol: thermal mix of 50°C, 2 min; 70°C, 30 min; 25°C, 10 min; hot start at 50°C, 2 min; 95°C, 10 min; PCR of 35 cycles of 95°C, 15 sec; 60°C, 60 sec, and melting analysis (60°C, 30 sec; 95°C, 1°C/3 sec). Results were analysed using Fluidigm real-time PCR analysis software v.4.1.3. Accurate amplification of the target amplicon was checked by performing a melting curve. The geometric mean of the two reference genes (*Tubulin* and *Ribosomal Protein L18*) was used to calculate fold changes using the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method where the $\Delta\Delta Ct$ for one individual X of the control or exposed group is: $((CT_{target,indX} - GeoAvg[CT_{ref1,ref2indX}]) - (AvgCT_{target,controlgroup} - GeoAvg[CT_{Ref1,Ref2,controlgroup}]))$. For each target gene, the mean fold-change in expression of the control or exposed group is the mean fold-changes calculated for each individual of the corresponding control or exposed group (Livak and Schmittgen, 2001).

G) Statistics

All statistical analysis were performed and graphs were plotted with R 4.0.0 software. In order to take into account pseudoreplicates, linear mixed-effects models were performed (after checking for the normal distribution of residuals) with the *lme4* R package (treatment and time as fixed factors and individuals as a random factor) for feeding rate (square root transformation), growth rate, shell length and distance travelled data. If a significant difference was detected between treatments or times, the least square means post hoc method with Bonferroni correction (*emmeans* R package) was used to assess the difference. If a significant difference between the interaction treatment with time was observed, a multiple comparison was performed with the same post hoc test (least square means post hoc

test with Bonferroni correction). For the analysis of gene expression data, ANOVA was used if the assumptions of normality and homoscedasticity were fulfilled. Otherwise, the Kruskal-Wallis test followed by the Kruskal Wallis multiple comparison test (*pgirmess* R package) was performed. Survival rate has been analyzed using Kaplan-Meier log-rang test with Bonferroni correction. Differences were considered significant if $p < 0.05$. Results are shown as the mean \pm SE, unless otherwise indicated.

III - Results

A) Water concentrations

Quantitative HPLC analysis showed the measured concentrations of oxazepam after the renewal of the exposure medium (day 0) were very close to the nominal concentrations (Table 2-III-1). After seven days (day 7), the oxazepam concentration was stable for the 0.8 $\mu\text{g/L}$ concentration and decreased by more than 30% for the 10 $\mu\text{g/L}$ concentration.

Table 2-III- 1 : Water concentrations of oxazepam (mean (SD), $n = 2$) used to expose juvenile pond snails after the renewal of the medium (day 0) and after a week (day 7).

	0.8 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$
day 0	0.92 (0.09)	10.16 (0.13)
day 7	0.90 (0.12)	7.12 (0.57)

B) Impact of oxazepam exposure on survival rate

The survival rate was measured twice a week until the end of experiment for each treatment (Figure 2-III-2). The survival rate of the group exposed to the low concentration of oxazepam was significantly higher (97.5%, as one individual died) than that in the control group (80%, as eight individuals died; $p = 0.014$, $\alpha = 1.7\%$).

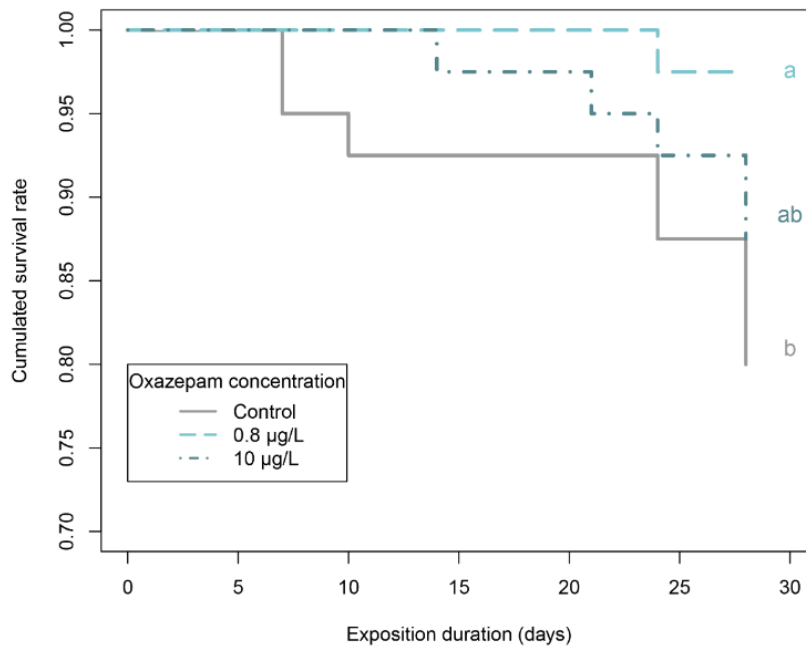


Figure 2-III-2: Survival rate throughout the experiment ($n = 40$ individuals per concentration). Letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

C) Impact of oxazepam exposure on feeding rate

The feeding rate of juveniles presented a significant interaction between treatment and time ($F = 4.101$, $p = 0.00056$). Non-exposed juveniles presented a constant feeding rate, except during the fourth week where the feeding rate decreased relative to the first week. At low concentration ($0.8 \mu\text{g/L}$), the gastropods consumed more lettuce than controls during the first week of the experiment: $11.9 \pm 0.9 \text{ cm}^2/\text{mm}^3 \cdot 10^3$ of organism versus $6.5 \pm 0.7 \text{ cm}^2/\text{mm}^3 \cdot 10^3$ (Figure 2-III-3). The difference decreased thereafter until the feeding rates were equivalent to control. In contrast, individuals exposed to the high dose of oxazepam ($10 \mu\text{g/L}$) showed significant long-term decrease of feeding relative to that of the controls from the second week ($p < 0.0001$) until the end of exposure (third week: $p = 0.0017$, fourth week: $p < 0.0001$). Non-normalized data (consumed surface in cm^2) showed very similar results (Figure 2-III-7, Supplementary information).

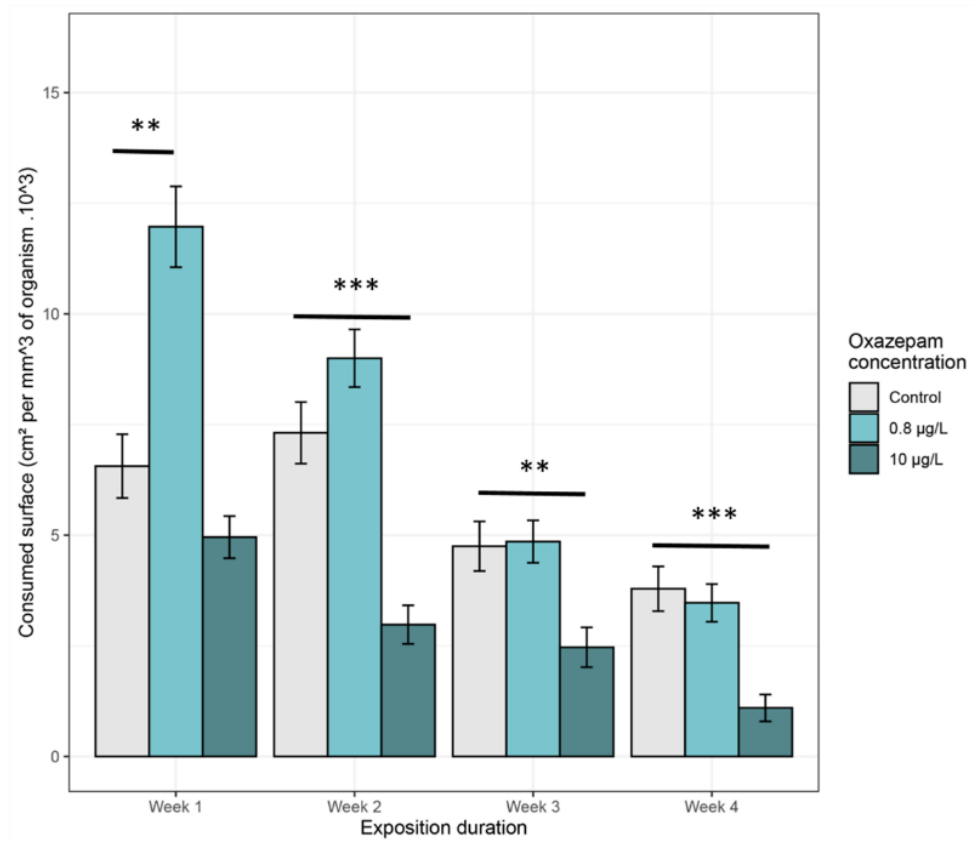


Figure 2-III-3 : Food consumption (consumed surface) for each week of oxazepam exposure ($n = 40$ individuals per condition). Error bars indicate the mean \pm SE of the mean. Stars represent significant differences between conditions for the same week. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

D) Impact of oxazepam exposure on shell growth and wet weight

Shell growth rate appeared to follow the same pattern as food consumption data, with a decrease throughout the experiment for all concentrations ($F = 57.13$, $p < 2.2 \cdot 10^{-16}$) (Figure 2-III-4). There was also a significant effect of treatments ($F = 6.92$, $p = 0.001$) due to the difference between low and high doses ($p = 0.0007$). No treatment by time interaction was observed ($F = 1.77$, $p = 0.1027$). The crude data (shell length over time) were presented in Figure 2-III-8 (Supplementary information). In addition, the wet weight of organisms at the end of the experiment (day 28) did not differ significantly between non-exposed and exposed individuals (data not shown).

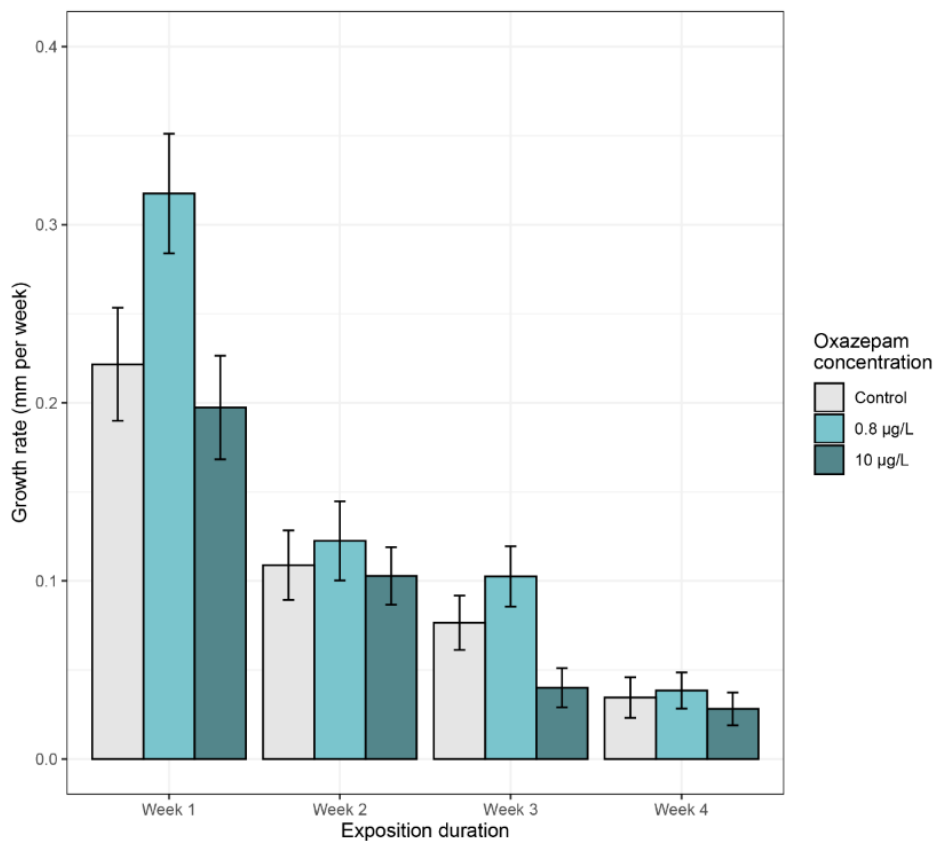


Figure 2-III-4 : Growth rate of the experimental organisms (mm of shell per week) for each treatment (mean, $n = 40$). Error bars represent \pm SE of the mean.

E) Impact of oxazepam exposure on locomotion

Locomotion assays performed on the same juveniles throughout exposure did not show any treatment effect ($F = 0.001$, $p = 0.998$) but a significant effect is observed over time ($F = 8.77$, $p = 2.038 \cdot 10^{-10}$). Results showed that the distance travelled by non-exposed individuals dropped from 197.0 ± 21.7 mm on day 0 to 64.6 ± 13 mm on day 28 (Figure 2-III-5), with a significant difference between day 0 and days 14 to 28 ($p < 0.005$). The distance travelled by individuals exposed to high concentration also showed an important decrease, with a significant difference between day 0 and days 3, 21, 24 and 28 ($p < 0.05$). By contrast, the distance travelled seems more stable over time in low exposure group, as only days 17 and 28 were statistically significant from day 0 ($p < 0.05$).

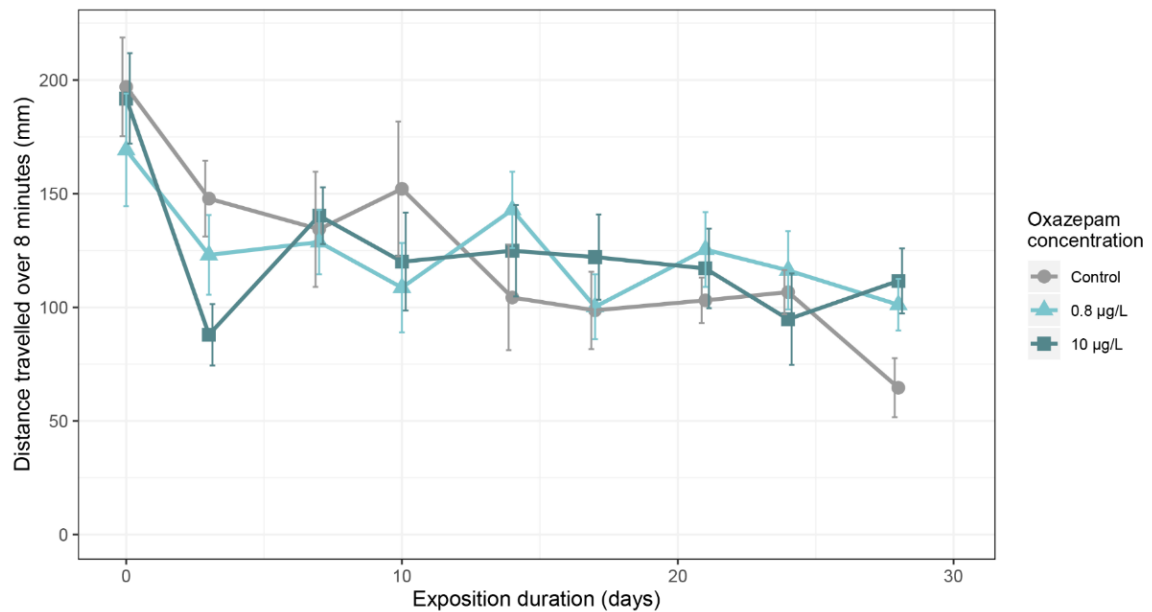


Figure 2-III-5 : Sum of the distance travelled (mm) by juveniles placed in Petri dishes for 8 min for each concentration ($n = 9$ to 12 individuals per concentration). Points and error bars indicate the mean and the SE of the mean, respectively.

F) Transcriptomic analysis

We carried out gene expression analysis on juveniles exposed to oxazepam for 28 days, including individuals used in both the behaviour and growth/feeding experiments (referred here as ‘followed juveniles’) and individuals used only in growth/feeding tests (‘non-followed juveniles’). Real-time PCR analysis showed a large difference between the two groups but the Mann-Whitney U test side by side comparison did not showed significant difference between expression level of controls (Table 2-III-5 Supplementary information). Most of the genes in the ‘non-followed juveniles’ group were under-expressed, especially at the highest concentration of oxazepam. In total, 26 of the 85 selected genes were significantly under-expressed relative to the control and only one gene was over-expressed (Table 2-III-2). Eight additional genes tended to be under-expressed ($p < 0.1$). Most of the genes differentially expressed (DE) after oxazepam exposure are involved in the nervous system, more precisely, in the GABA, serotonin, and dopamine pathways (*GABA receptors*, *glutamate receptor*, *serotonin receptor*, *serotonin/dopamine transporter*, *tyrosine hydroxylase*, *tryptophan hydroxylase*) or encode neuropeptides and their receptors (*LIPs*, *MIP*, *MIP receptor*) and components of the protein kinase pathways (*PKA*, *PKG*, *calmodulin*). Some marker genes of ciliary and muscular structure were also under-expressed (*tektin 2*, *myosin regulatory light*

chain A, tropomyosin), as well as genes encoding digestive enzymes (*lysosomal and non-lysosomal glucosyl ceramidases, fructose biphosphate aldolase, alpha glucosidase*). Finally, only one gene involved in detoxification was downregulated (*SOD Cu*) and the cell communication function (Notch pathway) was also affected (*notch, furin, presenilin*). The soma ferritin gene was the only gene upregulated following oxazepam exposure.

By contrast to the results obtained for the 'non-followed juveniles' group, 12 of the 85 selected genes were significantly over-expressed relative to the control in the 'followed juveniles' group (for one or both treatments), seven genes tended to be overexpressed ($p < 0.1$), and only one was underexpressed (*Cyp450 3E4*) (Table 2-III-3). The overexpressed genes include those of the nervous system, with genes encoding neuropeptides (*pedal peptide, myomodulin, pro-neuropeptide Y*), the digestive system, with genes encoding enzymes involved in carbohydrate metabolism (*endoglucanase, alpha amylase, neutral alpha glucosidase, fructose biphosphate aldolase*), and the detoxification process, with the genes encoding *SOD, catalase, and Cyp450 49a1*. The gene encoding soma ferritin was also strongly overexpressed, which was the only gene similarly expressed in both groups. For a better visualisation, a pie chart representing the part of the genes differentially expressed in each group and the part of genes non-differentially expressed is presented in Figure 2-III-8 (Supplementary information).

Table 2-III-2 : Fold changes of genes after oxazepam exposure at 0.8 or 10 µg/L of juveniles not followed for locomotion after 28 days. Genes were classified according to their function (nervous system, muscle and ciliary structure, digestive system, detoxification, and cell communication). Results are presented as mean fold changes (\pm SE), $n = 9$ per concentration. Significance versus control: $+p < 0.1$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. The colour code from beige to dark orange indicates upregulated genes and from light blue to dark blue downregulated genes.

Function	Gene name	Control	0.8 µg/L	10 µg/L
Nervous system	GABA B1 subunit receptor	1.042 (\pm 0.106)	0.775 (\pm 0.058)	0.674 (\pm 0.072) *
	GABA A beta subunit receptor	1.045 (\pm 0.108)	0.782 (\pm 0.087)	0.602 (\pm 0.109) *
	Glutamate receptor	1.089 (\pm 0.148)	0.854 (\pm 0.087)	0.609 (\pm 0.090) *
	Serotonin receptor	1.077 (\pm 0.139)	0.646 (\pm 0.078)	0.597 (\pm 0.110) *
	Tyrosine hydroxylase	1.080 (\pm 0.134)	0.779 (\pm 0.085) +	0.582 (\pm 0.086) *
	Serotonin/dopamine transporter	1.097 (\pm 0.132)	0.882 (\pm 0.122)	0.563 (\pm 0.069) ***
	Tryptophan hydroxylase	1.039 (\pm 0.101)	0.778 (\pm 0.099) +	0.693 (\pm 0.085) *
	cAMP-dependent protein kinase	1.017 (\pm 0.067)	0.817 (\pm 0.054)	0.562 (\pm 0.051) ***

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

	Calmodulin	1.008 (± 0.043)	0.940 (± 0.067)	0.699 (± 0.065) *
	Neurocalcin	1.014 (± 0.060)	0.768 (± 0.043) *	0.605 (± 0.092) ***
	Nitric oxide synthase	1.074 (± 0.147)	1.063 (± 0.077)	0.744 (± 0.072) +
	cGMP protein kinase	1.031 (± 0.090)	0.864 (± 0.070)	0.704 (± 0.076) *
	Small cardiopeptide	1.028 (± 0.088)	0.776 (± 0.107) +	0.790 (± 0.129) +
	Buccalin	1.075 (± 0.150)	0.916 (± 0.126)	0.699 (± 0.099) +
	LFRFamide	1.024 (± 0.081)	0.904 (± 0.068)	0.818 (± 0.120) +
	Lymnaea inhibitory peptides	1.052 (± 0.124)	0.814 (± 0.089)	0.649 (± 0.076) *
	Molluscan insulin-related peptide	1.021 (± 0.070)	0.436 (± 0.384) *	0.834 (± 0.258)
	Molluscan insulin-related peptide receptor	1.028 (± 0.089)	0.827 (± 0.074)	0.737 (± 0.056) *
Muscle / ciliary structure	Tektin 1	1.044 (± 0.110)	0.856 (± 0.080)	0.701 (± 0.097) +
	Tektin 2	1.040 (± 0.107)	0.841 (± 0.086)	0.619 (± 0.097) *
	Axonemal dynein light chain	1.033 (± 0.094)	0.878 (± 0.057)	0.762 (± 0.071) +
	Myosin heavy chain	1.053 (± 0.111)	0.942 (± 0.112)	0.656 (± 0.132) +
	Myosin regulatory light chain A	1.031 (± 0.083)	0.818 (± 0.100)	0.589 (± 0.097) *
	Tropomyosin	1.032 (± 0.085)	0.644 (± 0.067) *	0.659 (± 0.133) *
Digestive system	Lysosomal glucosyl ceramidase	1.013 (± 0.058)	0.875 (± 0.069)	0.658 (± 0.061) **
	Non-lysosomal glucosyl ceramidase	1.058 (± 0.133)	0.976 (± 0.101)	0.658 (± 0.094) *
	Fructose-bisphosphate aldolase	1.033 (± 0.089)	0.806 (± 0.062)	0.646 (± 0.075) *
	Alpha glucosidase	1.038 (± 0.105)	0.825 (± 0.084)	0.626 (± 0.069) ***
Cell communication	NOTCH	1.048 (± 0.105)	0.871 (± 0.047)	0.793 (± 0.070) *
	Furin	1.013 (± 0.060)	0.890 (± 0.091)	0.694 (± 0.073) **
	Presenilin	1.013 (± 0.058)	0.981 (± 0.076)	0.794 (± 0.051) *
Detoxification	Soma ferritin	1.213 (± 0.329)	1.910 (± 0.214)	4.235 (± 0.613) ***
	Superoxide dismutase Cu	1.035 (± 0.100)	0.943 (± 0.064)	0.773 (± 0.059) *
	Glutathione synthetase	1.047 (± 0.116)	0.869 (± 0.133)	0.733 (± 0.115) +

Table 2-III-3 : Fold changes of genes after oxazepam exposure at 0.8 or 10 µg/L of juveniles followed for locomotion after 28 days. Genes were classified according to their function (nervous system, muscle and ciliary structure, digestive system, and detoxification). Results are presented as mean fold changes (± SE), n = 9 per concentration. Significance versus control: +p < 0.1 *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. The colour code from beige to dark orange indicates upregulated genes and from light blue to dark blue downregulated genes.

Function	Gene name	Control	0.8 µg/L	10 µg/L
Nervous system	Pedal peptide	1.084 (± 0.144)	1.809 (± 0.216) *	1.271 (± 0.213)
	FMRFamide	1.088 (± 0.149)	1.523 (± 0.200) +	0.946 (± 0.156)
	Acetylcholine binding protein	1.146 (± 0.196)	1.747 (± 0.187) +	1.485 (± 0.254)

	Myomodulin	1.065 (± 0.120)	1.382 (± 0.156)	1.853 (± 0.191) *
	Pro-neuropeptide Y	1.013 (± 0.054)	1.409 (± 0.178)	1.693 (± 0.191) *
	Cerebrin prohormone	1.044 (± 0.104)	1.495 (± 0.193)	1.883 (± 0.291) +
	Calmodulin	1.088 (± 0.141)	1.105 (± 0.051)	1.520 (± 0.092) +
	Schistosomin	1.126 (± 0.199)	1.499 (± 0.190)	2.022 (± 0.407) +
Muscle / ciliary structure	Axonemal dynein light chain	1.071 (± 0.126)	1.535 (± 0.131) +	1.692 (± 0.159) *
	Tropomyosin	1.164 (± 0.194)	1.594 (± 0.166) +	1.259 (± 0.217)
Digestive system	Endoglucanase isoform 1	1.256 (± 0.214)	2.398 (± 0.426)	4.165 (± 0.657) *
	Endoglucanase isoform 2	1.292 (± 0.286)	2.137 (± 0.422)	2.597 (± 0.470) +
	Alpha amylase	1.394 (± 0.336)	2.227 (± 0.651)	4.018 (± 0.710) *
	Fructose-bisphosphate aldolase	1.076 (± 0.130)	1.432 (± 0.116) *	1.497 (± 0.097) *
	Neutral alpha-glucosidase	1.033 (± 0.091)	1.217 (± 0.061) *	1.065 (± 0.090)
Detoxification	Soma ferritin	1.058 (± 0.121)	0.975 (± 0.091)	3.956 (± 0.640) ***
	Superoxide dismutase Mn	1.021 (± 0.075)	1.236 (± 0.100) *	1.196 (± 0.090)
	Catalase	1.135 (± 0.220)	1.070 (± 0.118)	1.678 (± 0.171) *
	Cytochrome p450 49a1	1.197 (± 0.246)	1.685 (± 0.328)	2.168 (± 0.278) *
	Cytochrome p450 3E4	1.437 (± 0.476)	1.012 (± 0.247)	0.208 (± 0.080) ***

IV - Discussion

The aim of this study was to evaluate the effects induced by the anxiolytic drug oxazepam on the metabolic pathways associated with growth, locomotory and feeding behavior in the freshwater snail *Radix balthica* and gain insight into the mechanisms of toxicity using a transcriptomic approach. We observed a strong dose-dependent effect on the feeding rate, and a decrease of mortality at low dose. Gene expression analysis highlighted a large difference in the effects induced at the molecular level between individuals used in both the locomotion and growth/feeding experiments ('followed juveniles') and those only used for the growth/feeding tests ('non-followed juveniles'), suggesting that manipulation of the animals may have interfered with the molecular effects induced by oxazepam exposure.

Mortality rate was quite high in control, but nevertheless conformed to OCDE guidelines for ecotoxicological studies on freshwater gastropods, recommending a mortality of no more than 20% over 28 days in control conditions for such studies (OECD, 2016a, 2016b). Moreover, these guidelines were made for adult gastropods, whereas the present study worked with

juveniles and it is known that juvenile mortality may be higher than that of adults. Additionally, other studies have reported a high mortality rate for *Radix balthica* juveniles not exposed to contaminants (Hallgren et al., 2012; López-Doval et al., 2019). When exposed to low dose of oxazepam, the mortality rate significantly decreased. Other studies also observed a decrease in the mortality of vertebrates (newly-hatched and adult Eurasian Perch *Perca fluviatilis*) and invertebrates (the crustacean *Gammarus fossarum*) exposed to an equivalent dose of oxazepam (1 µg/L) (Garcia-Galan et al., 2017; Klaminder et al., 2014). This may be explained by the fact that oxazepam may reduce the stress induced by isolation and handling. Indeed, confinement and handling are known to induce stress in fish (Rotllant et al., 2001; Sharpe et al., 1998) and crustaceans (Aparicio-Simón et al., 2010; Fotedar and Evans, 2011). Our results suggest that such stress may also occur for molluscs under our experimental maintenance conditions.

The feeding assays revealed short-term stimulation of food intake at the low concentration. These results are in accordance with those of the study of Brodin et al. (2013), who observed that perch exposed to similar doses of oxazepam (1.8 µg/L) started feeding earlier than controls after seven days. Benzodiazepines have been known to increase food intake by mammals for decades (Bainbridge, 1968; Brown et al., 1976) and have been characterized as appetite-enhancing molecules (Cooper, 1980). In molluscs, feeding neural networks have been well described, especially for the gastropod *Lymnaea stagnalis* (Benjamin, 2012; Cropper et al., 2004) and the implication of the neurotransmitter GABA in the regulation of feeding has been studied (Romanova et al., 1996). Indeed, injection of GABA into the isolated central nervous system excited motor neurons of the cerebral ganglion involved in the protraction of tentacles and strongly stimulated the feeding rhythm generator in the buccal ganglion (Arshavsky et al., 1993, 1991). The same study hypothesized that activation of the tentacle motor neurons was mediated by the GABA_A receptor, whereas the feeding rhythm generator was mediated by the GABA_B receptor. Moreover, a recent study demonstrated that the feeding activity of the Prussian Carp *Carasius gibelio* is under control of the GABA_A receptor and that a benzodiazepine (phenazepam) clearly stimulates feeding behaviour in a GABA-dependent manner (Snigirov and Sylantsev, 2018). It is thus conceivable that the stimulation of feeding rate observed in *R. balthica* after one week of exposure to oxazepam was linked to

its interaction with the GABA_A receptor. Interestingly, exposure to a higher dose (10 µg/L) induced long-term inhibition of the feeding rate. This is the first observation of long-term inhibition of food intake after exposure to benzodiazepines. These results contradict those of Belal and Assem (2011), who showed long-term stimulation of the feeding rate of fish after a diet contaminated with 12 mg oxazepam per 100 g food. Further studies are needed to confirm such long-term inhibition of food intake on other molluscan species.

Growth and weight monitoring revealed no significant effects of oxazepam exposure. These results are consistent with those of Lagesson et al. (2018), who showed no effect of oxazepam on fish growth after long-term exposure. However, the kinetics of growth are linked to feeding rate. The lack of a significant relationship between the food intake data and that for growth/weight can be explained by the fact that only part of the energy available after digestion is allocated to growth. The rest may be allocated to other processes, such as detoxification (Petitjean et al., 2019; Sokolova et al., 2012). However, in this case, because of the lower feeding rate in the presence of 10 µg/L oxazepam and the higher energy demand for detoxification, we would have expected to observe a decrease in growth at this concentration. Alternatively, growth rate naturally decreases with increasing age. Indeed, Wullschleger and Jokela (2002) described the growth curve of *Lymnaea peregra* juveniles (presently *Radix balthica*) and showed a reduction of growth rate seven weeks after hatching. The present study begun from the age of 8 weeks and continue to the age of 12 weeks. This phenomenon could thus explain the reduction in the growth rate observed in our experiment.

The locomotion assays have not showed any effect of oxazepam exposure on the locomotor activity. Contrasting results have been published for oxazepam, with some authors reporting a stimulatory effect on the activity of fish (Brodin et al., 2017, 2014) and crayfish (Kubec et al., 2019), which was not confirmed by another recent study (Cerveny et al., 2020). It should be noted that, in the aforementioned studies, activity was assessed only once, after one week of exposure. By contrast, we performed repeated measurements on the same individuals, twice weekly for four weeks, and memory processes may therefore have been involved.

The gene expression analysis revealed highly different responses between the two groups (juveniles followed and not followed for locomotion), whereas the physiological results

(mortality, feeding rate, growth rate) did not show such differences (data not shown). 'Non-followed' juveniles exposed to oxazepam for 28 days showed global downregulation of the targeted genes. This was especially true at the high concentration, but a dose-effect was sometimes apparent, with under-expression at 0.8 µg/L also. Among the DE genes, a large proportion are linked to neurotransmission, both in the central and peripheral systems. Receptors and transporters of 'classical' neurotransmitters (GABA, glutamate, serotonin, dopamine) were affected, as well as precursors of catecholamines, serotonin, and nitric oxide. Several studies have focused on the effects of benzodiazepine exposure on these neurotransmitters in invertebrates but the results are still unclear (Gagné et al., 2010; Rivetti et al., 2019). These neurotransmitters are involved in numerous molluscan functions, such as locomotion, feeding behaviour, and chemoreception (Brown et al., 2018; Elliott and Susswein, 2002; Matsuo et al., 2009; Miller, 2019; Pavlova, 2001). The transcriptomic responses also showed under-expression of genes encoding neuropeptides (*LIPs, and MIPs*), shown to be peripheral neurotransmitters in gastropods involved in the regulation of food intake, metabolism and growth (Dogterom, 1980; Geraerts, 1976; Li et al., 1996). Although we did not observe significant growth effects during the month of exposure, it is possible that these DE genes correspond to a precursor response. Cyclic nucleotide-signalling pathways appear to be affected by oxazepam exposure, with the under-expression of genes known to interact with the cAMP and cGMP pathways (*cAMP-dependant protein kinase, cGMP-dependant protein kinase, calmodulin, neurocalcin*). The cAMP signalling pathway is involved in many functions (smooth muscle and heart cell contraction, gills and gonad function, and metabolic regulation) (Fabbri and Capuzzo, 2010) and it has been demonstrated that the NO-cGMP pathway, mediated by calcium/calmodulin, plays a role in chemosensory activation of feeding (Elphick et al., 1995). Other classes of genes affected by oxazepam exposure are those that play a role in ciliary (*tektin 2*) and muscular (*myosin regulatory light chain A, tropomyosin*) structures. There are no data on the effects of benzodiazepine on these functions in non-vertebrates, but it has been shown that quail oviduct ciliogenesis is inhibited by diazepam and medazepam (Boisvieux-Ulrich et al., 1987). Several genes involved in the digestive system, especially carbohydrate metabolism, were also affected. To date, there is no clear evidence of an interaction between benzodiazepine and digestive enzymes. However, modifications of the

nervous system suggest neuroendocrine regulation of the digestive system. Finally, cellular communication genes of the Notch signalling pathway were differentially expressed, in the same way as those of *R. balthica* embryos exposed to oxazepam, as reported by Mazzitelli et al. (2017). The detoxification pathway appeared to be only slightly affected, except for the strong overexpression of the soma ferritin gene, known to act in detoxification and iron storage.

Interestingly, individuals similarly exposed to oxazepam but removed from culture to perform the locomotion assay showed a very different pattern of DE genes than that observed for the 'non-followed' group. Most were overexpressed and mostly different from those DE in the 'non-followed' group. The expression of genes specifically involved in the stimulation of ciliary beating (*pedal peptide*) and feeding behavior (*myomodulin*, *pro-neuropeptide Y*, *cerebrin*) (Chamorro et al., 2002; Hall and Lloyd, 1990; Kellett et al., 1996; Li et al., 2001) were elevated at the low and high doses. These observations suggest activation of these functions, especially of the feeding system, which is coherent with the over-expression of genes encoding digestive enzymes, such as endoglucanases (cellulose decomposition), and enzymes of carbohydrate metabolism. Finally, unlike the 'followed' juveniles, the detoxification process appeared to be globally stimulated, except for one gene, *cytochrome p450 3A4*, involved in benzodiazepine metabolism (Olsen et al., 2016), which was downregulated.

Despite the significant difference, the levels of expression of DE genes were close to those of the controls, at levels of about -35% for underexpressed genes and + 90% for over-expressed genes. These levels of expression are similar to those reported in an RNA-seq analysis of differential expression in *Radix balthica* embryos exposed to oxazepam (Mazzitelli et al., 2017), confirming that oxazepam induces a small change in gene expression levels in *Radix balthica*.

The difference in transcriptomic response between the followed and non-followed individuals is potentially interesting, but the underlying mechanisms remain unknown. To our knowledge, this is the first study to describe a coupled effect of psychotropic drug exposure and locomotor activity (or repeated manipulation) on gene expression. This finding is particularly interesting

because all the non-exposed individuals, whether or not they were followed, had similar levels of gene expression, indicating that locomotor activity alone has no impact on gene expression.

These transcriptomic results suggest that, under classical conditions of exposure, oxazepam affects nervous system transmission linked to displacement and feeding activity. It may therefore induce molecular disturbances in the feeding systems of exposed individuals studied in locomotion assays. It is thus possible that repeated activity or stress induced by recurrent manipulations disturbs the original molecular response in animals exposed to oxazepam. Moreover, these differences between the two groups were only observed at the level of gene expression, not the physiological level, suggesting a precursor response of gene expression.

V - Conclusion

We describe, for the first time, the effects of long-term oxazepam exposure on a freshwater gastropod mollusk. We observed both increases and decreases in feeding rate, depending on the concentration of oxazepam. Exposure to high concentrations, corresponding to those found in effluent, could have a negative impact on *Radix balthica* populations in the long time, by decreasing feeding rate, potentially leading to a decline in energy reserves. However, we found no significant effect on growth, and we cannot therefore draw any firm conclusions on the impact of oxazepam on this function. Another key finding is the strong apparent effect of activity or manipulation on the transcriptomic response. Care is therefore required when comparing groups, particularly in transcriptomic analysis. Further studies on the impact of oxazepam on reproduction and embryonic development will be performed, to evaluate the toxicity of this molecule at other stages in the life cycle of this species.

Acknowledgments

Funding for this work was provided by a grant from the Region Occitanie, Toulouse (France) for 80% and from Jean-François Champollion University Institute (Albi, France) for 20%. The authors thank Sandra Fourre of the GeT-PlaGe platform (GenoToul, Toulouse, France) for the BioMark experiments and advice. We are grateful to Alex Edelman & Associates for English language proofreading.

References

- Amorim, J., Abreu, I., Rodrigues, P., Peixoto, D., Pinheiro, C., Saraiva, A., Carvalho, A.P., Guimarães, L., Oliva-Teles, L., 2019. *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. *Sci. Total Environ.* 669, 11–28. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.03.035>
- Aparicio-Simón, B., Piñón, M., Racotta, R., Racotta, I.S., 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture* 298, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.016>
- Argyropoulos, S.V., Nutt, D.J., 1999. The use of benzodiazepines in anxiety and other disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9. [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(99\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(99)00052-8)
- Arshavsky, Y.I., Deliagina, T.G., Gamkrelidze, G.N., Orlovsky, G.N., Panchin, Y. V., Popova, L.B., Shupliakov, O. V., 1993. Pharmacologically induced elements of the hunting and feeding behavior in the pteropod mollusk *Clione limacina*. I. Effects of GABA. *J. Neurophysiol.* 69, 512–521. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.69.2.512>
- Arshavsky, Y.L., Gamkrelidze, G.N., Orlovsky, G.N., Panchin, Y. V., Popova, L.B., 1991. Gamma-aminobutyric acid induces feeding behaviour in the marine mollusc, *Clione limacina*. *Neuroreport* 2, 169–172. <https://doi.org/10.1097/00001756-199104000-00002>
- Bainbridge, J.G., 1968. The effect of psychotropic drugs on food reinforced behaviour and on food consumption. *Psychopharmacologia* 12, 204–213. <https://doi.org/10.1007/BF00403774>
- Belal, I., Assem, H., 2011. Pharmacological mechanisms of diazepam in fish: Effect on growth. *J. Environ. Sci. Eng.* 5, 1363–1369.
- Benjamin, P.R., 2012. Distributed network organization underlying feeding behavior in the mollusk *Lymnaea*. *Neural Syst. Circuits* 2, 4. <https://doi.org/10.1186/2042-1001-2-4>
- Bodnárová, M., Martásek, P., Moroz, L.L., 2005. Calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase activity in the CNS of *Aplysia californica*: Biochemical characterization and link to cGMP pathways. *J. Inorg. Biochem.* 99, 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.01.012>
- Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., Sandoz, D., 1987. In vitro effects of benzodiazepines on ciliogenesis in the quail oviduct. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 333–344. <https://doi.org/10.1002/cm.970080406>
- Bouétard, A., Besnard, A.L., Vassaux, D., Lagadic, L., Coutellec, M.A., 2013. Impact of the redox-cycling herbicide diquat on transcript expression and antioxidant enzymatic activities of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat. Toxicol.* 126, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.013>
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science (80-.)*. 339, 814–815. <https://doi.org/10.1126/science.1226850>
- Brodin, T., Nordling, J., Lagesson, A., Klaminder, J., Hellström, G., Christensen, B., Fick, J., 2017. Environmental relevant levels of a benzodiazepine (oxazepam) alters important behavioral traits in a common planktivorous fish (*Rutilus rutilus*). *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 80, 963–970. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1352214>
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems--impacts through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130580–20130580. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0580>
- Brown, J.W., Schaub, B.M., Klusas, B.L., Tran, A.X., Duman, A.J., Haney, S.J., Boris, A.C., Flanagan, M.P., Delgado, N., Torres, G., Rolón-Martínez, S., Vaasjo, L.O., Miller, M.W., Gillette, R., 2018. A role for dopamine in the peripheral sensory processing of a gastropod mollusc. *PLoS One* 13, e0208891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208891>
- Brown, R.F., Houpt, K.A., Schryver, H.F., 1976. Stimulation of food intake in horses by diazepam and promazine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, 495–497. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(76\)90116-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(76)90116-7)
- Calisto, V., Domingues, M.R.M., Esteves, V.I., 2011. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. *Water Res.* 45, 6097–6106. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.09.008>

- Calisto, V., Esteves, V.I., 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77, 1257–1274. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2009.09.021>
- Carbó Tano, M., Molina, V.A., Maldonado, H., Pedreira, M.E., 2009. Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: The role of the GABAergic system. *Neuroscience* 158, 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.039>
- Chamorro, S., Della-Zuana, O., Fauchère, J.L., Félétou, M., Galizzi, J.P., Levens, N., 2002. Appetite suppression based on selective inhibition of NPY receptors. *Int. J. Obes.* 26, 281–298. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801948>
- Cœurdassier, M., De Vaufleury, A., Badot, P.M., 2003. Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 102–109. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-0152-4>
- Cooper, S.J., 1980. Benzodiazepines as appetite-enhancing compounds. *Appetite* 1, 7–19. [https://doi.org/10.1016/S0195-6663\(80\)80005-5](https://doi.org/10.1016/S0195-6663(80)80005-5)
- Coutellec, M.A., Besnard, A.L., Caquet, T., 2013. Population genetics of *Lymnaea stagnalis* experimentally exposed to cocktails of pesticides. *Ecotoxicology* 22, 879–888. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1082-9>
- Cropper, E.C., Evans, C.G., Hurwitz, I., Jing, J., Proekt, A., Romero, A., Rosen, S.C., 2004. Feeding neural networks in the mollusc *Aplysia*. *Neurosignals* 13, 70–86. <https://doi.org/10.1159/000076159>
- Cunha, D.L., de Araujo, F.G., Marques, M., 2017. Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 24076–24091. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0170-4>
- Das, S., Khangarot, B.S., 2011. Bioaccumulation of copper and toxic effects on feeding, growth, fecundity and development of pond snail *Lymnaea luteola* L. *J. Hazard. Mater.* 185, 295–305. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.09.033>
- Dogterom, A.A., 1980. The effect of the growth hormone of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* on biochemical composition and nitrogenous wastes. *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 65, 163–167. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90126-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90126-1)
- Elliott, C.J., Susswein, A.J., 2002. Comparative neuroethology of feeding control in molluscs. *J. Exp. Biol.* 205, 877–896.
- Elphick, M.R., Kemenes, G., Staras, K., O'Shea, M., 1995. Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc. *J. Neurosci.* 15, 7653–7664. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-11-07653.1995>
- Emery, D.G., 1992. Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 22, 307–324. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070220402>
- Fabbri, E., Capuzzo, A., 2010. Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 313, 179–200. <https://doi.org/10.1002/jez.592>
- Fotedar, S., Evans, L., 2011. Health management during handling and live transport of crustaceans: A review. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.011>
- Gagné, F., André, C., Gélinas, M., 2010. Neurochemical effects of benzodiazepine and morphine on freshwater mussels. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 152, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.04.007>
- Garcia-Galan, M.J., Sordet, M., Buleté, A., Garric, J., Vuillet, E., 2017. Evaluation of the influence of surfactants in the bioaccumulation kinetics of sulfamethoxazole and oxazepam in benthic invertebrates. *Sci. Total Environ.* 592, 554–564. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.03.085>
- Geraerts, W.P.M., 1976. Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 29, 61–71. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(76\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0016-6480(76)90007-1)
- Geraerts, W.P.M., de With, N.D., Vreugdenhil, E., van Hartingsveldt, W., Hogenes, T.M., 1984. Studies on the physiological role of a partially purified small cardioactive neuropeptide of *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Physiol. B* 154, 29–34. <https://doi.org/10.1007/BF00683213>

- Granger Joly de Boissel, P., Gonzalez, P., Buleté, A., Daffe, G., Clérandeau, C., Vulliet, E., Cachot, J., 2017. An innovative and integrative assay for toxicity testing using individual fish embryos. Application to oxazepam. *Chemosphere* 181, 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.067>
- Gupta, S.K., Singh, J., 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: A review. *IIOAB J.* 2, 49–57.
- Hall, J.D., Lloyd, P.E., 1990. Involvement of pedal peptide in locomotion in *Aplysia*: Modulation of foot muscle contractions. *J. Neurobiol.* 21, 858–868. <https://doi.org/10.1002/neu.480210604>
- Hallgren, P., Sorita, Z., Berglund, O., Persson, A., 2012. Effects of 17 α -ethinylestradiol on individual life-history parameters and estimated population growth rates of the freshwater gastropods *Radix balthica* and *Bithynia tentaculata*. *Ecotoxicology* 21, 803–810. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0841-8>
- Haszprunar, G., 1985. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. 1. Gastropoda, Prosobranchia. *Philos. Trans. R. Soc. London. B, Biol. Sci.* 307, 457–496. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0003>
- Hellström, G., Klaminder, J., Finn, F., Persson, L., Alanärä, A., Jonsson, M., Fick, J., Brodin, T., 2016. GABAergic anxiolytic drug in water increases migration behaviour in salmon. *Nat. Commun.* 7, 13460. <https://doi.org/10.1038/ncomms13460>
- Heynen, M., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., Brodin, T., 2016. Effect of bioconcentration and trophic transfer on realized exposure to oxazepam in 2 predators, the dragonfly larvae (*Aeshna grandis*) and the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 930–937. <https://doi.org/10.1002/etc.3368>
- Hoek, R.M., Li, K.W., Van Minnen, J., Lodder, J.C., De Jong-Brink, M., Smit, A.B., Van Kesteren, R.E., 2005. LFRFamides: A novel family of parasitism-induced α -RFamide neuropeptides that inhibit the activity of neuroendocrine cells in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurochem.* 92, 1073–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02927.x>
- Huerta, B., Margiotta-Casaluci, L., Rodríguez-Mozaz, S., Scholze, M., Winter, M.J., Barceló, D., Sumpter, J.P., 2016. Anti-anxiety drugs and fish behavior: Establishing the link between internal concentrations of oxazepam and behavioral effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2782–2790. <https://doi.org/10.1002/etc.3448>
- Hummel, D., Löffler, D., Fink, G., Ternes, T.A., 2006. Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7321–7328. <https://doi.org/10.1021/es061740w>
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1991. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 260–265. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90567-C](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90567-C)
- Kamardin, N.N., Shalanki, Y., Sh.-Rozha, K., Nozdrachev, A.D., 2001. Studies of chemoreceptor perception in mollusks. *Neurosci. Behav. Physiol.* 31, 227–235. <https://doi.org/10.1023/A:1005228711262>
- Kellett, E., Perry, S.J., Santama, N., Worster, B.M., Benjamin, P.R., Burke, J.F., 1996. Myomodulin gene of *Lymnaea*: structure, expression, and analysis of neuropeptides. *J. Neurosci.* 16, 4949–57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-16-04949.1996>
- Klaminder, J., Brodin, T., Sundelin, A., Anderson, N.J., Fahlman, J., Jonsson, M., Fick, J., 2015. Long-term persistence of an anxiolytic drug (oxazepam) in a large freshwater lake. *Environ. Sci. Technol.* 49, 10406–10412. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01968>
- Klaminder, J., Jonsson, M., Fick, J., Sundelin, A., Brodin, T., 2014. The conceptual imperfection of aquatic risk assessment tests: highlighting the need for tests designed to detect therapeutic effects of pharmaceutical contaminants. *Environ. Res. Lett.* 9, 084003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/8/084003>
- Kodirov, S.A., 2011. The neuronal control of cardiac functions in Molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 160, 102–116. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2011.06.014>
- Kosjek, T., Perko, S., Zupanc, M., Zanoški Hren, M., Landeka Dragičević, T., Žigon, D., Kompare, B., Heath, E., 2012. Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. *Water Res.* 46, 355–368. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.10.056>
- Kubec, J., Hossain, M., Grabicová, K., Randák, T., Kouba, A., Grabic, R., Roje, S., Buřič, M., 2019. Oxazepam alters the behavior of crayfish at diluted concentrations, venlafaxine does not. *Water* 11, 196. <https://doi.org/10.3390/w11020196>

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

- Lagesson, A., Brodin, T., Fahlman, J., Fick, J., Jonsson, M., Persson, J., Byström, P., Klaminder, J., 2018. No evidence of increased growth or mortality in fish exposed to oxazepam in semi-natural ecosystems. *Sci. Total Environ.* 615, 608–614. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.070>
- Lagesson, A., Fahlman, J., Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Byström, P., Klaminder, J., 2016. Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web - Insights from a field experiment. *Sci. Total Environ.* 568, 208–215. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.206>
- Li, K.W., Van Minnen, J., Van Veelen, P.A., Van der Greef, J., Geraerts, W.P.M., 1996. Structure, localization and action of a novel inhibitory neuropeptide involved in the feeding of *Lymnaea*. *Mol. Brain Res.* 37, 267–272. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00333-N](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00333-N)
- Li, L., Floyd, P.D., Rubakhin, S.S., Romanova, E. V., Jing, J., Alexeeva, V.Y., Dembrow, N.C., Weiss, K.R., Vilim, F.S., Sweedler, J. V., 2001. Cerebrin prohormone processing, distribution and action in *Aplysia californica*. *J. Neurochem.* 77, 1569–1580. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00360.x>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lloyd, P.E., 1989. Peripheral actions of the SCPs in *Aplysia* and other Gastropod Molluscs. *Integr. Comp. Biol.* 29, 1265–1274. <https://doi.org/10.1093/icb/29.4.1265>
- López-Doval, J.C., Freixa, A., Santos, L.H.M.L.M., Sanchís, J., Rodríguez-Mozaz, S., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2019. Exposure to single and binary mixtures of fullerenes and triclosan: Reproductive and behavioral effects in the freshwater snail *Radix balthica*. *Environ. Res.* 176, 108565. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108565>
- Matsuo, R., Kobayashi, S., Watanabe, S., Namiki, S., Iinuma, S., Sakamoto, H., Hirose, K., Ito, E., 2009. Glutamatergic neurotransmission in the procerebrum (olfactory center) of a terrestrial mollusk. *J. Neurosci. Res.* 87, 3011–3023. <https://doi.org/10.1002/jnr.22130>
- Mazzitelli, J.-Y., Bonnafe, E., Klopp, C., Escudier, F., Geret, F., 2017. De novo transcriptome sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover genes and pathways affected by exposure to oxazepam. *Ecotoxicology* 26, 127–140. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1748-1>
- Mazzitelli, J.-Y., Budzinski, H., Cachot, J., Geffard, O., Marty, P., Chiffre, A., François, A., Bonnafe, E., Geret, F., 2018. Evaluation of psychiatric hospital wastewater toxicity: what is its impact on aquatic organisms? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 26090–26102. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2501-5>
- Miller, M.W., 2019. GABA as a neurotransmitter in Gastropod Molluscs. *Biol. Bull.* 236, 144–156. <https://doi.org/10.1086/701377>
- Nezlin, L., Voronezhskaya, E., 1997. GABA-immunoreactive neurones and interactions of GABA with serotonin and FMRFamide in a peripheral sensory ganglion of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res.* 772, 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00835-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00835-4)
- OECD, 2016a. Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* reproduction test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264264335-en>
- OECD, 2016b. Test No. 242: *Potamopyrgus antipodarum* Reproduction Test, OECD Publication. <https://doi.org/10.1787/9789264264311-en>
- Olsen, L.R., Gabel-Jensen, C., Wubshet, S.G., Kongstad, K.T., Janfelt, C., Badolo, L., Hansen, S.H., 2016. Characterization of midazolam metabolism in locusts: The role of a CYP3A4-like enzyme in the formation of 1'-OH and 4-OH midazolam. *Xenobiotica* 46, 99–107. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1051604>
- Orias, F., Perrodin, Y., 2014. Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere* 115, 31–39. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.01.016>
- Pavlova, G.A., 2001. Effects of serotonin, dopamine and ergometrine on locomotion in the pulmonate mollusc *Helix lucorum*. *J. Exp. Biol.* 204.
- Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P., Jacquin, L., 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Sci. Total Environ.* 684, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

- Rivetti, C., Climent, E., Gómez-Canela, C., Barata, C., 2019. Characterization of neurotransmitter profiles in *Daphnia magna* juveniles exposed to environmental concentrations of antidepressants and anxiolytic and antihypertensive drugs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 5867–5876. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01968-y>
- Romanova, E., Rubakhin, S., Rozsa, K., 1996. Behavioral changes induced by GABA-receptor agonists in *Lymnaea stagnalis* L. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 27, 1067–1071. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)00122-0](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)00122-0)
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 333–342. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7604>
- Saaristo, M., Lagesson, A., Bertram, M.G., Fick, J., Klaminder, J., Johnstone, C.P., Wong, B.B.M., Brodin, T., 2019. Behavioural effects of psychoactive pharmaceutical exposure on European perch (*Perca fluviatilis*) in a multi-stressor environment. *Sci. Total Environ.* 655, 1311–1320. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.228>
- Santama, N., Brierley, M., Burke, J.F., Benjamin, P.R., 1994. Neural network controlling feeding in *Lymnaea stagnalis*: Immunocytochemical localization of myomodulin, small cardioactive peptide, buccalin, and FMRFamide-related peptides. *J. Comp. Neurol.* 342, 352–365. <https://doi.org/10.1002/cne.903420304>
- Seddon, M.B., Kebapçı, U., Van Damme, D., Prie, V., 2014. *Radix balthica*. IUCN Red List Threat. Species 2014 e.T155647A42430553. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T155647A42430553.en>
- Sharpe, C.S., Thompson, D.A., Lee Blankenship, H., Schreck, C.B., 1998. Effects of routine handling and tagging procedures on physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Progress. Fish-Culturist* 60, 81–87. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1998\)060<0081: EORHAT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1998)060<0081: EORHAT>2.0.CO;2)
- Snigirov, S., Sylantsev, S., 2018. GABAA receptors activate fish feeding behaviour via two distinct functional pathways. *J. Exp. Biol.* 221. <https://doi.org/10.1242/jeb.170514>
- 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>
- Sundin, J., Jutfelt, F., Thorlacius, M., Fick, J., Brodin, T., 2019. Behavioural alterations induced by the anxiolytic pollutant oxazepam are reversible after depuration in a freshwater fish. *Sci. Total Environ.* 665, 390–399. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.049>
- Syed, N.I., Winlow, W., 1991. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Physiol. A* 169, 557–568. <https://doi.org/10.1007/BF00193546>
- Tallarico, L. de F., 2016. Freshwater gastropods as a tool for ecotoxicology assessments in Latin America. *Am. Malacol. Bull.* 33, 330–336. <https://doi.org/10.4003/006.033.0220>
- Walker, C.R., Bandman, E., Strohman, R.C., 1979. Diazepam induces relaxation of chick embryo muscle fibers in vitro and inhibits myosin synthesis. *Exp. Cell Res.* 123, 285–291. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(79\)90470-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90470-1)
- Wedemeyer, H., Schild, D., 1995. Chemosensitivity of the osphradium of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 198, 1743–1754.
- Wullschleger, E.B., Jokela, J., 2002. Morphological plasticity and divergence in life history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *J. Molluscan Stud.* 68, 1–5. <https://doi.org/10.1093/mollus/68.1.1>
- Yaffe, H., Buxdorf, K., Shapira, I., Ein-Gedi, S., Moyal-Ben Zvi, M., Fridman, E., Moshelion, M., Levy, M., 2012. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC Res. Notes* 5, 45. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-45>

Supplementary information

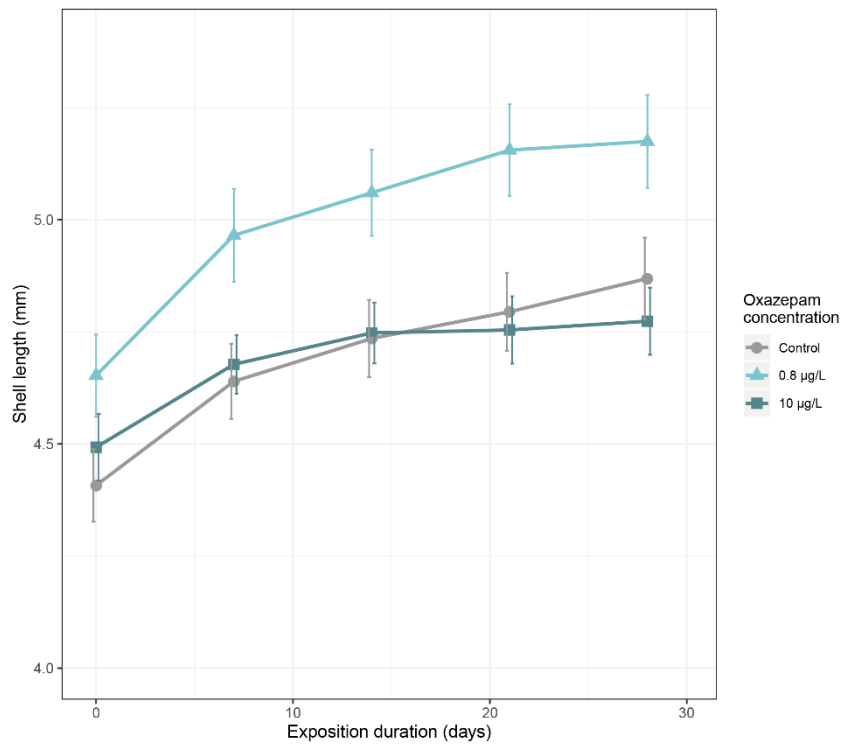


Figure 2-III-6 : Shell length (in mm) for each concentration of oxazepam ($n = 40$ individuals per concentration). Error bars indicate the mean \pm SE of the mean.

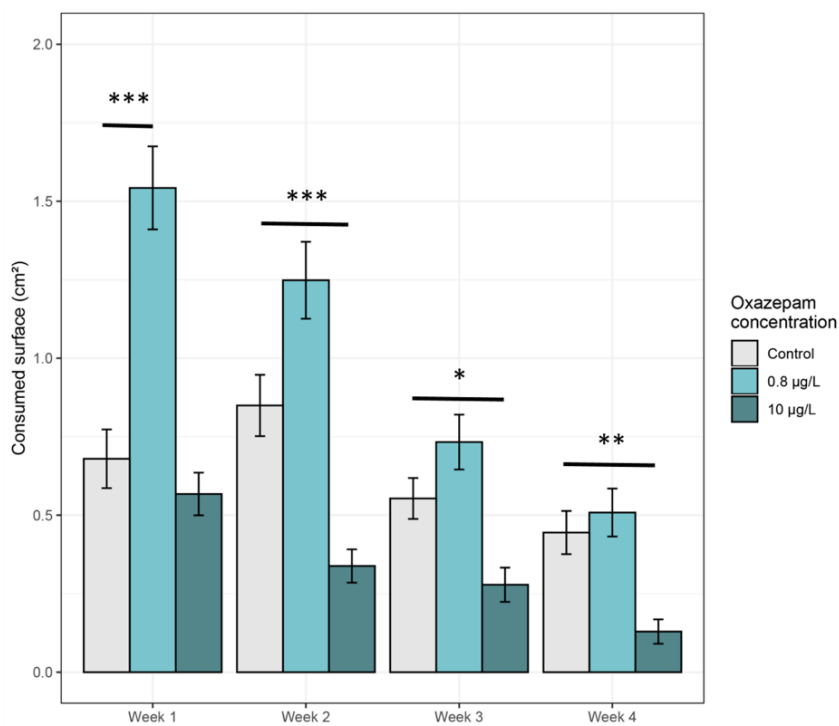


Figure 2-III-7 : Consumed surface (in cm^2) for each week of oxazepam exposure ($n = 40$ individuals per concentration). Error bars indicate the mean \pm SE of the mean. Stars represent significant differences between concentrations for the same week. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

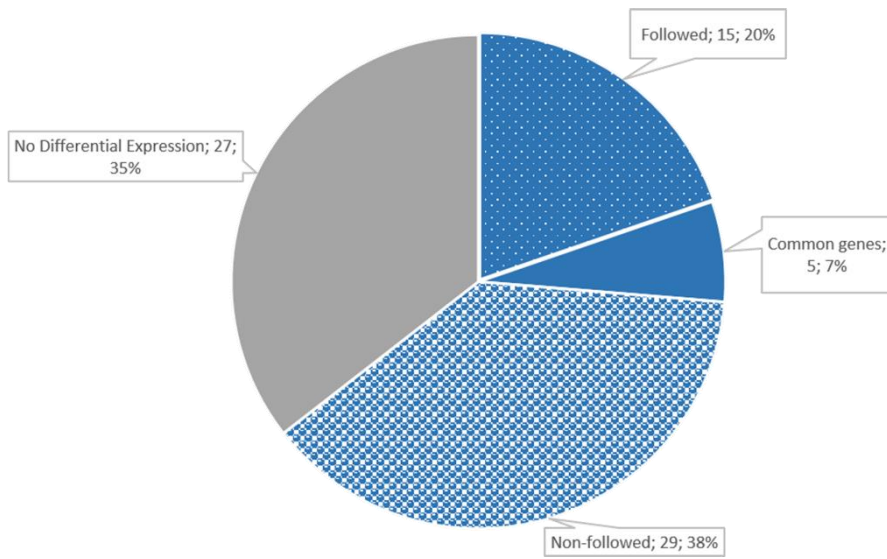


Figure 2-III-8 : Pie chart showing the number and the part of genes differentially expressed in 'Followed' and 'Non-followed' group, in both of groups and the part of non-differentially expressed genes.

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

A

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1 GGGGGCCAGGGCCAGCGAAAGCCAGCGGCTCAGAGAGAGGGCCACCAAGTGTCCGCAAGCGAGTGGACGACGGGAGCAGGTGAATAACCAACATGGACACCATGGAGCTGAAAG 120
1 G A R A K R K K A K R L R E R A T S V R K R V D D G E Q V N N T N M D T M E L K E 40
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 AGTCCACATGACGTCAGTGGGAATCACCAATGATCAGAGCTTCAACCTTGACCTTGATGATGGTCTGGAGATGCCACTGGCTTCGRGTGGCCGCCCCCGCCACGAGGTCAATCAGCC 240
41 V H M T S V G I T N S Q S F N L D L D D G S G D A T G F R V A P P A T R S F S H 80
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 ATTCTCACAGCGACACAGCGGTACATCCCACTGCGCTCAGGCGGCGCAGCAGTCTCACGTGCCGCCACGACGACGACGGCTTTATCTCACTTCGGCAGAAAGCCCAAGTCCA 360
81 S H S A T H G Y I P T T A V R R R S S S H V P P R R R R L L S H F R Q K A K S I 120
-----|-----|
361 TCAAGGTGAGAAATCCCGC 380
121 K V R N P A 126

```

B

```

GABA_A_LymnaeaS MWGIIVFFSASLMCSLVAVVRQQDTHFANVTNTIDSLKGVDIRLRPSFGAPLEIGIEVILASFDSISEVMDYITIMVNLQVWRDERLQIFIFNESLDLGENRSVTMTLTGAFAE
GABA_A_RadixB -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GABA_A_LymnaeaS KIVVDFFLANDKNSFLHDITERKRMVRLYGNLSLVYGMRFITLACMMLDHNYPDLDHGECTVEIESYGYTMDIVLYMLNDRGAVSVEVSLPQFSITNYATINKIEELSTGDPYQLS
GABA_A_RadixB -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GABA_A_LymnaeaS LIPQLQRNIGYFIFQTYLPSILIVMLSWVSWINHEATSARVALGITTVLMTTISNGVRSLSLPRISYVKAIDIIYLMCFVVFVAALLEYAAVNYTWGAKARRKAKRLERATSVRRRV
GABA_A_RadixB -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
GABA_A_LymnaeaS DDGQVNNNTMDDLEKEVHMVPSVGVNNSQSPNLDLDDGSGDPCGRVVPVPRSEHAKSRATTHGYIPTVRRRSSSHVPPRRRLLSHFRQAKSIVKIPRVQDVNTIDKYARL
GABA_A_RadixB DDGQVNNNTMDDLEKEVHMVPSVGVNNSQSPNLDLDDGSGDPCGRVVPVPRSEHAKSRATTHGYIPTVRRRSSSHVPPRRRLLSHFRQAKSIVKIPRVQDVNTIDKYARL
GABA_A_LymnaeaS MFPLLFIFENTSYWSVYLLT
GABA_A_RadixB -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

```

Figure 2-III-9 : A : Partial nucleotide and deduced amino acid sequences of *Radix balthica* Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta. Partial nucleotide sequence has been isolated with a RT-PCR approach using primers (forward: GGTCAATGTGCTTCGTTCTCG, reverse: CGCGGGATCTTCACCTTGAT) designed based on *Lymnaea stagnalis* (X58638.1), *Biomphalaria glabrata* (XM_013214518.1) and *Ambigolimax valentianus* (AB473944.1) gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta sequences and direct sequencing of cleaned PCR product (Genoscreen, Lille, France). B : Alignment of deduced amino acid sequences of *Radix balthica* with *Lymnaea stagnalis* GABA receptor subunit beta (accession number : P26714). Identical residues are highlighted in black and similar residues in grey. Nucleotide sequence and the deduced open reading frame has been edited with showorf available on emboss explorer (<http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>). Alignment has been performed on seaview v3.2 software using clustalw alignment program and edited with boxshade v3.31.

Table 2-III-4 : Primer sequences (forward and reverse) used for RT-qPCR and their efficiencies. Primers were designed using Primer 3 software (v 4.1.0).

Gene name	Contig name	Reference sequence (Uniprot or NCBI)	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Efficiency (%)
Molluscan insulin-related peptide receptor	k37_Locus_3166_Transcript_4_1	Q25410 (<i>Lymnaea</i>)	TGGTGTGAGCCCCAATGATC	CTTGACGCCACCCAAACAAT	108.9
Molluscan insulin-related peptide isoform 1	k61_Locus_11419_Transcript_1_1	P07223 (<i>Lymnaea</i>)	TGACGGTCACAGTCGTATC	CCTTGAATGTTGACCCGACG	97.7
Molluscan insulin-related peptide isoform 2	CL17062Contig1_1	P07223 (<i>Lymnaea</i>)	GTGCCAGCTTCGTTTAACC	TGTGAGCGTTCGTTGCATTG	102.2
Molluscan insulin-related peptide isoform 3	k49_Locus_24925_Transcript_1_1	P07223 (<i>Lymnaea</i>)	CGTGCCAGCCTCATTTCAC	GTTGCGGGTAATGTCGCATC	93.5
Molluscan insulin-related peptide isoform 4	CL10005Contig1_1	P07223 (<i>Lymnaea</i>)	CGCTTTGTTGGTCACAGTGG	CCTAGACGATGTGGAGTGCC	/
Molluscan insulin-related peptide III	k43_Locus_5328_Transcript_2_1	P80090 (<i>Lymnaea</i>)	ACCTACCAACACACCTGCAG	GCTACACAACCACTGGACCA	/
Molluscan insulin-related peptide VII	k49_Locus_7036_Transcript_5_1	P91797 (<i>Lymnaea</i>)	ATCCCTACCCACCTGAGAC	ACTTGGCTCTGACCTGACCT	81.6
Ubiquitin-like fold modifying protein	CL5593Contig1_1	DW986191 (<i>Haliotis</i>)	ACCAGAGGTAGCACCATTAC	CGGTACGTTGGTATCAACCTT	101.6
Soma ferritin	k49_Locus_5009_Transcript_3_1	P42577 (<i>Lymnaea</i>)	TGATGTTGCACTTCTCTGGCT	TCAAGACCAGTGCCCAATTC	102.9
Calmodulin	k31_Locus_13820_Transcript_2_1	DW986371 (<i>Haliotis</i>)	CATCACAAACAAAAGAGCTGGGG	ATATCTTGAAGCTCCGCCTCTG	95.1

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

Schistosomin	CL12774Contig1_1	P24471 (<i>Lymnaea</i>)	TGCAGAAACGGCCTGAAATTG	TCGCTGTTGTCTCCAGTACAC	101.8
Carbonic anhydrase	k49_Locus_7654_Transcript_3_1	Q92051 (<i>Danio</i>)	CCATGCTGTGAGAGTGCCA	GTAGTGGTGCCCGGAAGTTT	97.4
Nitric Oxide Synthase	Rp1_NOS.3.7	O61309 (<i>Lymnaea</i>)	AACACACAAGGTGCCTCGG	CACTTGGTCTGGAGGAGGTG	107.5
FMRF Receptor	Rp1_contig_37496	Q25011 (<i>Helix</i>)	ACCTGTTCGCTGACATAGGC	CCGGAAGTTGAACTCTGGGG	83.4
FMRFamide precursor 1	Rp1_FMRF	P19802 (<i>Lymnaea</i>)	GAACAGCCAGACGTCGATGA	ACCGTTTCTCTTTTCGCCA	98.3
FMRFamide related peptide precursor 2	Rp1_FARX	P42565 (<i>Lymnaea</i>)	ACCGACGCAAAAGATCAACAG	TCCAGGTTGTTTCGTCGGAA	82.1
Small Cardio Peptides A and B	Rp1_contig_22369_6	O97374 (<i>Lymnaea</i>)	CAAGAATGGGCAGATCGGGT	ACCTCCTCAGTCCCTCACA	96.6
Myomodulin neuropeptide	k69_Locus_17002_Transcript_1_1	P15513 (<i>Aplysia</i>)	TCCTGAACATGATCGAGGCG	CGACTGTGATTGCTGAGCCT	99.6
Cerebral peptide 1	k49_Locus_5648_Transcript_1_1	Q10998 (<i>Aplysia</i>)	ATGGATCAAGAGAAGCGGGC	TTGCCAGATCGTTTTCCCA	/
LFRFamide	k55_Locus_7646_Transcript_2_1	Q5U900 (<i>Lymnaea</i>)	TGAGAACACGGAGGACAAGC	CCTGGACATCTCTCTCGCC	109.1
Buccalin	CL11954Contig1_1_5	P20481 (<i>Aplysia</i>)	AGCGTGGACTGGATCGATTG	TCCAAGTCTCCGTGTCAGC	98.9
Feeding circuit activating peptide (FCAPs)	CL521Contig2_1	Q8ISH7 (<i>Aplysia</i>)	GAGTCTCTGTGCAGCCTGA	TTGTCGCTCCTACTGATGGC	94.3
Pedal peptide	CL5726Contig1_1	Q7Z162 (<i>Lymnaea</i>)	GATTTGCCAGAAGTGCAGCAA	CTTGAAGAGCGTCCCAGTCAT	96.2
Tetradecapeptide	k25_Locus_1533_Transcript_4_1	2003178A (<i>Lymnaea</i>)	TGACCTTACAGGTTGGCGTG	TTCGCTCTGAAGCCTCGTTT	98.4
Lymnaea Inhibitory Peptides	k49_Locus_1654_Transcript_2_1	No sequence (see Li <i>et al.</i> 1995)	ATGCTCCTTACTTGTGCGCC	TCATCGAAGTCCAGGTCCT	95.3
Proneuropeptide Y	CL11572Contig1_1	Q27441 (<i>Aplysia</i>)	GCCGTCATGGAGTACTCTG	GAATCTGGTCTGCCAACGA	103.8
Cerebrin prohormone	CL6435Contig1_1	Q8T112 (<i>Aplysia</i>)	TACAAGGGACATCGGCTTCC	CCTCCTGCCAACCTCCAAAA	101.0
Peripheral Benzodiazepine Receptor	Rp1_contig_06981	P50637 (<i>Mus</i>)	TGGTGGAGGATTTGGTGGTG	CCTGCTGTCTCATTTACCCCA	99.1
GABA-A beta subunit receptor	<i>R. balthica</i> GABA-A receptor beta subunit (see Figure 2-III-9 Supplementary information)	P26714 (<i>Lymnaea</i>)	ACACCATGGAGCTGAAAGAGG	CGCTGTGAGAATGGCTGAATG	105.4
GABA-B1 receptor	k55_Locus_13307_Transcript_2_1	FX183485.1 (<i>Lymnaea</i>)	TTGCAGAGAGGGGCATGAAG	GAGAACGCCACATTCCAGA	102.5
Glutamate decarboxylase	Rp1_contig_32941	FX184910.1 (<i>Lymnaea</i>)	GCAGCTCCAGTGTTCACCT	ATTGGATATAGCACCGCCCG	95.5
Glutamate receptor	CL12085Contig1_1	P26591 (<i>Lymnaea</i>)	TCGTTGTGGCTGTTCTGTCA	GCCGCTTTTGTCCGTGTC	93.4
Glutamate transporter	Rp1_contig_31550	P34644 (<i>Caenorhabditis</i>)	TTACACGAGATACCGACCG	CACAGAGTTGGAAGCCCCA	87.4
Tryptophan hydroxylase	Rp1_LOC100533407.1.2_2	Q9NJQ3 (<i>Lymnaea</i>)	CCTGAACCTGACGTATGCCA	GAAGACCAGCTCCATAGGCC	99.7
5-hydroxytryptamine receptor	Rp1_5HTR_4	Q25414 (<i>Lymnaea</i>)	GGACCTGCATCATCTCCAG	AGCGTCGTTTCTCCGTCTT	99.3
Tyrosine hydroxylase	Rp1_contig_38840_5	I7HAL1 (<i>Lymnaea</i>)	AAAGTTTGACAGTTCGCC	GCCCCACTCAAGCTGTTTTG	101.8
Dopa decarboxylase	Rp1_contig_13831_6	I7H188 (<i>Lymnaea</i>)	AGTCCACGCTTACTTCCCG	AACACTCCACCTTTTCCCG	87.9
Dopamine / serotonin transporter	Rp1_LOC100533265.1.2	FX185022.1 (<i>Lymnaea</i>)	TCCAAGACTGCGTTCGAA	CACACGCTGTCAACACCAG	92.0

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

Acetylcholinesterase	Rp1_ACES.1.2	XP_022258371.1 (<i>Limulus</i>)	ATAGAGACAGCCCGGGAGTT	GGGTCGGTTGTGAGGAAGTA	94.2
Acetylcholine-binding protein	k65_Locus_10689_Transcript_1_1	P58154 (<i>Lymnaea</i>)	ACAACGCCATCTCCAAACCT	TTGATTGACACGTAGCCCC	95.9
Tyramine beta hydroxylase	Rp1_DOPO	I7HHD7 (<i>Lymnaea</i>)	GTCACAGTAGCGGGTTCTC	GAGGGGAGGTGCTGTAGAGA	/
Calcium-dependent protein kinase C	k61_Locus_259_Transcript_2_1	Q16974 (<i>Aplysia</i>)	TGGCTCTCTACTGTACGGCT	TCAGATGTATCCTCCGCGC	92.5
cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	k61_Locus_3605_Transcript_17_1	P31319 (<i>Aplysia</i>)	TTGACAGGGACAGTTACCGC	TAGCCTCTCCCACTTGCCA	102.0
cGMP-dependent protein kinase 1	k37_Locus_16289_Transcript_3_1	P32023 (<i>Drosophila</i>)	GGCACTACAACAATGGCG	ACCGTATCACCTGCTCTCT	107.0
Phosphodiesterase 5	Rp1_contig_26818	P91119 (<i>Caenorhabditis</i>)	TCTTCAAGAACAGGGTCACC	TGCTGCCAAACTCTCCAT	/
G-protein coupled receptor GRL101	CL3544Contig1_1	P46023 (<i>Lymnaea</i>)	TTGCGAGACCTACATCTGCC	TTCGTCAGAGTCATGCCAC	94.0
Neurocalcin	k37_Locus_9128_Transcript_1_1	Q16982 (<i>Aplysia</i>)	CGCACGTTTGACACTAACGG	CATACTGAAGGCCACGCGAA	102.9
Otopetrin	Rp1_contig_20905	K1QHZ1 (<i>Crassostrea</i>)	ACAAGCCGGTGTAGGAGATG	CAACACGGAGGAAGTCCATT	95.5
Lymna-DF-amide	k69_Locus_13060_Transcript_1_1	P80181 (<i>Lymnaea</i>)	GGAAAAGGAGCGAGGTCACA	CGTCAGGGCTTACCAGAAGG	107.0
Soluble guanylyl cyclase beta-1 subunit	k31_Locus_938_Transcript_10_1	Q54865 (<i>Mus</i>)	GCGATCATGTCCAGTTTGCC	AAGGAAACGCTCGGCAAAAC	/
Beta-1,4-endoglucanase isoform 1	k69_Locus_7115_Transcript_1_1	A0SGJ5 (<i>Ampullaria</i>)	CTCTGGCCTGACGCTTACAA	CAGTAGCCGTGGTCAGTACC	96.3
Beta-1,4-endoglucanase isoform 2	k25_Locus_2591_Transcript_38_1	A0SGJ5 (<i>Ampullaria</i>)	TCTTGAAGCCTACACAGCCG	TTACCGTGTCTTGGAGGCC	95.1
Beta-1,4-endoglucanase isoform 3	k55_Locus_2653_Transcript_1_1	A0SGJ5 (<i>Ampullaria</i>)	TACCTCATGTACGCCGATGC	TAGCCGTGATCTTGACCAGC	89.9
Beta-1,4-endoglucanase isoform 4	CL13021Contig1_1	A0SGJ5 (<i>Ampullaria</i>)	GTCCCAATCTACCTGCTCCG	AGGGCACCGTAAAGGATGTG	98.3
Fructose-bisphosphate aldolase	k25_Locus_13729_Transcript_1_1	P91759 (<i>Lymnaea</i>)	AACCCTGGCCACTGACTTTC	TTCATCTTTGCCCCCAT	95.1
Alpha amylase isoform 1	k25_Locus_20118_Transcript_1_1	P91778 (<i>Pecten</i>)	GACAACCAGAGAGGTCACGG	AGTGCCAGCTTGAAGGTC	95.0
Alpha amylase isoform 2	CL7909Contig1_1	P91778 (<i>Pecten</i>)	AGTGTGAGCGATTCTTGGGG	GGACGGTTGGGGTTAGCTAC	/
Lysosomal Glucosylceramidase	k25_Locus_10891_Transcript_3_1	P17439 (<i>Mus</i>)	TAATTGGACAACCAGGAGGGC	CGTTGGAGCTCAGGTGTGAA	100.7
Non-lysosomal Glucosylceramidase	k31_Locus_3434_Transcript_1_1	Q69ZF3 (<i>Mus</i>)	AGTGATGGTGGCTCAGTGTG	AGCATCAACAGGGCAAAGGA	93.3
Neutral alpha-glucosidase AB	k49_Locus_2384_Transcript_8_1	Q8BHN3 (<i>Mus</i>)	TCGAAAAGACAGGAGTGCC	GTCAACCACTGGCCTCAGAA	94.1
Tropomyosin-2	k55_Locus_1388_Transcript_12_1	P43689 (<i>Biomphalaria</i>)	GGAGAACGCCTTGGATAGGG	TCTGTGAGGATTCTGTTGGC	108.1
Tektin 1	Rp1_LOC101863935	A0A210PWY8 (<i>Mizuhopecten</i>)	TGCTGATGTGAAAGACAGC	GGACAGCCCATCAAGTTTGT	100.9
Tektin 2	Rp1_LOC101851499	A0A210QBS5 (<i>Mizuhopecten</i>)	GGAAGTACCACCCTCAACA	TTCTGTGGCTTGTCTGTG	101.1
Dynein Heavy Chain	Rp1_LOC101864163	A0A210QH83 (<i>Mizuhopecten</i>)	ATGACCAAAGCCCATGAGAC	CAAGTAGAGCGGGTTCAGAG	95.1
Dynein Light Chain	Rp1_LOC101844988	Q26630 (<i>Strongylocentrotus</i>)	GTCCAACCTCCTTCTGCC	CTTCTGTCCAGCTCCTCCTG	103.5
Myosin Heavy Chain, striated muscle	k25_Locus_4099_Transcript_11_1	P24733 (<i>Aequipecten</i>)	ACCGAGTCAACGAAGTGTCC	CCTGAACGTCTCCCTCAAC	94.2
Myosin regulatory Light Chain A, smooth adductor muscle	k49_Locus_2039_Transcript_5_1	P04113 (<i>Mizuhopecten</i>)	GTGAAAAGCTCAGCGGCAC	GGAATGAAACCTTGCCCTCG	93.0

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

MDR 1	Rp1_LOC101845316.7.8	K1QEN4 (<i>Crassostrea</i>)	CCTGGCTACCCCTGTGGTAA	ATCCGGTCAACGTTTCAGAG	/
GST 3	Rp1_LOC101850431	O16116 (<i>Caenorhabditis</i>)	ATGGCCTGAAGATTGACCAG	AAGTTGATCCCACGAAATGG	94.3
Glutathion synthase	Rp1_LOC101847910	P51855 (<i>Mus</i>)	TTGCACAGACTAACGCTTGG	ACATTCCTCTCATCGCTGCT	100.6
Sigma GST	Rp1_contig_36971	XP_013071551 (<i>Biomphalaria</i>)	ACCCGGTTAAGAAGGAGGAA	CCACGGTGACCTTGAGAAAT	99.4
Catalase	k25_Locus_1421_Transcript_1_1	Q9PT92 (<i>Danio</i>)	AAGACTCCACTGGCTGTTCG	GTGTTGTTGCCACAAAGGTC	101.6
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	k31_Locus_7572_Transcript_3_1	A8XCP3 (<i>Caenorhabditis</i>)	GCTGGCGCTCATTTTAACCC	GCACCACTAAACTCCGACCA	90.3
Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	k37_Locus_18658_Transcript_1_1	Q694A3 (<i>Glossina</i>)	GCGGGCACATTAATCACACC	CCAGCTGATCCCTGAACTG	90.8
P450 49a1	Rp1_LOC101844963	XM_013079962 (<i>Aplysia</i>)	GATGGCATGGCACCTATCTT	CAAACGTGTCAGGCTATCA	108.5
P450 3A4 like	Rp1_LOC101846931	XP_013079454 (<i>Biomphalaria</i>)	TCTTGATCCTTGCTGCCTTT	CAGCAGTTGGCATAAGACGA	93.3
P450 2B4	Rp1_LOC101849380	XP_005100922 (<i>Aplysia</i>)	AATCCGGGAATTCCAATAG	GCCTGCTGTACGCTCCTCAA	/
P450 3A56 like	Rp1_LOC101860152.2.3	XP_013083288 (<i>Biomphalaria</i>)	CCAGGAGACCCGAACCTACA	AAAGCCAAATGGCAGAAATG	93.7
P450 2U1 like	Rp1_LOC101863471.1.9	XP_013062119 (<i>Biomphalaria</i>)	CCGCTGTCATCAATGTGTTT	TCAAACGTCTGGTGTACTGAA	85.3
ADAM 17	Rp1_LOC101849541.2.7	XP_013070652 (<i>Biomphalaria</i>)	ATCAGAGGCTTACGGTGAA	TCAAGAAATCCATTGCCACA	130.4
NOTCH	Rp1_LOC100880535	P07207 (<i>Drosophila</i>)	TCACACGGTTTCTCATTGCA	GGCTACGAGTGTATCTGCC	103.0
Furin	Rp1_contig_08568	Q9Y1A6 (<i>Lymnaea</i>)	TGCACCATTGGTATAGCCCC	GGCCAACTTTCAGGACCAT	95.3
Presenilin 1	Rp1_LOC100533344	Q4JIM4 (<i>Gallus</i>)	AGGACTTCTGCAGGACTCA	TGGCAGTACTGGTGTTCAC	95.0
Elongation Factor 1 alpha	Rp1_LOC101850460	P17508 (<i>Xenopus</i>)	CCTGGACACAGGGACTTCAT	TTGACGCCTATGATGAGCTG	81.3
Ribosomal Protein L18	Rp1_contig_00864	P12001 (<i>Rattus</i>)	GACCCCTTGGTGAACGAAGA	CAAGGCCGTGAAGACAAGAT	93.7
Tubulin	Rp1_TBB_2	P18699 (<i>Lymnaea</i>)	CGAGACCTACTGCATCGACA	ATGTTGACTGCCAGCTTCT	92.9

Table 2-III-5 : P. values of the side by side comparison (Mann Whitney U test) between 'Followed' and 'Not-Followed' groups. The control condition has been compared for all genes and exposed conditions have been compared for genes differentially expressed in both groups.

Gene name	P. val		
	Ctrl	0.8 µg/L	10 µg/L
<i>Molluscan insulin-related peptide receptor</i>	0.4894		
<i>Molluscan insulin-related peptide isoform 1</i>	0.7961		
<i>Molluscan insulin-related peptide isoform 2</i>	0.8883		
<i>Molluscan insulin-related peptide isoform 3</i>	0.8633		
<i>Molluscan insulin-related peptide VII</i>	1		
<i>Ubiquitin-like fold modifying protein</i>	0.8633		
<i>Soma ferritin</i>	0.7961	0.00123	1

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

<i>Calmodulin</i>	0.9314	0.11349	4.1135E-5
<i>Schistosomin</i>	1		
<i>Carbonic anhydrase</i>	0.9314		
<i>Nitric Oxide Synthase</i>	0.6664		
<i>FMRF Receptor</i>	0.8633		
<i>FMRFamide precursor 1</i>	0.7961		
<i>FMRFamide related peptide precursor 2</i>	1		
<i>Small Cardio Peptides A and B</i>	1		
<i>Myomodulin neuropeptide</i>	0.6805		
<i>LFRFamide</i>	0.6048		
<i>Buccalin</i>	0.6048		
<i>Feeding circuit activating peptide (FCAPs)</i>	0.9314		
<i>Pedal peptide</i>	0.8633		
<i>Tetradecapeptide</i>	0.8633		
<i>Lymnaea Inhibitory Peptides</i>	0.6664		
<i>Proneuropeptide Y</i>	0.6664		
<i>Cerebrin prohormone</i>	0.9314		
<i>Peripheral Benzodiazepine Receptor</i>	0.7961		
<i>GABA-A beta subunit receptor</i>	1		
<i>GABA-B1 receptor</i>	0.7961		
<i>Glutamate decarboxylase</i>	1		
<i>Glutamate receptor</i>	0.9314		
<i>Glutamate transporter</i>	0.9314		
<i>Tryptophan hydroxylase</i>	0.7961		
<i>5-hydroxytryptamine receptor</i>	0.8633		
<i>Tyrosine hydroxylase</i>	0.9314		
<i>Dopa decarboxylase</i>	0.7961		
<i>Dopamine / serotonin transporter</i>	0.4807		
<i>Acetylcholinesterase</i>	0.9314		
<i>Acetylcholine-binding protein</i>	1		
<i>Calcium-dependent protein kinase C</i>	0.7304		
<i>cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit</i>	0.6664		
<i>cGMP-dependent protein kinase 1</i>	1		
<i>G-protein coupled receptor GRL101</i>	1		
<i>Neurocalcin</i>	1		
<i>Otopetrin</i>	0.8633		
<i>Lymna-DF-amide</i>	0.9625		
<i>Beta-1,4-endoglucanase isoform 1</i>	0.9625		
<i>Beta-1,4-endoglucanase isoform 2</i>	0.8883		
<i>Beta-1,4-endoglucanase isoform 3</i>	0.7429		
<i>Beta-1,4-endoglucanase isoform 4</i>	0.8883		

Chapitre III : Perturbation de l'alimentation et modifications moléculaires chez *R. balthica* après exposition à de faibles concentrations d'oxazépam

<i>Fructose-bisphosphate aldolase</i>	0.7961	0.00078	4.1135E-5
<i>Alpha amylase isoform 1</i>	0.9625		
<i>Lysosomal Glucosylceramidase</i>	0.8633		
<i>Non-lysosomal Glucosylceramidase</i>	0.7304		
<i>Neutral alpha-glucosidase AB</i>	0.6664		
<i>Tropomyosin-2</i>	0.6048	8.2270E-5	0.03998
<i>Tektin 1</i>	0.9314		
<i>Tektin 2</i>	0.7961		
<i>Dynein Heavy Chain</i>	0.7304		
<i>Dynein Light Chain</i>	0.66647	0.000164	4.1135E-5
<i>Myosin Heavy Chain, striated muscle</i>	0.4894		
<i>Myosin regulatory Light Chain A, smooth adductor muscle</i>	0.5457		
<i>MDR 1</i>	0.7961		
<i>GST 3</i>	0.7961		
<i>Glutathion synthase</i>	1		
<i>Sigma GST</i>	0.9314		
<i>Catalase</i>	1		
<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>	0.7961		
<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	1		
<i>P450 49a1</i>	1		
<i>P450 3A4 like</i>	1		
<i>P450 3A56 like</i>	0.6729		
<i>P450 2U1 like</i>	1		
<i>ADAM 17</i>	0.8784		
<i>NOTCH</i>	0.5457		
<i>Furin</i>	0.8633		
<i>Presenilin 1</i>	0.9314		

Chapitre IV : Bilan général et perspectives

L'oxazépam est un médicament anxiolytique largement prescrit en Europe et retrouvé très fréquemment dans les cours d'eau. Depuis une demi-douzaine d'années, les études de toxicité de cette molécule se sont multipliées mais sont majoritairement focalisées sur des études de comportement chez le poisson. Très peu d'études s'étaient encore intéressées aux effets de l'oxazépam sur les invertébrés aquatiques, organismes pourtant essentiels aux écosystèmes et à la base de la chaîne trophique. Il nous est donc apparu nécessaire de contribuer à améliorer les connaissances à ce niveau en réalisant une étude globale, depuis l'œuf jusqu'à l'adulte, depuis les gènes jusqu'au comportement des organismes. Ainsi, ces travaux de thèse avaient pour objectifs i) d'étudier l'impact d'une exposition à l'oxazépam sur le cycle de vie du gastéropode d'eau douce *Radix balthica* ainsi que ii) d'apporter des éléments de compréhension quant-aux mécanismes d'actions mis en jeu dans cette réponse, en couplant les approches physiologiques et comportementales à l'approche transcriptomique. Chaque stade de vie ayant ses spécificités, il nous est apparu judicieux de diviser cette étude en trois volets, correspondant aux trois principaux stades de vie du gastéropode : le stade adulte, le stade embryonnaire et le stade juvénile.

Cette étude a permis de mettre en lumière de nombreux impacts de l'oxazépam, et ce à tous les stades de développement, avec un effet marqué sur la gamétogénèse mâle (augmentation de la production de spermatozoïdes par l'ovotestis), sur la fertilité (diminution du nombre d'œufs par ponte) et sur la fréquence cardiaque embryonnaire des embryons issus de géniteurs sauvages. Au stade juvénile, l'oxazépam a un effet important sur la mortalité (mortalité moins importante chez les individus exposés à faible concentration) et sur la prise alimentaire de *R. balthica*, sans impact cependant sur la croissance. Les effets sur la prise alimentaire sont d'autant plus intéressants qu'une faible concentration d'oxazépam (0,8 µg/L) provoque une stimulation de la prise alimentaire sur le court terme (la première semaine d'exposition) tandis qu'une exposition à plus forte concentration (10 µg/L) induit une inhibition de l'alimentation à partir de la deuxième semaine. Au stade adulte, une analyse de la locomotion sur plusieurs heures a mis en évidence une perturbation de la locomotion des individus exposés, notamment au bout de quelques heures de test. Ces résultats laissent penser que l'oxazépam perturberait le comportement exploratoire des individus.

L'analyse transcriptomique réalisée sur des gènes impliqués dans le système nerveux, la structure ciliaire et musculaire, ou encore dans la digestion au stade juvénile s'est également avérée très intéressante. Elle a permis dans un premier temps de mettre en évidence une sous-expression assez générale de gènes impliqués dans la transmission nerveuse, aussi bien au niveau du système nerveux central que périphérique, et liés au contrôle de différentes fonctions comme le comportement alimentaire, la croissance, la locomotion ou encore la chemoréception. Ces résultats permettent une meilleure compréhension des mécanismes de perturbation de la prise alimentaire observée. Cette analyse transcriptomique a également permis de mettre en évidence l'énorme variabilité de réponse moléculaire entre deux groupes d'individus, issus de la même population initiale, exposés dans les mêmes conditions mais ayant été ou non, utilisés pour des tests de comportements répétitifs au cours de l'exposition. En effet, les individus ayant été soumis aux tests de comportement présentent, au contraire de leurs congénères naïfs, une sur-expression de gènes impliqués principalement dans la digestion et la détoxification. Cette différence de réponse pourrait être liée à l'activité locomotrice plus importante des individus. Ces données mettent en lumière l'importance du choix des individus lors des analyses moléculaires.

Il est cependant apparu, au cours de cette étude, que certains points méritaient d'être analysés plus finement afin d'obtenir une réponse plus précise des organismes. C'est notamment le cas de la mesure de taille des organes reproducteurs. En effet, plutôt que de calculer la surface à partir d'une photographie, il serait possible, notamment grâce à de nouvelles technologies de reconstitution d'images en 3D, de calculer l'aire réelle de chaque organe. Cette technologie de reconstitution d'image (BioTek) a été acquise par le laboratoire, malheureusement trop tard pour pouvoir l'utiliser dans cette étude. Il pourrait être intéressant, pour la suite, de tester la pertinence de l'utilisation de ce nouvel outil lors des prochaines expérimentations. D'autres paramètres testés lors de cette expérimentation nécessitent encore des ajustements, tel que le test visant à mettre en lumière les interactions sociales et de reproduction après une période d'isolement. En effet, comme expliqué dans le chapitre I, le nombre d'individu suivi en simultané semble trop important pour caractériser à l'œil nu, le comportement reproducteur. Une assistance vidéo pourrait faciliter l'observation. De plus, au stade embryonnaire, l'analyse transcriptomique réalisée au niveau individuel s'est avérée peu concluante. Même si elle nous apporte quelques informations sur la réponse des

embryons à l'oxazépam, le nombre de gènes dont nous avons pu analyser l'expression reste très faible par rapport au nombre total de gènes testés. Ceci est principalement dû au fait que la quantité d'ARN extrait à partir d'un seul embryon est trop faible pour ce type d'analyse, les transcrits issus des gènes plus faiblement exprimés étant indétectables. Même si cette méthode semble attrayante, notamment en raison du fait qu'elle permet de rendre compte d'une réponse individuelle à l'exposition, il serait plus judicieux, pour les prochaines analyses transcriptomiques, de rester sur des pools de 10 individus, comme réalisé au cours de la thèse précédente (Mazzitelli, 2017).

Ce travail a également mis en lumière que certains paramètres étaient difficilement utilisables dans ces études d'écotoxicité. C'est le cas de la quantification du nombre d'accélération de rotation de l'embryon, qui s'est avéré compliqué à mettre en œuvre, notamment du fait de la variation de son taux basal en fonction du stade de développement. De plus, la forte variabilité de réponse entre chaque population d'individus et le traitement fastidieux des données ne nous permettent pas de valider ce paramètre physiologique comme potentiel biomarqueur.

Avant d'aller plus loin dans la caractérisation des effets de l'oxazépam sur *R. balthica*, il apparaît donc nécessaire de sélectionner les biomarqueurs qui ont montré une réponse intéressante face à l'oxazépam (comme la densité de spermatozoïdes, la mortalité, la prise alimentaire) et d'améliorer les biomarqueurs qui semblent pertinents (tels que la taille des organes reproducteurs, ou encore le suivi du comportement reproducteur). De plus, il apparaît que les analyses du comportement locomoteur réalisées au cours de ces études n'apportent pas de réponse claire quant aux perturbations comportementales. Ainsi, il serait peut-être plus intéressant de réaliser, comme ce qui se fait chez le poisson, des tests évaluant l'anxiété comme le test light/dark, qui a déjà été validé chez la planaire. Ce test permettrait de déterminer l'impact que pourrait avoir l'oxazépam sur la capacité du gastéropode à s'exposer à un environnement considéré comme dangereux. Les analyses transcriptomiques par qPCR nous ont également apporté des informations. Il serait cependant intéressant réaliser une étude sans a priori, telle que le RNAseq en différentiel, afin d'obtenir une réponse transcriptomique globale qui pourrait nous apporter davantage d'informations sur les mécanismes de toxicité de la molécule. Afin de faciliter l'annotation lors de ce type d'analyse, le séquençage du génome de *R. balthica* serait un plus. Il pourrait également être intéressant de réaliser une étude de protéogénomique afin d'avoir une réponse du protéome, qui pourrait

être complémentaire de l'analyse transcriptomique. Enfin, un dernier point à entreprendre pour les études futures serait le dosage de l'oxazépam dans les tissus des gastéropodes (glande digestive, ganglions nerveux) afin de mesurer sa bioaccumulation. En effet, cette information n'a pas été prise en compte dans ce travail de thèse et aurait constitué une donnée non négligeable pour la compréhension des mécanismes de toxicité.

En conclusion, ce travail de thèse est la première étude visant à caractériser les effets d'un anxiolytique sur l'ensemble du cycle de vie d'un mollusque aquatique. Cette étude a permis de mettre en évidence de nombreux effets de l'oxazépam, à chaque stade de la vie de *R. balthica*, et a également permis de sélectionner de potentiels nouveaux biomarqueurs pouvant être utilisés dans les futures analyses écotoxicologiques sur les gastéropodes. Les connaissances acquises lors de cette étude préliminaire pourraient nous permettre d'approfondir les recherches, notamment sur les effets multi ou transgénérationnels de l'oxazépam. De plus, sachant que cette molécule présente une forte affinité pour le sédiment en condition environnementale, il serait intéressant de mener des études en système plus complexe, en microcosme ou mésocosme afin de prendre en compte à la fois le comportement de l'oxazépam dans le milieu et sa toxicité en conditions plus réelles.

Références bibliographiques

- Ahlgren, J., Chapman, B.B., Nilsson, P.A., Brönmark, C., 2015. Individual boldness is linked to protective shell shape in aquatic snails. *Biol. Lett.* 11, 20150029. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0029>
- Ahlgren, J., Yang, X., Hansson, L.-A., Brönmark, C., 2013. Camouflaged or tanned: plasticity in freshwater snail pigmentation. *Biol. Lett.* 9, 20130464. <https://doi.org/10.1098/RSBL.2013.0464>
- Amorim, J., Abreu, I., Rodrigues, P., Peixoto, D., Pinheiro, C., Saraiva, A., Carvalho, A.P., Guimarães, L., Oliva-Teles, L., 2019. *Lymnaea stagnalis* as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. *Sci. Total Environ.* 669, 11–28. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.03.035>
- Andrade-Villagrán, P.V., Baria, K.S., Montory, J.A., Pechenik, J.A., Chaparro, O.R., 2018a. The influence of encapsulated embryos on the timing of hatching in the brooding gastropod *Crepidatella dilatata*. *J. Sea Res.* 131, 69–78. <https://doi.org/10.1016/J.SEARES.2017.11.004>
- Andrade-Villagrán, P.V., Mardones-Toledo, D.A., Paredes-Molina, F.J., Salas-Yanquin, L.P., Pechenik, J.A., Matthews-Cascon, H., Chaparro, O.R., 2018b. Possible mechanisms of hatching from egg capsules in the gastropods *Crepidatella dilatata* and *Crepidatella peruviana*, species with different modes of early development. *Biol. Bull.* 234, 69–84. <https://doi.org/10.1086/697641>
- Ansai, S., Hosokawa, H., Maegawa, S., Kinoshita, M., 2016. Chronic fluoxetine treatment induces anxiolytic responses and altered social behaviors in medaka, *Oryzias latipes*. *Behav. Brain Res.* 303, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.01.050>
- ANSM, 2017. Etat des lieux de la consommation des benzodiazépines en France.
- Aparicio-Simón, B., Piñón, M., Racotta, R., Racotta, I.S., 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture* 298, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.016>
- Argyropoulos, S.V., Nutt, D.J., 1999. The use of benzodiazepines in anxiety and other disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9. [https://doi.org/10.1016/S0924-977X\(99\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0924-977X(99)00052-8)
- Arshavsky, Y.I., Deliagina, T.G., Gamkrelidze, G.N., Orlovsky, G.N., Panchin, Y. V., Popova, L.B., Shupliakov, O. V., 1993. Pharmacologically induced elements of the hunting and feeding behavior in the pteropod mollusk *Clione limacina*. I. Effects of GABA. *J. Neurophysiol.* 69, 512–521. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.69.2.512>
- Arshavsky, Y.L., Gamkrelidze, G.N., Orlovsky, G.N., Panchin, Y. V., Popova, L.B., 1991. Gamma-aminobutyric acid induces feeding behaviour in the marine mollusc, *Clione limacina*. *Neuroreport* 2, 169–172. <https://doi.org/10.1097/00001756-199104000-00002>
- Bainbridge, J.G., 1968. The effect of psychotropic drugs on food reinforced behaviour and on food consumption. *Psychopharmacologia* 12, 204–213.

<https://doi.org/10.1007/BF00403774>

- Bandow, C., Weltje, L., 2012. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci. Total Environ.* 435–436, 90–95. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2012.07.005>
- Belal, I., Assem, H., 2011. Pharmacological mechanisms of diazepam in fish: Effect on growth. *J. Environ. Sci. Eng.* 5, 1363–1369.
- Benjamin, P.R., 2012. Distributed network organization underlying feeding behavior in the mollusk *Lymnaea*. *Neural Syst. Circuits* 2, 4. <https://doi.org/10.1186/2042-1001-2-4>
- Bertram, M.G., Ecker, T.E., Wong, B.B.M., O'Bryan, M.K., Baumgartner, J.B., Martin, J.M., Saaristo, M., 2018. The antidepressant fluoxetine alters mechanisms of pre- and post-copulatory sexual selection in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Environ. Pollut.* 238, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.006>
- Black, B.L., Olson, E.N., 1998. Transcriptional control of muscle development by Myocyte Enhancer Factor-2 (MEF-2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 167–196. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.167>
- Bodnárová, M., Martásek, P., Moroz, L.L., 2005. Calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase activity in the CNS of *Aplysia californica*: Biochemical characterization and link to cGMP pathways. *J. Inorg. Biochem.* 99, 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.01.012>
- Boer, H., Plesch, B., De Jong-Brink, M., 1970. Histological and histochemical observations on the reproductive tract of the hermaphrodite pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands J. Zool.* 21, 180–201.
- Bohlken, S., Joosse, J., 1981. The effect of photoperiod on female reproductive activity and growth of the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* kept under laboratory breeding conditions. *Int. J. Invertebr. Reprod.* 4, 213–222. <https://doi.org/10.1080/01651269.1981.10553430>
- Boisvieux-Ulrich, E., Laine, M.C., Sandoz, D., 1987. In vitro effects of benzodiazepines on ciliogenesis in the quail oviduct. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 333–344. <https://doi.org/10.1002/cm.970080406>
- Bonnafé, E., Sroda, S., Budzinski, H., Valière, A., Pedelluc, J., Marty, P., Geret, F., 2015. Responses of cytochrome P450, GST, and MXR in the mollusk *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 11033–11046. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4309-x>
- Bouétard, A., Besnard, A.L., Vassaux, D., Lagadic, L., Coutellec, M.A., 2013. Impact of the redox-cycling herbicide diquat on transcript expression and antioxidant enzymatic activities of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat. Toxicol.* 126, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.013>
- Boule, P., Bahnemann, D., Robertson, P., 2005. Environmental Photochemistry Part II, Environmental Photochemistry Part II. <https://doi.org/10.1007/b89482>
- Brambilla, G., Carrozzino, R., Martelli, A., 2007. Genotoxicity and carcinogenicity studies of

- benzodiazepines. *Pharmacol. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.08.006>
- Brandão, F.P., Rodrigues, S., Castro, B.B., Gonçalves, F., Antunes, S.C., Nunes, B., 2013. Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: Biochemical and behavioural effects. *Aquat. Toxicol.* 144–145, 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.005>
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science (80-)*. 339, 814–815. <https://doi.org/10.1126/science.1226850>
- Brodin, T., Nordling, J., Lagesson, A., Klaminder, J., Hellström, G., Christensen, B., Fick, J., 2017. Environmental relevant levels of a benzodiazepine (oxazepam) alters important behavioral traits in a common planktivorous fish (*Rutilus rutilus*). *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 80, 963–970. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1352214>
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130580–20130580. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0580>
- Brown, J.W., Schaub, B.M., Klusas, B.L., Tran, A.X., Duman, A.J., Haney, S.J., Boris, A.C., Flanagan, M.P., Delgado, N., Torres, G., Rolón-Martínez, S., Vaasjo, L.O., Miller, M.W., Gillette, R., 2018. A role for dopamine in the peripheral sensory processing of a gastropod mollusc. *PLoS One* 13, e0208891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208891>
- Brown, R.F., Houpt, K.A., Schryver, H.F., 1976. Stimulation of food intake in horses by diazepam and promazine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 5, 495–497. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(76\)90116-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(76)90116-7)
- Buckett, K.J., Dockray, G.J., Osborne, N.N., Benjamin, P.R., 1990. Pharmacology of the myogenic heart of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.* 63, 1413–25.
- Calisto, V., Domingues, M.R.M., Esteves, V.I., 2011. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments – Kinetics and photodegradation products. *Water Res.* 45, 6097–6106. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.09.008>
- Calisto, V., Esteves, V.I., 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77, 1257–1274. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2009.09.021>
- Carbó Tano, M., Molina, V.A., Maldonado, H., Pedreira, M.E., 2009. Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: The role of the GABAergic system. *Neuroscience* 158, 387–401. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.039>
- CEPMB, C. d'examen du P. des M.B., 2015. Rapport sur les principales tendances pharmaceutiques.
- Cervený, D., Brodin, T., Cisar, P., McCallum, E.S., Fick, J., 2020. Bioconcentration and behavioral effects of four benzodiazepines and their environmentally relevant mixture in wild fish. *Sci. Total Environ.* 702. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134780>
- Chamorro, S., Della-Zuana, O., Fauchère, J.L., Féléto, M., Galizzi, J.P., Levens, N., 2002. Appetite suppression based on selective inhibition of NPY receptors. *Int. J. Obes.* 26, 281–

298. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801948>
- Chen, F., Chen, S., Liu, S., Zhang, C., Peng, G., 2015. Effects of lorazepam and WAY-200070 in larval zebrafish light/dark choice test. *Neuropharmacology* 95, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.022>
- Chiffre, A., Clérandeau, C., Dwoinikoff, C., Le Bihanic, F., Budzinski, H., Geret, F., Cachot, J., 2016. Psychotropic drugs in mixture alter swimming behaviour of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) larvae above environmental concentrations. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4964–4977. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3477-4>
- Choubert, J.M., Martin-Ruel, S., Budzinski, H., Miège, C., Esperanza, M., Soulier, C., Ugarrigue, C., Coquery, M., 2011. Removal of micropollutants by domestic conventional wastewater treatment plants and advanced tertiary process: Specific method and results of the Amperes project. *Tech. - Sci. - Methodes* 44–62. <https://doi.org/10.1051/tsm/201101044>
- Chouinard, G., Lefko-Singh, K., Teboul, E., 1999. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: Benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem. *Cell. Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1023/A:1006943009192>
- Christopher, K., Chang, J., Goldberg, J., 1996. Stimulation of cilia beat frequency by serotonin is mediated by a Ca²⁺ influx in ciliated cells of *Helisoma trivolvis* embryos. *J. Exp. Biol.* 199.
- Christopher, K.J., Young, K.G., Chang, J.P., Goldberg, J.I., 1999. Involvement of protein kinase C in 5-HT-stimulated ciliary activity in *Helisoma trivolvis* embryos. *J. Physiol.* 515, 511–522. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.511ac.x>
- CNAM, 2018. Statistiques de remboursement des psychotropes.
- Cœurdassier, M., De Vaufleury, A., Badot, P.M., 2003. Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 102–109. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-0152-4>
- Cole, A., Mashkournia, A., Parries, S.C., Goldberg, J.I., 2002. Regulation of early embryonic behavior by nitric oxide in the pond snail *Helisoma trivolvis*. *J. Exp. Biol.* 205, 3143–3152.
- Cooper, S.J., 1980. Benzodiazepines as appetite-enhancing compounds. *Appetite* 1, 7–19. [https://doi.org/10.1016/S0195-6663\(80\)80005-5](https://doi.org/10.1016/S0195-6663(80)80005-5)
- Coutellec-Vreto, M.-A., Jarne, P., Guiller, A., Madec, L., Daguzan, J., 1998. Inbreeding and fitness in the freshwater snail *Lymnaea peregra*: an evaluation over two generations of self-fertilization. *Evolution (N. Y.)*. 52, 1635–1647. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb02244.x>
- Coutellec-Vreto, M.A., Madec, L., Guiller, A., 1997. Selfing and biparental inbreeding: A mating system analysis in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Heredity (Edinb.)*. 79, 277–285. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.155>
- Coutellec, M.-A., Lagadic, L., 2006. Effects of self-fertilization, environmental stress and exposure to xenobiotics on fitness-related traits of the freshwater snail *Lymnaea*

- stagnalis*. *Ecotoxicology* 15, 199–213. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0049-x>
- Coutellec, M.A., Besnard, A.L., Caquet, T., 2013. Population genetics of *Lymnaea stagnalis* experimentally exposed to cocktails of pesticides. *Ecotoxicology* 22, 879–888. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1082-9>
- Crabb, E.D., 1927. Anatomy and function of the reproductive system in the snail *Lymnaea stagnalis* appressa say. *Biol. Bull.* 53, 55–66. <https://doi.org/10.2307/1537030>
- Cropper, E.C., Evans, C.G., Hurwitz, I., Jing, J., Proekt, A., Romero, A., Rosen, S.C., 2004. Feeding neural networks in the mollusc *Apysia*. *Neurosignals* 13, 70–86. <https://doi.org/10.1159/000076159>
- Cunha, D.L., de Araujo, F.G., Marques, M., 2017. Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity—a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 24076–24091. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0170-4>
- da Silva, C., Biancardi, V., Patrone, L.G., Gargaglioni, L., 2019. Exposure to diazepam during pregnancy alters the breathing control in post-natal life. *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* 38.
- Daniel, W., 1995. Metabolism of psychotropic drugs: pharmacological and clinical relevance. *Pol. J. Pharmacol.* 47, 367–379.
- Das, S., Khangarot, B.S., 2011. Bioaccumulation of copper and toxic effects on feeding, growth, fecundity and development of pond snail *Lymnaea luteola* L. *J. Hazard. Mater.* 185, 295–305. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.09.033>
- De Boer, P.A.C.M., Jansen, R.F., Ter Maat, A., 1996. Copulation in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*: A review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 30, 167–176. <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672542>
- de Jesus Gaffney, V., Cardoso, V.V., Cardoso, E., Teixeira, A.P., Martins, J., Benoliel, M.J., Almeida, C.M.M., 2017. Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: Removal efficiency through conventional treatment processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 14717–14734. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9012-7>
- de Kermoisan, G., Joachim, S., Baudoin, P., Lonjaret, M., Tebby, C., Lesaulnier, F., Lestremau, F., Chatellier, C., Akrou, Z., Pheron, E., Porcher, J.-M., Péry, A.R., Beaudouin, R., 2013. Effects of bisphenol A on different trophic levels in a lotic experimental ecosystem. *Aquat. Toxicol.* 144–145, 186–198. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2013.09.034>
- Diefenbach, T.J., Koehncke, N.K., Goldberg, J.I., 1991. Characterization and development of rotational behavior in *Helisoma* embryos: Role of endogenous serotonin. *J. Neurobiol.* 22, 922–934. <https://doi.org/10.1002/neu.480220905>
- Dillen, L., Jordaens, K., Dieleman, W., Backeljau, T., 2008. Effects of isolation and body size on the mating behaviour of the hermaphroditic land snail *Succinea putris*. *Anim. Behav.* 75, 1401–1411. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2007.09.014>
- Dinis-Oliveira, R.J., 2017. Metabolic profile of oxazepam and related benzodiazepines: clinical and forensic aspects. *Drug Metab. Rev.* <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1377223>

- Djelal, H., Rigail, M., Boyer, L., 2008. Les effluents industriels et leur traitement. *Manag. Avenir* 20, 275. <https://doi.org/10.3917/mav.020.0275>
- Dogterom, A.A., 1980. The effect of the growth hormone of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* on biochemical composition and nitrogenous wastes. *Comp. Biochem. Physiol.* -- Part B Biochem. 65, 163–167. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90126-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90126-1)
- Dong, E., Matsumoto, K., Watanabe, H., 2002. Diazepam binding inhibitor (DBI) reduces testosterone and estradiol levels in vivo. *Life Sci.* 70, 1317–1323. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01502-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01502-8)
- Doran, S.A., Goldberg, J.I., 2006. Roles of Ca²⁺ and protein kinase C in the excitatory response to serotonin in embryonic molluscan ciliary cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84, 635–646. <https://doi.org/10.1139/y06-010>
- Dorelle, L.S., Da Cuña, R.H., Rey Vázquez, G., Höcht, C., Shimizu, A., Genovese, G., Lo Nostro, F.L., 2017. The SSRI fluoxetine exhibits mild effects on the reproductive axis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). *Chemosphere* 171, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.141>
- Drobnis, E.Z., Nangia, A.K., 2017. Psychotropics and male reproduction, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 63–101. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69535-8_8
- Duncan, C.J., 1958. The anatomy and physiology of the reproductive system of the freshwater snail *Physa fontinalis* (L.). *Proc. Zool. Soc. London* 131, 55–84. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1958.tb00633.x>
- Ehlers, S.M., Maxein, J., Koop, J.H.E., 2020. Low-cost microplastic visualization in feeding experiments using an ultraviolet light-emitting flashlight. *Ecol. Res.* 35, 265–273. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12080>
- Elekes, K., Hiripi, L., Balog, G., Maász, G., Battonyai, I., Khabarova, M.Y., Horváth, R., Voronezhskaya, E.E., 2018. Serotonergic regulation of the buccal (feeding) rhythm of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. An immunocytochemical, biochemical and pharmacological approach. *Acta Biol. Hung.* 69, 225–243. <https://doi.org/10.1556/018.68.2018.3.1>
- Elliott, C.J., Susswein, A.J., 2002. Comparative neuroethology of feeding control in molluscs. *J. Exp. Biol.* 205, 877–896.
- Elliott, C.J.H., Benjamin, P.R., 1989. Esophageal mechanoreceptors in the feeding system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.* 61, 727–736. <https://doi.org/10.1152/jn.1989.61.4.727>
- Elphick, M.R., Kemenes, G., Staras, K., O'Shea, M., 1995. Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc. *J. Neurosci.* 15, 7653–7664. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-11-07653.1995>
- Emery, D.G., 1992. Fine structure of olfactory epithelia of gastropod molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 22, 307–324. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070220402>
- Escobar, J.S., Auld, J.R., Correa, A.C., Alonso, J.M., Bony, Y.K., Coutellec, M.A., Koene, J.M.,

- Pointier, J.P., Jarne, P., David, P., 2011. Patterns of mating-system evolution in hermaphroditic animals: Correlations among selfing rate, inbreeding depression, and the timing of reproduction. *Evolution* (N. Y). 65, 1233–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01218.x>
- Fabbri, E., Capuzzo, A., 2010. Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 313, 179–200. <https://doi.org/10.1002/jez.592>
- Feldmeyer, B., Hoffmeier, K., Pfenninger, M., 2010. The complete mitochondrial genome of *Radix balthica* (Pulmonata, Basommatophora), obtained by low coverage shot gun next generation sequencing. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 1329–1333. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.09.012>
- Fick, J., Brodin, T., Heynen, M., Klaminder, J., Jonsson, M., Grabicova, K., Randak, T., Grabic, R., Kodes, V., Slobodnik, J., Sweetman, A., Earnshaw, M., Barra Caracciolo, A., Lettieri, T., Loos, R., 2017. Screening of benzodiazepines in thirty European rivers. *Chemosphere* 176, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.126>
- Filla, A., Hiripi, L., Elekes, K., 2009. Role of aminergic (serotonin and dopamine) systems in the embryogenesis and different embryonic behaviors of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.07.004>
- Fong, P.P., Ford, A.T., 2014. The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Aquat. Toxicol.* 151, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.003>
- Fotedar, S., Evans, L., 2011. Health management during handling and live transport of crustaceans: A review. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.011>
- Fraser, L.A., 1946. The embryology of the reproductive tract of *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 65, 279–298. <https://doi.org/10.2307/3223539>
- Fuertes, I., Campos, B., Rivetti, C., Pinã, B., Barata, C., 2019. Effects of Single and Combined Low Concentrations of Neuroactive Drugs on *Daphnia magna* Reproduction and Transcriptomic Responses. *Environ. Sci. Technol.* 53, 11979–11987. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03228>
- Fursdon, J.B., Martin, J.M., Bertram, M.G., Lehtonen, T.K., Wong, B.B.M., 2019. The pharmaceutical pollutant fluoxetine alters reproductive behaviour in a fish independent of predation risk. *Sci. Total Environ.* 650, 642–652. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.046>
- Gagné, F., André, C., Gélinas, M., 2010. Neurochemical effects of benzodiazepine and morphine on freshwater mussels. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 152, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.04.007>
- Gao, L., Doan, H., Nidumolu, B., Kumar, A., Gonzago, D., 2017. Effects of copper on the survival, hatching, and reproduction of a pulmonate snail (*Physa acuta*). *Chemosphere* 185, 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.101>
- Garcia-Galan, M.J., Sordet, M., Buleté, A., Garric, J., Vuillet, E., 2017. Evaluation of the

- influence of surfactants in the bioaccumulation kinetics of sulfamethoxazole and oxazepam in benthic invertebrates. *Sci. Total Environ.* 592, 554–564. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.03.085>
- Gebauer, D.L., Pagnussat, N., Piato, Â.L., Schaefer, I.C., Bonan, C.D., Lara, D.R., 2011. Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.021>
- Geraerts, W.P.M., 1976. Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 29, 61–71. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(76\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0016-6480(76)90007-1)
- Geraerts, W.P.M., de With, N.D., Vreugdenhil, E., van Hartingsveldt, W., Hogenes, T.M., 1984. Studies on the physiological role of a partially purified small cardioactive neuropeptide of *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Physiol. B* 154, 29–34. <https://doi.org/10.1007/BF00683213>
- Gething, K.J., Pickwell, A., Chadd, R.P., Wood, P.J., 2020. The effects of metaldehyde on non-target aquatic macroinvertebrates: Integrating field and laboratory-based evidence. *Environ. Pollut.* 265, 115015. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115015>
- Giacomini, A.C.V.V., Abreu, M.S., Giacomini, L. V., Siebel, A.M., Zimerman, F.F., Rambo, C.L., Mocelin, R., Bonan, C.D., Piato, A.L., Barcellos, L.J.G., 2016. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. *Behav. Brain Res.* 296, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.027>
- Goldberg, J.I., Doran, S.A., Shartau, R.B., Pon, J.R., Ali, D.W., Tam, R., Kuang, S., 2008. Integrative biology of an embryonic respiratory behaviour in pond snails: the “embryo stir-bar hypothesis”. *J. Exp. Biol.* 211, 1729–36. <https://doi.org/10.1242/jeb.016014>
- Goldberg, J.I., Rich, D.R., Muruganathan, S.P., Liu, M.B., Pon, J.R., Tam, R., Diefenbach, T.J., Kuang, S., 2011. Identification and evolutionary implications of neurotransmitter-ciliary interactions underlying the behavioral response to hypoxia in *Lymnaea stagnalis* embryos. *J. Exp. Biol.* 214, 2660–70. <https://doi.org/10.1242/jeb.053009>
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., Grabic, R., 2014. Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 111, 418–426. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.03.132>
- Gomot, A., 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 288–297. <https://doi.org/10.1006/EESA.1998.1711>
- González Alonso, S., Catalá, M., Maroto, R.R., Gil, J.L.R., de Miguel, Á.G., Valcárcel, Y., 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environ. Int.* 36, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.11.004>
- Granger Joly de Boissel, P., Gonzalez, P., Buleté, A., Daffe, G., Clérandeau, C., Vulliet, E., Cachot, J., 2017. An innovative and integrative assay for toxicity testing using individual fish embryos. Application to oxazepam. *Chemosphere* 181, 468–477.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.067>

- Greenblatt, D.J., Divoll, M., Abernethy, D.R., Ochs, H.R., Shader, R.I., 1983a. Clinical Pharmacokinetics of the Newer Benzodiazepines. *Clin. Pharmacokinet.* 8, 233–252. <https://doi.org/10.2165/00003088-198308030-00003>
- Greenblatt, D.J., Divoll, M., Abernethy, D.R., Ochs, H.R., Shader, R.I., 1983b. Benzodiazepine kinetics: Implications for therapeutics and pharmacogeriatrics. *Drug Metab. Rev.* 14, 251–292. <https://doi.org/10.3109/03602538308991391>
- Greenblatt, D.J., Shader, R.I., 1985. Clinical Pharmacokinetics of the Benzodiazepines, in: *The Benzodiazepines: Current Standards for Medical Practice*. Springer Netherlands, pp. 43–58. https://doi.org/10.1007/978-94-009-4886-0_3
- Griffin, R.J., Burka, L.T., Demby, K.B., 1995. Oxidative biotransformation of oxazepam to reactive and nonreactive products in rat, mouse and human microsomes. *Hum. Exp. Toxicol.* 14, 779–786. <https://doi.org/10.1177/096032719501401001>
- Guaitani, A., Marcucci, F., Garattini, S., 1971. Increased aggression and toxicity in grouped male mice treated with tranquilizing benzodiazepines. *Psychopharmacologia* 19, 241–245. <https://doi.org/10.1007/BF00401940>
- Guerriero, F.J., Fox, K.A., 1976. Benzodiazepines and reproduction of Swiss Webster mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 13, 601–610.
- Gupta, S.K., Singh, J., 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: A review. *IIOAB J.* 2, 49–57.
- Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R., Garric, J., 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environ. Pollut.* 157, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.040>
- Hall, J.D., Lloyd, P.E., 1990. Involvement of pedal peptide in locomotion in *Aplysia*: Modulation of foot muscle contractions. *J. Neurobiol.* 21, 858–868. <https://doi.org/10.1002/neu.480210604>
- Hallett, K.C., Atfield, A., Comber, S., Hutchinson, T.H., 2016. Developmental toxicity of metaldehyde in the embryos of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Pulmonata) co-exposed to the synergist piperonyl butoxide. *Sci. Total Environ.* 543, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.040>
- Hallgren, P., Sorita, Z., Berglund, O., Persson, A., 2012. Effects of 17 α -ethinylestradiol on individual life-history parameters and estimated population growth rates of the freshwater gastropods *Radix balthica* and *Bithynia tentaculata*. *Ecotoxicology* 21, 803–810. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0841-8>
- Haszprunar, G., 1985. The fine morphology of the osphradial sense organs of the Mollusca. 1. Gastropoda, Prosobranchia. *Philos. Trans. R. Soc. London. B, Biol. Sci.* 307, 457–496. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0003>
- Hawkins, L.E., Hutchinson, S., 1988. Egg capsule structure and hatching mechanism of *Ocenebra erinacea* (L.) (Prosobranchia : Muricidae). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 119, 269–283.

[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90197-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90197-9)

- Heberer, T., 2002. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J. Hydrol.* 266, 175–189. [https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00165-8)
- Hedgespeth, M.L., Karasek, T., Ahlgren, J., Berglund, O., Brönmark, C., 2018. Behaviour of freshwater snails (*Radix balthica*) exposed to the pharmaceutical sertraline under simulated predation risk. *Ecotoxicology* 27, 144–153. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1880-6>
- Hellström, G., Brodin, T., Jonsson, M., Olsen, H., Leander, J., Fahlman, J., Fick, J., Klaminder, J., 2020. Environmentally relevant concentrations of the common anxiolytic pharmaceutical oxazepam do not have acute effect on spawning behavior in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *J. Appl. Ichthyol.* 36, 105–112. <https://doi.org/10.1111/jai.13980>
- Hellström, G., Klaminder, J., Finn, F., Persson, L., Alanärä, A., Jonsson, M., Fick, J., Brodin, T., 2016. GABAergic anxiolytic drug in water increases migration behaviour in salmon. *Nat. Commun.* 7, 13460. <https://doi.org/10.1038/ncomms13460>
- Henry, T.B., Black, M.C., 2008. Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western Mosquitofish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 325–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9018-0>
- Hermann, P.M., De Lange, R.P.J., Pieneman, A.W., Ter Maat, A., Jansen, R.F., 1997. Role of neuropeptides encoded on CDCH-1 gene in the organization of egg-laying behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.* 78, 2859–2869. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.6.2859>
- Heynen, M., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., Brodin, T., 2016. Effect of bioconcentration and trophic transfer on realized exposure to oxazepam in 2 predators, the dragonfly larvae (*Aeshna grandis*) and the Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 930–937. <https://doi.org/10.1002/etc.3368>
- Hiripi, L., Elekes, K., 2010. A 5-HT_{1A}-like receptor is involved in the regulation of the embryonic rotation of *Lymnaea stagnalis* L. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 152, 57–61. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2010.02.012>
- Hoek, R.M., Li, K.W., Van Minnen, J., Lodder, J.C., De Jong-Brink, M., Smit, A.B., Van Kesteren, R.E., 2005. LFRFamides: A novel family of parasitism-induced -RFamide neuropeptides that inhibit the activity of neuroendocrine cells in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurochem.* 92, 1073–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02927.x>
- Holm, L.W., 1946. Histological and Functional Studies on the Genital Tract of *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 65, 45. <https://doi.org/10.2307/3223285>
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Ventura, F., 2010. Fast liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *J. Chromatogr. A* 1217, 4212–4222. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.007>
- Huerta, B., Margiotta-Casaluci, L., Rodríguez-Mozaz, S., Scholze, M., Winter, M.J., Barceló, D., Sumpter, J.P., 2016. Anti-anxiety drugs and fish behavior: Establishing the link between

- internal concentrations of oxazepam and behavioral effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2782–2790. <https://doi.org/10.1002/etc.3448>
- Hughes, I., Saito, M., Schlesinger, P.H., Ornitz, D.M., 2007. Otopetrin 1 activation by purinergic nucleotides regulates intracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12023–12028. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705182104>
- Hummel, D., Löffler, D., Fink, G., Ternes, T.A., 2006. Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7321–7328. <https://doi.org/10.1021/es061740w>
- Izquierdo, I., Medina, J.H., 1991. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 260–265. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90567-C](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90567-C)
- Jarne, P., Städler, T., 1995. Population genetic structure and mating system evolution in freshwater pulmonates. *Experientia*. <https://doi.org/10.1007/BF02143200>
- Jochemsen, R., Breimer, D.D., 1984. Pharmacokinetics of benzodiazepines: Metabolic pathways and plasma level profiles. *Curr. Med. Res. Opin.* 8, 60–79. <https://doi.org/10.1185/03007998409109545>
- Johnston, C.U., Clothier, L.N., Quesnel, D.M., Gieg, L.M., Chua, G., Hermann, P.M., Wildering, W.C., 2017. Embryonic exposure to model naphthenic acids delays growth and hatching in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Chemosphere* 168, 1578–1588. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.11.156>
- Joose, J., 1975. Structural and Endocrinological Aspects of Hermaphroditism in Pulmonate Snails, with Particular Reference to *Lymnaea stagnalis* (L.), in: *Intersexuality in the Animal Kingdom*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 158–169. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66069-6_16
- Kalichak, F., Idalencio, R., Rosa, J.G.S., Oliveira, T.A. de, Koakoski, G., Gusso, D., Abreu, M.S. de, Giacomini, A.C. V., Barcellos, H.H.A., Fagundes, M., Piato, A.L., Barcellos, L.J.G., 2016. Waterborne psychoactive drugs impair the initial development of Zebrafish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 41, 89–94. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2015.11.014>
- Kamardin, N.N., Shalanki, Y., Sh.-Rozha, K., Nozdrachev, A.D., 2001. Studies of chemoreceptor perception in mollusks. *Neurosci. Behav. Physiol.* 31, 227–235. <https://doi.org/10.1023/A:1005228711262>
- Kar, R.N., Das, R.K., 1983. Induction of sperm head abnormalities in mice by three tranquilizers. *Cytobios* 36, 45–51.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2009. Illicit drugs and pharmaceuticals in the environment - Forensic applications of environmental data, Part 2: Pharmaceuticals as chemical markers of faecal water contamination. *Environ. Pollut.* 157, 1778–1786. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.02.019>
- Kellett, E., Perry, S.J., Santama, N., Worster, B.M., Benjamin, P.R., Burke, J.F., 1996. Myomodulin gene of *Lymnaea*: structure, expression, and analysis of neuropeptides. *J. Neurosci.* 16, 4949–57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-16-04949.1996>

- Kelly, M.D., Smith, A., Banks, G., Wingrove, P., Whiting, P.W., Atack, J., Seabrook, G.R., Maubach, K.A., 2002. Role of the histidine residue at position 105 in the human $\alpha 5$ containing GABA A receptor on the affinity and efficacy of benzodiazepine site ligands . Br. J. Pharmacol. 135, 248–256. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704459>
- Khangarot, B.S., Das, S., 2010. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. J. Hazard. Mater. 179, 665–675. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.03.054>
- Kishi, K., Kanamori, S., Maruyama, T., Sasaki, K., Hara, K., Kawai, M., Ikeuchi, K., 1995. Potential parameters of male reproductive toxicity: reproductive performance, histopathology and sperm evaluation in SD rats given nitrazepam. J. Toxicol. Sci. 20, 329–339. <https://doi.org/10.2131/jts.20.329>
- Klaminder, J., Brodin, T., Sundelin, A., Anderson, N.J., Fahlman, J., Jonsson, M., Fick, J., 2015. Long-term persistence of an anxiolytic drug (oxazepam) in a large freshwater lake. Environ. Sci. Technol. 49, 10406–10412. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01968>
- Klaminder, J., Jonsson, M., Fick, J., Sundelin, A., Brodin, T., 2014. The conceptual imperfection of aquatic risk assessment tests: highlighting the need for tests designed to detect therapeutic effects of pharmaceutical contaminants. Environ. Res. Lett. 9, 084003. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/8/084003>
- Kodirov, S.A., 2011. The neuronal control of cardiac functions in Molluscs. Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol. 160, 102–116. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2011.06.014>
- Koene, J.M., 2010. Neuro-endocrine control of reproduction in hermaphroditic freshwater snails: Mechanisms and evolution. Front. Behav. Neurosci. 4, 167. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00167>
- Koene, J.M., Ter Maat, A., 2005. Sex role alternation in the simultaneously hermaphroditic pond snail *Lymnaea stagnalis* is determined by the availability of seminal fluid. Anim. Behav. 69, 845–850. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2004.07.012>
- Koene, Joris M, Kora, A.E., Ae, M.-W., Roelofs, Dick, Andries, A.E., Maat, T., Koene, J M, Montagne-Wajer, Á.K., Roelofs, Á.D., Maat, Á.A. Ter, Montagne-Wajer, K., Roelofs, D, Maat, A. Ter, 2009. The fate of received sperm in the reproductive tract of a hermaphroditic snail and its implications for fertilisation. Evol Ecol 23, 533–543. <https://doi.org/10.1007/s10682-008-9253-5>
- Kosjek, T., Perko, S., Zupanc, M., Zanoški Hren, M., Landeka Dragičević, T., Žigon, D., Kompore, B., Heath, E., 2012. Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. Water Res. 46, 355–368. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.10.056>
- Kovalova, L., Siegrist, H., Von Gunten, U., Eugster, J., Hagenbuch, M., Wittmer, A., Moser, R., McArdell, C.S., 2013. Elimination of micropollutants during post-treatment of hospital wastewater with powdered activated carbon, ozone, and UV. Environ. Sci. Technol. 47, 7899–7908. <https://doi.org/10.1021/es400708w>
- Kubec, J., Hossain, M., Grabicová, K., Randák, T., Kouba, A., Grabic, R., Roje, S., Buřič, M., 2019.

- Oxazepam alters the behavior of crayfish at diluted concentrations, venlafaxine does not. *Water* 11, 196. <https://doi.org/10.3390/w11020196>
- Kyriakides, M.A., McCrohan, C.R., 1989. Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurobiol.* 20, 635–650. <https://doi.org/10.1002/neu.480200704>
- Laegreid, L., Olegrd, R., Walström, J., Conradi, N., 1989. Teratogenic effects of benzodiazepine use during pregnancy. *J. Pediatr.* 114, 126–131. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(89\)80619-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(89)80619-5)
- Lagesson, A., Brodin, T., Fahlman, J., Fick, J., Jonsson, M., Persson, J., Byström, P., Klaminder, J., 2018. No evidence of increased growth or mortality in fish exposed to oxazepam in semi-natural ecosystems. *Sci. Total Environ.* 615, 608–614. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.070>
- Lagesson, A., Fahlman, J., Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Byström, P., Klaminder, J., 2016. Bioaccumulation of five pharmaceuticals at multiple trophic levels in an aquatic food web - Insights from a field experiment. *Sci. Total Environ.* 568, 208–215. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.206>
- Lajeunesse, A., Smyth, S.A., Barclay, K., Sauv e, S., Gagnon, C., 2012. Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Res.* 46, 5600–5612. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.042>
- Lam, P.K.S., Calow, P., 1989. Intraspecific Life-History Variation in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata). II. Environmental or Genetic Variance. *J. Anim. Ecol.* 58, 589. <https://doi.org/10.2307/4850>
- Langner, J.G., Gan, B.K., Liu, R.H., Baugh, L.D., Chand, P., Weng, J.L., Edwards, C., Walia, A.S., 1991. Enzymatic digestion, solid-phase extraction, and gas chromatography/mass spectrometry of derivatized intact oxazepam in urine. *Clin. Chem.* 37, 1595–1601. <https://doi.org/10.1093/clinchem/37.9.1595>
- Lazzara, R., Bl azquez, M., Porte, C., Barata, C., 2012. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.11.003>
- Lejoyeux, M., Maziere, J.C., 1991. Could the interaction of neuroleptics with calmodulin be an “explantation” of the psychotropic effects? *Encephale* 17, 11–15.
- Li, K.W., Van Minnen, J., Van Veelen, P.A., Van der Greef, J., Geraerts, W.P.M., 1996. Structure, localization and action of a novel inhibitory neuropeptide involved in the feeding of *Lymnaea*. *Mol. Brain Res.* 37, 267–272. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00333-N](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00333-N)
- Li, L., Floyd, P.D., Rubakhin, S.S., Romanova, E. V., Jing, J., Alexeeva, V.Y., Dembrow, N.C., Weiss, K.R., Vilim, F.S., Sweedler, J. V., 2001. Cerebrin prohormone processing, distribution and action in *Aplysia californica*. *J. Neurochem.* 77, 1569–1580. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00360.x>
- Liu, T., Koene, J.M., Dong, X., Fu, R., 2013. Sensitivity of isolated eggs of pond snails: a new

- method for toxicity assays and risk assessment. *Environ. Monit. Assess.* 185, 4183–4190. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2860-1>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lloyd, P.E., 1989. Peripheral actions of the SCPs in *Aplysia* and other Gastropod Molluscs. *Integr. Comp. Biol.* 29, 1265–1274. <https://doi.org/10.1093/icb/29.4.1265>
- Locher, R., Baur, B., 1997. A new technique to assess the number of spermatozoa in spermatophores of stylommatophoran gastropods. *J. Molluscan Stud.* 63, 555–556. <https://doi.org/10.1093/mollus/63.4.555>
- Loose, M.J., Koene, J.M., 2008. Sperm transfer is affected by mating history in the simultaneously hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*. *Invertebr. Biol.* 127, 162–167. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2007.00121.x>
- López-Doval, J.C., Freixa, A., Santos, L.H.M.L.M., Sanchís, J., Rodríguez-Mozaz, S., Farré, M., Barceló, D., Sabater, S., 2019. Exposure to single and binary mixtures of fullerenes and triclosan: Reproductive and behavioral effects in the freshwater snail *Radix balthica*. *Environ. Res.* 176, 108565. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108565>
- López-Serna, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Petrović, M., Barceló, D., 2010. Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction-liquid chromatography- electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta* 83, 410–424. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.046>
- Lorenzi, V., Choe, R., Schlenk, D., 2014. Effects of environmental exposure to diazepam on the reproductive behavior of fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol.* 31, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/tox.22069>
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- Mandrioli, R., Mercolini, L., Raggi, M., 2008. Benzodiazepine Metabolism: An Analytical Perspective. *Curr. Drug Metab.* 9, 827–844. <https://doi.org/10.2174/138920008786049258>
- Marois, R., Croll, R.P., 1991. Hatching asynchrony within the egg mass of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 19, 139–146. <https://doi.org/10.1080/07924259.1991.9672167>
- Martin, J.M., Bertram, M.G., Saaristo, M., Ecker, T.E., Hannington, S.L., Tanner, J.L., Michelangeli, M., O'Bryan, M.K., Wong, B.B.M., 2019. Impact of the widespread pharmaceutical pollutant fluoxetine on behaviour and sperm traits in a freshwater fish. *Sci. Total Environ.* 650, 1771–1778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.294>
- Matsuo, R., Kobayashi, S., Watanabe, S., Namiki, S., Iinuma, S., Sakamoto, H., Hirose, K., Ito, E., 2009. Glutamatergic neurotransmission in the procerebrum (olfactory center) of a terrestrial mollusk. *J. Neurosci. Res.* 87, 3011–3023. <https://doi.org/10.1002/jnr.22130>

- Mazzitelli, J.-Y., 2017. Évaluation de la toxicité de molécules médicamenteuses par une étude des réponses comportementales, physiologiques et transcriptomiques d'un mollusque dulçaquicole (*Radix balthica*) et d'un plathelminthe (*Schmidtea polychroa*). <http://www.theses.fr>. Toulouse 2.
- Mazzitelli, J.-Y., Bonnafe, E., Klopp, C., Escudier, F., Geret, F., 2017. De novo transcriptome sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover genes and pathways affected by exposure to oxazepam. *Ecotoxicology* 26, 127–140. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1748-1>
- Mazzitelli, J.-Y., Budzinski, H., Cachot, J., Geffard, O., Marty, P., Chiffre, A., François, A., Bonnafe, E., Geret, F., 2018. Evaluation of psychiatric hospital wastewater toxicity: what is its impact on aquatic organisms? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 26090–26102. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2501-5>
- McCallum, E.S., Sundelin, A., Fick, J., Alanärä, A., Klaminder, J., Hellström, G., Brodin, T., 2019. Investigating tissue bioconcentration and the behavioural effects of two pharmaceutical pollutants on sea trout (*Salmo trutta*) in the laboratory and field. *Aquat. Toxicol.* 207, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.028>
- McElhatton, P.R., 1994. The effects of benzodiazepine use during pregnancy and lactation. *Reprod. Toxicol.* [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0890-6238(94)90029-9)
- McKenzie, J.D., Counce, M., Hetherington, M.S., Winlow, W., 1998. Serotonergic innervation of the foot of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *J. Neurocytol.* 27, 459–470. <https://doi.org/10.1023/A:1006944829563>
- Meshcheryakov, V.N., 1990. The Common Pond Snail *Lymnaea stagnalis*, in: *Animal Species for Developmental Studies*. Springer US, pp. 69–132. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0503-3_5
- Miller, M.W., 2019. GABA as a neurotransmitter in Gastropod Molluscs. *Biol. Bull.* 236, 144–156. <https://doi.org/10.1086/701377>
- 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>
- Mohamed, B., Jean-Yves, M., Pierre, M., Hélène, B., Aleya, L., Elsa, B., Florence, G., 2017. Assessment of *Lemna minor* (duckweed) and *Corbicula fluminea* (freshwater clam) as potential indicators of contaminated aquatic ecosystems: responses to presence of psychoactive drug mixtures. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8447-1>
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 35, 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.10.008>
- Morishita, F., Furukawa, Y., Matsushima, O., Minakata, H., 2010. Regulatory actions of neuropeptides and peptide hormones on the reproduction of molluscs. *Can. J. Zool.* 88, 825–845. <https://doi.org/10.1139/Z10-041>

- Nakadera, Y., Blom, C., Koene, J.M., 2014. Duration of sperm storage in the simultaneous hermaphrodite *Lymnaea stagnalis*. *J. Molluscan Stud.* 80, 1–7. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyt049>
- Nayeem, N., Green, T.P., Martin, I.L., Barnard, E.A., 1994. Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J. Neurochem.* 62, 815–818. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62020815.x>
- Nentwig, G., 2007. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: The antidepressant drug fluoxetine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 163–170. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-7190-7>
- Nezlin, L., Voronezhskaya, E.E., 1997. GABA-immunoreactive neurones and interactions of GABA with serotonin and FMRFamide in a peripheral sensory ganglion of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res.* 772, 217–225. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00835-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00835-4)
- Nishiwaki, K., 2001. A secreted ADAM, MIG-17, controls cell migration in *C. elegans*. *Keio J. Med.* 50, 32.
- Nunes, B., Gaio, A.R., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2008. Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 341–354. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.006>
- Nunes, C.N., dos Anjos, V.E., Quináia, S.P., 2019. Are there pharmaceutical compounds in sediments or in water? Determination of the distribution coefficient of benzodiazepine drugs in aquatic environment. *Environ. Pollut.* 251, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.015>
- OCDE, 2013. Panorama de la santé - Les indicateurs de l'OCDE, Drug Metabolism Reviews. *Drug Metab Rev.* <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.561353>
- OECD, 2016a. Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* reproduction test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264264335-en>
- OECD, 2016b. Test No. 242: *Potamopyrgus antipodarum* Reproduction Test, OECD Publication. <https://doi.org/10.1787/9789264264311-en>
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., 2000. Effects of endocrine disruptors on Prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* 9, 383–397. <https://doi.org/10.1023/A:1008972518019>
- OFDT, 2019. Médicaments psychotropes - Synthèse des connaissances.
- Oggier, D.M., Weisbrod, C.J., Stoller, A.M., Zenker, A.K., Fent, K., 2010. Effects of diazepam on gene expression and link to physiological effects in different life stages in zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7685–7691. <https://doi.org/10.1021/es100980r>
- Ohbayashi-Hodoki, K., Ishihama, F., Shimada, M., 2004. Body size--dependent gender role in a simultaneous hermaphrodite freshwater snail, *Physa acuta* 976–981.

- Oliveira-Filho, E.C., Geraldino, B.R., Coelho, D.R., De-Carvalho, R.R., Paumgartten, F.J.R., 2010. Comparative toxicity of *Euphorbia milii latex* and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. *Chemosphere* 81, 218–227. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2010.06.038>
- Olsen, L.R., Gabel-Jensen, C., Wubshet, S.G., Kongstad, K.T., Janfelt, C., Badolo, L., Hansen, S.H., 2016. Characterization of midazolam metabolism in locusts: The role of a CYP3A4-like enzyme in the formation of 1'-OH and 4-OH midazolam. *Xenobiotica* 46, 99–107. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1051604>
- Omran, N.E.S.E.S., 2012. Testosterone, gonadotropins and androgen receptor during spermatogenesis of *Biomphalaria alexandrina* snails (Pulmonata: Basommatophora). *Reprod. Biol.* 12, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2012.10.002>
- Orias, F., Perrodin, Y., 2014. Pharmaceuticals in hospital wastewater: Their ecotoxicity and contribution to the environmental hazard of the effluent. *Chemosphere* 115, 31–39. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.01.016>
- Owen, G., Smith, T.H.F., Agersborg, H.P.K., 1970. Toxicity of some benzodiazepine compounds with CNS activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 16, 556–570. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(70\)90031-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(70)90031-1)
- Pallavi, S.K., Ho, D.M., Hicks, C., Miele, L., Artavanis-Tsakonas, S., 2012. Notch and Mef2 synergize to promote proliferation and metastasis through JNK signal activation in *Drosophila*. *EMBO J.* 31, 2895–2907. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.129>
- Pande, G.S., Patil, M.U., Sherkhane, U.D., 2010. Observations on the embryonic development of freshwater pulmonate snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck, 1822) (Gastropoda: Mollusca). *The Bioscan* 5, 549–554.
- Park, S.Y., Jung, M.Y., Kim, I.S., 2009. Stabilin-2 mediates homophilic cell-cell interactions via its FAS1 domains. *FEBS Lett.* 583, 1375–1380. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.046>
- Parrott, J.L., Metcalfe, C.D., 2017. Assessing the effects of the antidepressant venlafaxine to fathead minnows exposed to environmentally relevant concentrations over a full life cycle. *Environ. Pollut.* 229, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.009>
- Pavlova, G.A., 2010. Muscular waves contribute to gliding rate in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Physiol. A Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 196, 241–248. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0509-5>
- Pavlova, G.A., 2001. Effects of serotonin, dopamine and ergometrine on locomotion in the pulmonate mollusc *Helix lucorum*. *J. Exp. Biol.* 204.
- Péry, A.R.R., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T., Garric, J., 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere* 73, 300–304. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.029>
- Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P., Jacquin, L., 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Sci. Total Environ.* 684, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>

- Petursson, H., 1994. The benzodiazepine withdrawal syndrome. *Addiction* 89, 1455–1459. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.1994.tb03743.x>
- Pfenninger, M., Cordellier, M., Streit, B., 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). *BMC Evol. Biol.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-100>
- Pivetta, R.C., Rodrigues-Silva, C., Ribeiro, A.R., Rath, S., 2020. Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks. *Sci. Total Environ.* 727, 138661. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138661>
- Plesh, B., De Jong-Brink, M., Boer, H., 1971. Histological and Histochemical Observations On the Reproductive Tract of the Hermaphrodite Pond Snail *Lymnaea Stagnalis* (L.) in: *Netherlands Journal of Zoology* Volume 21 Issue 2 (1970) 180–201.
- Pohl, J., Ahrens, L., Carlsson, G., Golovko, O., Norrgren, L., Weiss, J., Örn, S., 2019. Embryotoxicity of ozonated diclofenac, carbamazepine, and oxazepam in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 225, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.034>
- Radjenović, J., Petrović, M., Barceló, D., 2009. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Res.* 43, 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.043>
- Richendrfer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Creton, R., 2012. On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Behav. Brain Res.* 228, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.041>
- Rivetti, C., Campos, B., Barata, C., 2016. Low environmental levels of neuro-active pharmaceuticals alter phototactic behaviour and reproduction in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 170, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.019>
- Rivetti, C., Climent, E., Gómez-Canela, C., Barata, C., 2019. Characterization of neurotransmitter profiles in *Daphnia magna* juveniles exposed to environmental concentrations of antidepressants and anxiolytic and antihypertensive drugs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 5867–5876. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01968-y>
- Romanova, E., Rubakhin, S., Rozsa, K., 1996. Behavioral changes induced by GABA-receptor agonists in *Lymnaea stagnalis* L. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 27, 1067–1071. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)00122-0](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)00122-0)
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L., 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 333–342. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7604>
- Rudolph, P.H., 1983. Copulatory activity and sperm production in *Bulinus* (*Physopsis*) *globosus* (Gastropoda: Planorbidae). *J. Molluscan Stud.* 49, 125–132. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a065702>

- Rudolph, U., Knoflach, F., 2011. Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA A receptor subtypes. *Nat. Rev. Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd3502>
- Saaristo, M., Lagesson, A., Bertram, M.G., Fick, J., Klaminder, J., Johnstone, C.P., Wong, B.B.M., Brodin, T., 2019. Behavioural effects of psychoactive pharmaceutical exposure on European perch (*Perca fluviatilis*) in a multi-stressor environment. *Sci. Total Environ.* 655, 1311–1320. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.228>
- Saaristo, M., McLennan, A., Johnstone, C.P., Clarke, B.O., Wong, B.B.M., 2017. Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predator behaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*). *Aquat. Toxicol.* 183, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.007>
- Sánchez-Argüello, P., Fernández, C., Tarazona, J. V., 2009. Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water-sediment test. *Sci. Total Environ.* 407, 1937–1946. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.004>
- Santama, N., Brierley, M., Burke, J.F., Benjamin, P.R., 1994. Neural network controlling feeding in *Lymnaea stagnalis*: Immunocytochemical localization of myomodulin, small cardioactive peptide, buccalin, and FMRFamide-related peptides. *J. Comp. Neurol.* 342, 352–365. <https://doi.org/10.1002/cne.903420304>
- Sarker, M.M., Nesa, B., Jahan, M.S., 2007. Embryonic Developmental Ecology of Freshwater Snail *Lymnaea acuminata* (Lymnaeidae: Gastropoda). *Pakistan J. Biol. Sci.* 10, 23–31. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.23.31>
- Schäfer, S., Hamer, B., Treursić, B., Möhlenkamp, C., Spira, D., Korlević, M., Reifferscheid, G., Claus, E., 2012. Comparison of Bioaccumulation and Biomarker Responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* After Exposure to Resuspended Sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 614–627. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9735-2>
- Schlumpf, M., Ramseier, H., Abriel, H., Youmbi, M., Baumann, J.B., Lichtensteiger, W., 1989. Diazepam effects on the fetus. *Neurotoxicology* 10, 501–516.
- Schniebs, K., Glöer, P., Vinarski, M. V, Hundsdoerfer, A.K., 2013. Intraspecific morphological and genetic variability in the European freshwater snail *Radix labiata* (Rossmassler, 1835) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae). *Contrib. to Zool.* 82, 55–68.
- Schniebs, K., Glöer, P., Vinarski, M. V, Hundsdoerfer, A.K., 2011. Intraspecific morphological and genetic variability in *Radix balthica* (Linnaeus 1758) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae) with morphological comparison to other European *Radix* species. *J. Conchol.* 40, 657–678.
- Schofield, P.R., Darlison, M.G., Fujita, N., Burt, D.R., Stephenson, F.A., Rodriguez, H., Rhee, L.M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T.A., Seeburg, P.H., Barnard, E.A., 1988. Sequence and functional expression of the GABAA receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328, 221–227. <https://doi.org/10.1038/328221a0>
- Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Markert, B., Oehlmann, J., Watermann, B., Scherf, S., 2000. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (mollusca: gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology* 9, 399–412. <https://doi.org/10.1023/A:1008924602089>

- Schultz, M.M., Painter, M.M., Bartell, S.E., Logue, A., Furlong, E.T., Werner, S.L., Schoenfuss, H.L., 2011. Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquat. Toxicol.* 104, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.011>
- Seddon, M.B., Kebapçı, U., Van Damme, D., Prie, V., 2014. *Radix balthica*. IUCN Red List Threat. Species 2014 e.T155647A42430553. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T155647A42430553.en>
- Sharpe, C.S., Thompson, D.A., Lee Blankenship, H., Schreck, C.B., 1998. Effects of routine handling and tagging procedures on physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Progress. Fish-Culturist* 60, 81–87. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1998\)060<0081:FORHAT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1998)060<0081:FORHAT>2.0.CO;2)
- Sieghart, W., 1995. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Pharmacol. Rev.* 47, 181–234.
- Silva, B., Costa, F., Neves, I.C., Tavares, T., 2015. Psychiatric Pharmaceuticals as Emerging Contaminants in Wastewater. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20493-2>
- Snigirov, S., Sylant'ev, S., 2018. GABAA receptors activate fish feeding behaviour via two distinct functional pathways. *J. Exp. Biol.* 221. <https://doi.org/10.1242/jeb.170514>
- Snyder, S.A., 2008. Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water, in: *Ozone: Science and Engineering*. Taylor & Francis Group, pp. 65–69. <https://doi.org/10.1080/01919510701799278>
- 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>
- Soulier, C., Gabet, V., Lardy, S., Lemenach, K., Pardon, P., Esperanza, M., Miège, C., Choubert, J.-M., Martin, S., Bruchet, A., Coquery, M., Budzinski, H., 2011. Zoom sur les substances pharmaceutiques : présence, partition, devenir en station d'épuration. <https://doi.org/10.1111/ADD.1994.89.ISSUE-11;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:13600443;WGROUPE:STRING:PUBLICATION>
- Sullivan, C.H., Bonar, D.B., 1984. Biochemical characterization of the hatching process of *Ilyanassa obsoleta*. *J. Exp. Zool.* 229, 223–234. <https://doi.org/10.1002/jez.1402290207>
- Sundin, J., Jutfelt, F., Thorlacius, M., Fick, J., Brodin, T., 2019. Behavioural alterations induced by the anxiolytic pollutant oxazepam are reversible after depuration in a freshwater fish. *Sci. Total Environ.* 665, 390–399. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.049>
- Syed, N.I., Harrison, D., Winlow, W., 1988. Locomotion Lymnaea - role of serotonergic motoneurons controlling the pedal cilia, in: *Neurobiology of Invertebrates: Transmitters, M. and R. (Ed.), Neurobiology of Invertebrates: Transmitters, Modulators and Receptors*. pp. 387–402.
- Syed, N.I., Winlow, W., 1991. Respiratory behavior in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Physiol. A* 169, 557–568. <https://doi.org/10.1007/BF00193546>

- Tair-Abbaci, K., Joachim, S., Garric, J., Boisseaux, P., Exbrayat, J.-M., Porcher, J.-M., Geffard, O., 2017. Anatomical and histological characterization of the gametogenesis of *Radix balthica* (Linnaeus, 1758) in comparison with *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). *J. Histol. Histopathol.* 4, 5. <https://doi.org/10.7243/2055-091X-4-5>
- Tallarico, L. de F., 2016. Freshwater gastropods as a tool for ecotoxicology assessments in Latin America. *Am. Malacol. Bull.* 33, 330–336. <https://doi.org/10.4003/006.033.0220>
- Ter Maat, A., 1992. Egg laying in the hermaphrodite pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Prog. Brain Res.* 92, 345–360. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61188-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61188-7)
- Ter Maat, A., Lodder, J.C., 1980. A biphasic cholinergic input on the ovulation hormone producing caudo-dorsal cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp.* 66, 115–119. [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(80\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0306-4492(80)90082-9)
- Ter Maat, A., Lodder, J.C., Wilbrink, M., 1983. Induction of egg-laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis* by environmental stimulation of the release of ovulation hormone from the Caudo-Dorsal Cells. *Int. J. Invertebr. Reprod.* 6, 239–247. <https://doi.org/10.1080/01651269.1983.10510048>
- Ter Maat, A., Pieneman, A.W., Goldschmeding, J.T., Smelik, W.F.E., Ferguson, G.P., 1989. Spontaneous and induced egg laying behavior of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Physiol. A* 164, 673–683. <https://doi.org/10.1007/BF00614510>
- Ter Maat, A., Zonneveld, C., de Visser, J.A.G.M., Jansen, R.F., Montagne-Wajer, K., Koene, J.M., 2007. Food intake, growth, and reproduction as affected by day length and food availability in the pond snail *Lymnaea stagnalis**. *Am. Malacol. Bull.* 23, 113–120. <https://doi.org/10.4003/0740-2783-23.1.113>
- Thoré, E.S.J., Philippe, C., Brendonck, L., Pinceel, T., 2020. Antidepressant exposure reduces body size, increases fecundity and alters social behavior in the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*. *Environ. Pollut.* 265, 115068. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115068>
- Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., Oehlmann, J., 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10, 373–388. <https://doi.org/10.1023/A:1012279231373>
- Tills, O., Truebano, M., Rundle, S., 2015. An embryonic transcriptome of the pulmonate snail *Radix balthica*. *Mar. Genomics* 24, 259–260. <https://doi.org/10.1016/J.MARGEN.2015.07.014>
- Trudeau, V.L., Spanswick, D., Fraser, E.J., Lariviere, K., Crump, D., Chiu, S., MacMillan, M., Schulz, R.W., 2000. The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish, in: *Biochemistry and Cell Biology*. National Research Council of Canada, pp. 241–259. <https://doi.org/10.1139/o99-075>
- Uhler, G.C., Huminski, P.T., Les, F.T., Fong, P.P., 2000. Cilia-driven rotational behavior in gastropod (*Physa elliptica*) embryos induced by serotonin and putative serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *J. Exp. Zool.* 286, 414–421. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(20000301\)286:4<414::AID-JEZ9>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(20000301)286:4<414::AID-JEZ9>3.0.CO;2-B)

- Van Duivenboden, Y.A., Maat, A. Ter, 1985. Masculinity and receptivity in the hermaphrodite pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Anim. Behav.* 33, 885–891. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(85\)80022-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(85)80022-1)
- Vossen, L.E., Cervený, D., Österkrans, M., Thörnqvist, P.O., Jutfelt, F., Fick, J., Brodin, T., Winberg, S., 2020a. Chronic Exposure to Oxazepam Pollution Produces Tolerance to Anxiolytic Effects in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 54, 1760–1769. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06052>
- Vossen, L.E., Červený, D., Sen Sarma, O., Thörnqvist, P.O., Jutfelt, F., Fick, J., Brodin, T., Winberg, S., 2020b. Low concentrations of the benzodiazepine drug oxazepam induce anxiolytic effects in wild-caught but not in laboratory zebrafish. *Sci. Total Environ.* 703, 134701. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134701>
- Vosshage, A.T.L., Neu, T.R., Gabel, F., 2018. Plastic alters biofilm quality as food resource of the freshwater Gastropod *Radix balthica*. *Environ. Sci. Technol.* 52, 11387–11393. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02470>
- Vulliet, E., Cren-Olivé, C., 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ. Pollut.* 159, 2929–2934. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.033>
- Wafford, K.A., 2005. GABAA receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 47–52. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2004.08.006>
- Walker, C.R., Bandman, E., Strohman, R.C., 1979. Diazepam induces relaxation of chick embryo muscle fibers in vitro and inhibits myosin synthesis. *Exp. Cell Res.* 123, 285–291. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(79\)90470-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90470-1)
- Wang, G.X., Cho, K.W., Uhm, M., Hu, C.R., Li, S., Cozacov, Z., Xu, A.E., Cheng, J.X., Saltiel, A.R., Lumeng, C.N., Lin, J.D., 2014. Otopetrin 1 protects mice from obesity-associated metabolic dysfunction through attenuating adipose tissue inflammation. *Diabetes* 63, 1340–1352. <https://doi.org/10.2337/db13-1139>
- Wang, J.H., Waisman, D.M., 1979. Calmodulin and its role in the second-messenger system, in: *Current Topics in Cellular Regulation*. Academic Press, pp. 47–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152815-7.50006-5>
- Wedemeyer, H., Schild, D., 1995. Chemosensitivity of the osphradium of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 198, 1743–1754.
- Weinberger, J., Klaper, R., 2014. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquat. Toxicol.* 151, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>
- Weiss, B., Prozialeck, W., Cimino, M., 1980. Acute and chronic effects of psychoactive drugs on adrenergic receptors and calmodulin. *Adv Cycl. Nucleotide Res.* 213–225.
- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E., 2005. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6649–6663.

<https://doi.org/10.1021/es0484799>

- Whiting, P.J., 2003. GABA-A receptor subtypes in the brain: A paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov. Today*. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02703-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02703-X)
- Wiles, S.C., Bertram, M.G., Martin, J.M., Tan, H., Lehtonen, T.K., Wong, B.B.M., 2020. Long-Term Pharmaceutical Contamination and Temperature Stress Disrupt Fish Behavior. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01625>
- Winlow, W., Haydon, P., 1986. A behavioural and neuronal analysis of the locomotory system of *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.* 83, 13–21. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90082-4)
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., De Wachter, R., 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet.* 9, 407. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90102-N](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90102-N)
- Woodward, O.M., Willows, A.O.D., 2006. Nervous control of ciliary beating by Cl⁻, Ca²⁺ and calmodulin in *Tritonia diomedea*. *J. Exp. Biol.* 209, 2765–2773. <https://doi.org/10.1242/jeb.02377>
- Wu, M., Qiu, X., Chen, C., Chen, K., Li, M., Xu, H., Wu, X., Shimasaki, Y., Oshima, Y., 2020. Short-term and persistent impacts of sublethal exposure to diazepam on behavioral traits and brain GABA levels in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 740, 140392. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140392>
- Wu, M., Xiang, J., Que, C., Chen, F., Xu, G., 2015. Occurrence and fate of psychiatric pharmaceuticals in the urban water system of Shanghai, China. *Chemosphere* 138, 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.002>
- Wullschleger, E.B., Jokela, J., 2002. Morphological plasticity and divergence in life history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *J. Molluscan Stud.* 68, 1–5. <https://doi.org/10.1093/mollus/68.1.1>
- Yabe, D., Nakamura, T., Kanazawa, N., Tashiro, K., Honjo, T., 1997. Calumenin, a Ca²⁺-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J. Biol. Chem.* 272, 18232–18239. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18232>
- Yaffe, H., Buxdorf, K., Shapira, I., Ein-Gedi, S., Moyal-Ben Zvi, M., Fridman, E., Moshelion, M., Levy, M., 2012. LogSpin: a simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC Res. Notes* 5, 45. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-45>
- Yamamoto, H., Nakamura, Yudai, Moriguchi, S., Nakamura, Yuki, Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J., 2009. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water Res.* 43, 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.039>
- Zagoory, O., Braiman, A., Gheber, L., Priel, Z., 2001. Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 280. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.1.c100>

Annexe 1 : Alignement de séquences
du cyt-b des espèces du genre *Radix*

Annexe 2 : Arbre phylogénétique
complet issu de l'alignement de
séquences

