



**HAL**  
open science

# Evaluation des effets chroniques du diclofénac sur un mollusque gastéropode avec des approches physiologiques, comportementales, transcriptomiques et métabolomiques

Lucie Bouly

► **To cite this version:**

Lucie Bouly. Evaluation des effets chroniques du diclofénac sur un mollusque gastéropode avec des approches physiologiques, comportementales, transcriptomiques et métabolomiques. Zoologie des invertébrés. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30017. tel-03714705

**HAL Id: tel-03714705**

**<https://theses.hal.science/tel-03714705>**

Submitted on 5 Jul 2022

**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  
**Lucie BOULY**

Le 1 avril 2022

**Evaluation des effets chroniques du diclofénac sur un mollusque  
gastéropode avec des approches physiologiques,  
comportementales, transcriptomiques et métabolomiques.**

---

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

Spécialité : **Infectiologie, Physiopathologie, Toxicologie, Génétique et  
Nutrition**

Unité de recherche :  
**BTSB - Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives**

Thèse dirigée par  
**Florence GERET et Hélène FENET**

Jury

**Mme Emmanuelle Vulliet, Rapporteur**

**M. Patrice Gonzalez, Rapporteur**

**M. Alain Geffard, Examinateur**

**Mme Aurélie Goutte, Examinatrice**

**Mme Florence Géret, Directrice de thèse**

**Mme Hélène Fenet, Directrice de thèse**



## Résumé

La contamination environnementale par les médicaments est devenue une préoccupation majeure cette dernière décennie. Parmi ces médicaments, le diclofénac (DCF) est l'une des molécules médicamenteuses les plus consommées et les plus régulièrement identifiées dans l'environnement aquatique. De nombreuses études écotoxicologiques se sont intéressées aux effets de cette molécule sur les espèces aquatiques, marines et dulcicoles, montrant notamment un impact sur la reproduction. Cependant, les études chroniques conduites à concentrations environnementales chez des invertébrés aquatiques sont peu nombreuses, et les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les effets observés sont peu compris. Cette thèse a pour objectif d'évaluer l'impact du DCF à concentrations environnementales après une exposition multigénérationnelle chez un gastéropode d'eau douce, *Lymnaea stagnalis*. Dans ce but, des approches physiologiques, comportementales et moléculaires ont été mises en œuvre. Les produits de biotransformation du DCF formés chez *L. stagnalis* après une exposition de 3 et 7 jours à 300 µg/L ont été explorés. Puis une étude multigénérationnelle a été conduite sur 3 générations de limnées exposées à 0,1 ; 2 et 10 µg/L de DCF en explorant l'impact de ce contaminant sur des paramètres physiologiques (éclosion des œufs, croissance, reproduction) et comportementaux (alimentation, locomotion, réponses au stress lumineux). La génération parentale exposée à 0,1 et 10 µg/L a fait l'objet d'une analyse moléculaire au stade adulte sur deux organes (têtes et appareils reproducteurs). L'étude du métabolisme du DCF chez la limnée a permis de mettre en évidence 19 métabolites du DCF, dont 14 de phase I et 4 de phase II. Parmi ces métabolites, 12 n'avaient jamais été observés chez une espèce aquatique. L'hydroxylation semble être une voie majeure de biotransformation chez cet organisme, avec l'identification de 3 métabolites hydroxylés et 3 dihydroxylés. Lors de l'exposition chronique au DCF, l'éclosion a été impactée par le DCF uniquement dans la génération F2, avec une éclosion des pontes plus rapide (10 µg/L). La croissance des juvéniles a été plus rapide pour la génération parentale (F0) et la génération F2 exposées à toutes les concentrations de DCF ainsi que dans la F1 exposée à 0,1 µg/L. Au contraire, pour la F1 exposée à 2 et 10 µg/L, la croissance a été plus lente. La production de ponte n'a pas été touchée par une exposition au DCF dans la génération parentale, tandis qu'un plus faible nombre d'œufs par ponte a été observé chez la F1 (2 µg/L) et une quantité de pontes plus importante a été produite par individus dans la F2 (10 µg/L). Le DCF a diminué la prise alimentaire chez les juvéniles de la F0 (2 µg/L) et les adultes de la F1 (0,1 et 2 µg/L), tandis qu'il l'a augmentée chez les adultes de la F2 (10 µg/L). Le DCF a stimulé le comportement locomoteur chez les individus de la F1 (2 et 10 µg/L). Le DCF n'a pas eu d'effet sur la réponse au stress lumineux. Les approches moléculaires non ciblées (transcriptomique, métabolomique) conduites chez les adultes de la génération F0 suggèrent l'induction de neurotoxicité, d'un stress oxydant et un déséquilibre immunitaire. L'osmorégulation pourrait également être altérée, ainsi que le métabolisme énergétique et la reproduction. Cet impact potentiel sur la reproduction n'a pas été mis en évidence sur la génération F0 lors des tests de reproduction mais l'a été sur la descendance, confirmant le potentiel des marqueurs moléculaires comme indicateurs précoces d'effet. L'ensemble de ces résultats nous permet d'avoir une vision plus large des effets chroniques du DCF sur l'environnement aquatique.

Mots-clés : Ecotoxicologie aquatique, AINS, Traits d'histoire de vie, LC-HRMS, RNA-Seq, Etude multigénérationnelle



## Abstract

Pharmaceuticals environmental contamination provoked an increase of concern over the past decade. Among these drugs, diclofenac (DCF) is one of the most consumed and identified in the aquatic environment. Multiple ecotoxicological studies have investigated these contaminant effects on marine and freshwater aquatic species, showing mostly a reproduction impact. However, only a few chronic studies at environmental concentrations has been conducted on aquatic invertebrates, and the molecular mechanisms involved in the effects that have been observed are poorly understood. This thesis aimed to assess DCF impact at environmental concentrations after a multigenerational exposure in the *Lymnaea stagnalis* freshwater gastropod. For this purpose, physiological, behavioral and molecular approaches were implemented. DCF biotransformation products formed in *L. stagnalis* after 3 and 7 days of exposure at 300 µg/L were explored. A multigenerational study was then conducted on 3 generations of snails exposed to 0.1, 2 and 10 µg/L DCF concentrations. This contaminant impact was explored on physiological (egg hatching, growth, reproduction) and behavioral (feeding, locomotion, light stress response) parameters. The parental generation exposed to 0.1 and 10 µg/L was analyzed molecularly at the adult stage on 2 organs (heads and reproductive apparatus). The DCF metabolism study in *L. stagnalis* snail revealed 19 DCF metabolites, 14 of which were phase I and 4 were phase II. Among these metabolites, 12 were observed for the first time in aquatic species. The major biotransformation pathway in this organism appeared to be hydroxylation, with 3 hydroxylated and 3 dihydroxylated identified metabolites. During the chronic DCF exposure, hatching was affected by DCF only in the F2 generation, with a faster egg hatching (10 µg/L). The juvenile growth was faster in the parental generation (F0) and in the F2 generation at all DCF concentrations, as well as in the F1 exposed to 0.1 µg/L. On the contrary, the growth was slower in the F1 exposed to 2 and 10 µg/L. The egg masses production was not impacted by the DCF exposure in the parental generation, while a lower number of eggs per egg mass was observed in the F1 (2 µg/L) and a higher number of egg masses was produced per snail in the F2 (10 µg/L). DCF lowered the feeding rate in the F0 juveniles (2 µg/L) and in the F1 adults (0.1 and 2 µg/L), whereas it increased it in the F2 adults (10 µg/L). DCF stimulated locomotor behavior in F1 individuals (2 and 10 µg/L). DCF did not affect the light stress response. The non-targeted molecular approaches (transcriptomic, metabolomics) conducted on the F0 adult snails suggested neurotoxicity, oxidative stress and immunity imbalance induction. Osmoregulation could be altered, as well as the energy metabolism and the reproduction. This potential impact of DCF on reproduction was not highlighted in the F0 generation reproduction test but was demonstrated on the offspring, thus confirming the molecular markers potential to be early effects indicators. All these results allow us to have a larger view of DCF chronic effects on the aquatic environment.

Keywords: Aquatic ecotoxicology, NSAID, Life history traits, LC-HRMS, RNA-Seq, Multigenerational study

# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes directrices de thèse, Florence Géret et Hélène Fenet. Merci de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir suivie pendant ces trois années de thèse. Malgré un emploi du temps bien chargé, vous avez toujours su dégager du temps pour me conseiller si le besoin s'en faisait ressentir.

Je tiens à remercier particulièrement Emmanuelle Vulliet et Patrice Gonzalez d'avoir accepté d'évaluer ce travail, malgré les courts délais. Je remercie également Alain Geffard et Aurélie Goutte d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie tous les membres de mon comité de pilotage, Olivier Geffard, Marie-Agnès Coutellec, Elsa Bonnafé, Arnaud Chaumot, Frank Le Foll et Caroline Vignet. Merci d'avoir pris le temps de me conseiller (à une ou deux reprises), et d'avoir partagé votre expertise. Cela m'a permis de me concentrer sur l'essentiel, ainsi que de prendre confiance dans les résultats acquis au début de ma thèse.

Je souhaite particulièrement remercier les membres de l'équipe d'Albi. Merci à Michel Treilhou pour ton accueil au sein de BTSB et pour ta présence. Un grand merci à Caroline Vignet pour ta disponibilité, ton enthousiasme et ton aide dans la mise au point des tests de comportement. Merci à Elsa Bonnafé pour ton soutien et ton expertise en biologie moléculaire. Un grand merci à Jean-Michel Malgouyres, alias McGyver, pour toutes tes idées qui m'ont grandement facilité la vie. Merci pour ta présence, ta curiosité, et pour la garde alternée de l'élevage d'escargots. Je tiens également à remercier Jean-Luc Carayon, pour toutes tes heures passées à filtrer de l'eau et à doser mes échantillons. Je remercie Pierre pour ta capacité à nous faire rire (et à nous fournir du rhum arrangé !). Merci à Nathan, le photographe officiel des soirées de BTSB, pour ta bonne humeur qui contribue à faire du laboratoire un environnement chaleureux. Je remercie Alice pour ta gentillesse et ta positivité à toute épreuve, ainsi qu'Olivier pour ta sympathie. Et enfin je remercie Arnaud, le dernier arrivé, pour ta disponibilité et tes bons conseils. Je remercie également Jean, si tu ne fais pas partie de BTSB, tu es la seule personne qui comprenne vraiment la double cuisson et tes arrivées intempestives dans le bureau sont un bol d'air frais.

Je remercie Karen et Valérie pour votre gentillesse et votre disponibilité, vous avez toujours fait votre maximum pour que ces trois années se passent dans les meilleures conditions. Merci également à Delphine pour ta présence lors des TP, tu as été d'une grande aide.

Je tiens à remercier l'équipe Contem de Montpellier, où j'ai passé quelques mois étalés pendant toute ma thèse. Je tiens tous d'abord à remercier Elena Gomez pour ton accueil. Je remercie particulièrement Frédérique Courant pour ton encadrement et ton enthousiasme lors des manip. Tu arrives à trouver du temps pour chacun d'entre nous, et j'ai particulièrement apprécié travailler avec toi. Merci à Mireille, qui a passé du temps à s'assurer que mes séjours à Montpellier se déroulent dans de bonnes conditions, merci à David, pilier de la bonne marche du laboratoire. Merci également à Abdel, Aurélie et Geoffroy, malgré mes courts passages à Montpellier vous avez toujours été présents si j'avais besoin d'aide ou d'un conseil. Je souhaite également remercier les docs et post-docs, Thibaut, Gaëlle, Rayana, Chan, Rocio et Nayara, vous avez contribué positivement à faire de mes séjours un bon moment. Thibaut, mon collègue écotox, merci pour ta disponibilité, tes remarques pertinentes et pour avoir été mon compagnon de bar. Merci également à Gaëlle pour ce dernier point et pour m'avoir fait découvrir les meilleurs plans café de la fac. Je vous souhaite à tous les deux d'aboutir dans vos projets.

Plus qu'un lieu de travail, Albi a été le lieu de belles rencontres. Je tiens à remercier particulièrement les docs et post doc de l'INU Champollion, les anciens comme les nouveaux. Valentine, Ludo et Manon, vous avez été comme ma seconde famille lors de mon arrivée à Albi. Entre soirées (trop) arrosées, concerts et repas du dimanche midi, j'ai passé avec vous des moments inoubliables. Merci pour votre présence dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci à Morgane, pour ta force tranquille, ta créativité et ton temps passé à disséquer les escargots. Tu m'as aidée à relativiser lorsque tout ne se passait pas comme prévu, et ce toujours dans la bonne humeur.

Merci également aux arrivés plus tardifs, à Lucia, reine des pâtisseries et du bon sens, pour m'avoir écoutée râler avec patience, et pour être parfois aussi bavarde que moi ! Merci à Guillaume, pour avoir remis les pendus au goût du jour et pour ta capacité à te lancer dans des conversations absurdes. Je remercie également Caroline pour ton enthousiasme et ta bonne humeur, les covois du WE et pour ta capacité à sauver le monde chaque jour. Je te remercie Elsa pour ta bonne humeur et ta sociabilité. Merci également à Charlotte, Eugénie, Steven, Ibtissam et Abdoul pour tous les bons moments passés ensemble.

Je te remercie Axel pour ton humour, ta prise de risque lorsque tu as goûté mes premiers Welsh et ton accueil en Guyane. Ce voyage reste l'un de mes meilleurs souvenirs de ces dernières années et j'espère qu'à Kourou ou ailleurs tu pourras continuer à travailler dans le domaine qui te passionne. Merci à Vincent pour tes remarques inattendues et drôles, et ton suivi de mes (més)aventures, merci à Marion pour tes conseils remplis de sagesse. Je vous souhaite à tous les deux plein de bonheur pour l'avenir avec votre petite Zozo. Je te remercie également Mickal pour tes

anecdotes à mourir de rire, et pour avoir réussi à me faire rejouer de la clarinette, que je n'avais plus touchée depuis presque 10 ans.

Enfin, je remercie ma famille, qui n'a jamais hésité à faire la route pour venir me voir malgré les kilomètres. Je soupçonne que cet enthousiasme ait été aussi bien lié à l'envie de me rendre visite qu'à celle de découvrir cette belle région qu'est le Tarn. Merci pour votre soutien et votre présence depuis le début. Je remercie également tous mes amis, avec lesquels j'ai partagé tant de choses pendant toutes ces années. Un petit mot particulier pour Margaux et Eléonore, merci d'avoir été présentes malgré les années et la distance. C'est toujours un plaisir de vous avoir en visio, et votre amitié m'est particulièrement précieuse.

Pour finir je remercie Vivien, qui m'a supportée et encouragée pendant ces dernières années. Merci pour ton optimisme et ta présence bienveillante, ainsi que pour toutes tes attentions qui me touchent au quotidien.

## Liste des communications

### Publications :

- Bouly, L., Fenet, H., Carayon, J.-L., Gomez, E., Géret, F., Courant, F., Metabolism of the aquatic pollutant diclofenac in the *Lymnaea stagnalis* freshwater gastropod. (**soumis dans *Environmental Science and Pollution Research***)
- Bouly, L., Courant, F., Bonnafé, E., Carayon, J.-L., Malgouyres, J.-M., Vignet, C., Gomez, E., Géret, F., Fenet, H., Long-term exposure to environmental diclofenac concentrations impairs growth and induces molecular changes in *Lymnaea stagnalis* freshwater snails, *Chemosphere* (2021)
- Bouly, L., Vignet, C., Carayon, J.-L., Malgouyres, J.-M., Fenet, H., Géret, F., Multigenerational responses in the *Lymnaea stagnalis* freshwater gastropod exposed to diclofenac at environmental concentrations. (**à soumettre**)

### Posters :

- **14<sup>ème</sup> JS du RFMF** – Novembre 2021 – « Utilisation de l'approche métabolomique pour l'étude de la métabolisation du diclofénac chez un gastéropode d'eau douce », Bouly L., Courant F., Carayon J.-L., Gomez E., Géret F., Fenet H.
- **GdR Ecotoxicologie aquatique** – Bordeaux – Novembre 2019 – « Exposition chronique au diclofénac de *Lymnaea stagnalis*, un gastéropode d'eau douce », Bouly L., Malgouyres J.-M., Vignet C., Fenet H., Géret F.

### Communications orales :

- **GdR Ecotoxicologie aquatique** – Rennes – Novembre 2021 – « Métabolisme des médicaments chez les organismes non-cibles : cas de l'exposition de *Lymnaea stagnalis* au diclofénac », Bouly L., Fenet H., Carayon J.-L., Gomez E., Géret F., Courant F.
- **SETAC Europe 2021** – Online – Mai 2021 – Chronic effects of diclofenac on a freshwater gastropod, *Lymnaea stagnalis*, Bouly L., Malgouyres J.-M., Vignet C., Bonnafé E., Courant F., Fenet H., Géret F.
- **Webinaire du réseau ECOTOX** – En ligne – Novembre 2020 – « Effets d'une exposition longue au diclofénac sur un gastéropode d'eau douce, *Lymnaea stagnalis* », Bouly L., Malgouyres J.-M., Courant F., Fenet H., Géret F.

### Animations scientifiques :

- **Festival Scientilivre** – En ligne – Mars 2021 – Par un doctorant / Raconte-nous ...
- **Nuit Européenne des Chercheurs** – En ligne – Novembre 2020 – Flash Conf' Mystères
- **Café-Science** – Albi – Octobre 2019 – « Il était une fois... un escargot sous Voltaren® »

## Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX .....	vi
LISTE DES ANNEXES .....	vi
LISTE DES ABREVIATIONS .....	vii
INTRODUCTION GENERALE .....	1
CHAPITRE I : Etat de l'art .....	7
I.    Produits pharmaceutiques et devenir dans l'environnement .....	9
A.    Consommation .....	9
B.    Sources de médicaments dans l'environnement .....	10
C.    Les traitements en station d'épuration.....	11
D.    Concentrations en médicaments dans l'environnement .....	14
II.   Le diclofénac.....	15
A.    Généralités et mécanisme d'action.....	15
B.    Consommation .....	17
C.    Métabolisme .....	17
D.    Dégradation et occurrence dans l'environnement .....	18
E.    Bioaccumulation et effets du diclofénac chez les invertébrés aquatiques.....	20
III.  Utilisations d'approches innovantes en écotoxicologie : les omiques.....	27
A.    Généralités .....	27
B.    Transcriptomique .....	28
C.    Protéomique.....	28
D.    Métabolomique.....	29
E.    Utilisation en écotoxicologie et enjeux .....	29
IV.   Lymnaea stagnalis .....	31
A.    Généralités .....	31
B.    Physiologie.....	31
C.    Modèle d'intérêt en écotoxicologie .....	37
V.   Objectifs de la thèse .....	38

CHAPITRE II : Caractérisation du métabolisme du diclofénac chez le gastéropode aquatique <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	41
I. Synthèse .....	43
II. Article n°1 .....	45
CHAPITRE III : Evaluation des effets du diclofénac à long terme et à concentrations environnementales : une étude multi-omique et multigénérationnelle .....	69
I. Prérequis .....	71
A. Détermination de la relation entre la taille de la coquille et le degré de maturité sexuelle .....	71
B. Caractérisation de la locomotion au cours de la journée .....	73
II. Synthèse .....	76
III. Article 2 .....	80
IV. Article 3 .....	107
CHAPITRE IV : Discussion générale.....	127
I. Application des méthodes omiques chez <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	129
A. Métabolomique.....	129
B. Transcriptomique .....	130
C. Intégration des données métabolomiques et transcriptomiques .....	131
II. Effets du DCF chez <i>L. stagnalis</i> .....	133
A. Toxicité liée aux voies de biotransformation du diclofénac.....	133
B. Effets chroniques du DCF chez <i>L. stagnalis</i> .....	135
Conclusion générale et perspectives.....	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	148
ANNEXES.....	161

## LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE I : Etat de l'art

Figure I-1 - Evolution de la consommation de médicaments en ville en unité standard par habitant (unité commune aux différents dosages et présentations) (Leem, 2020) .....	9
Figure I-2 – Evolution du nombre de personnes de 65 ans et plus, 75 ans et plus et 85 ans et plus de 1950 à 2050 dans les 40 pays à longévité élevée (Bonnet et al., 2021).....	10
Figure I-3 – Principales sources de molécules médicamenteuses dans l'environnement. ....	11
Figure I-4 - Procédés classiques de traitement des eaux usées en station d'épuration (Sispea, 2009) 12	
Figure I-5 - Classes thérapeutiques détectées dans l'environnement (pourcentage relatif). Données collectées sur 134 articles publiés entre 1997 et 2009 (Santos et al., 2010).....	15
Figure I-6 - Structure et nom systématique du diclofénac (Mulkiewicz et al., 2021) .....	16
Figure I-7 - Mécanisme d'action établi du diclofénac. COX : cyclooxygénase, PG : prostaglandine, Tx : thromboxane.....	16
Figure I-8 - Carte de la consommation annuelle de diclofénac au niveau national (adapté de Acuña et al. (2015)) .....	17
Figure I-9 - Métabolisme du diclofénac chez l'homme (Vieno and Sillanpää, 2014) .....	18
Figure I-10 - Carte mondiale de la concentration médiane de diclofénac dans les écosystèmes d'eau douce (adapté de Acuña et al. (2015)).....	20
Figure I-11 - Les différents niveaux omiques .....	27
Figure I-12- Etudes d'écotoxicologie et de stress écologique entre 2000 et 2020 qui ont utilisé une ou plusieurs méthode omiques pour investiguer les changements moléculaires après l'exposition à un stresser environnemental ou chimique (Ebner, 2021) .....	30
Figure I-13 - Répartition géographique de <i>L. stagnalis</i> . Les endroits où cette espèce a été identifiée sont représentés avec des hexagones, qui sont jaunes lorsque la densité est faible et rouges lorsque la densité est élevée (GBIF Secretariat, 2021).....	31
Figure I-14 – A) <i>L. stagnalis</i> mangeant de la salade et B) Ponte de <i>L. stagnalis</i> (photographies personnelles).....	32
Figure I-15 - Cycle de vie de <i>L. stagnalis</i> en conditions de laboratoire (21°C, 16h jour, 8h nuit). .....	33
Figure I-16 – Morphologie générale du système reproducteur et des mouvements des gamètes (Koene, 2010). Les lignes pointillées et les flèches bleues indiquent le chemin que prennent les propres spermatozoïdes de l'escargot (autosperme) après avoir été produits pour être stockés (dans les vésicules séminales) et ensuite transférés à un partenaire. Les lignes pointillées et les flèches rouges indiquent le destin des spermatozoïdes reçus (allosperme) dans le tractus femelle. Tous les organes sont indiqués par des lettres majuscules. Les différents composants de la ponte (« egg mass ») sont indiqués en lettres minuscules, et leur origine est indiquée par une flèche noire. Les lignes pleines rouges indiquent le parcours des œufs pendant leur conditionnement dans le tractus femelle. BC,	



bursa copulatrix ; C, carrefour/poche de fécondation ; CA, canal de l'allosperme ; CD, canal déférent ; CH, canal hermaphrodite ; CS, canal spermatique ; féc, fécondation ; GA, glande albumen ; lp, liquide périvitellin ; ls, liquide séminal ; M, glande mucipare ; me, membrana externa ; mi, membrana interna ; o, ovocyte ; O, glande oothéciale ; OT, ovotestis ; P, pénis ; PCO, pars contorta ; PE, préputium ; PG, prostate ; tc, tunica capsulis ; ti, tunica interna ; V, oviducte ; VS, vésicules séminales.....	34
Figure I-17 – Postures caractéristiques de la ponte. A) Phase de repos ; B) Phase de retournement ; C) Oviposition ; D) Inspection (Ter Maat et al., 1989).....	35
Figure I-18 - Dessin schématique des ganglions impliqués dans la reproduction du système nerveux central. Les zones bleues et rouges indiquent, respectivement, les groupes de neurones impliqués dans la reproduction mâle et femelle. Les substances impliquées dans la reproduction mâle sont également indiquées en bleu ; les substances femelles sont indiquées en rouge. com, commissure cérébrale ; icn, nerf cervical inférieur ; ni, nervus intestinalis ; np, nervus penis ; RN, anneau ganglionnaire ; RPeN, neurone pédieux droit ; st statocyste. ....	36
Figure I-19 - Représentation schématique d'une vue latérale de l'appareil locomoteur chez <i>L. stagnalis</i> montrant les cils (c), les cellules ciliées (cc), les cellules musculaires ; la flèche montre l'onde ciliaire métachrone et direction de la limnée (Pavlova, 2010).....	37

### CHAPITRE III : Evaluation des effets du diclofénac à long terme et à concentrations environnementales : une étude multi-omique et multigénérationnelle

Figure III-1 - Mesure de la longueur de coquille d'une limnée à l'aide d'un pied à coulisse électronique (photographies personnelles). ....	71
Figure III-2– Photographies annotées du système reproducteur de la limnée prises sous loupe binoculaire.....	72
Figure III-3 – Photographie de spermatozoïdes de <i>L. stagnalis</i> observés au microscope [x400]. ....	72
Figure III-4– Déplacement des animaux enregistré par Ethovision XT. 16 individus ont été étudiés par enregistrement, image filmée par caméra Basler acA 1300-60 gm, lens Kowa LMVZ4411. ....	74
Figure III-5 – Distances parcourues par les limnées pendant le test de locomotion de 2h. A) Moyennes des distances parcourues (mm) en 2 min pendant 2 h, normalisées par la taille de la coquille (mm). B) Moyenne des distances totales parcourues (mm) en 1 h pendant l'heure 1 et l'heure 2, normalisées par la taille de coquille. AM : matin ; PM : après-midi ; Total : pool des groupes matin et après-midi. *p<0.05, †p<0.1, comparé à la distance parcourue pendant l'heure 1. ....	75
Figure III-6 – Design expérimental de l'exposition de <i>L. stagnalis</i> au diclofénac pendant 3 générations. Pour la génération parentale, l'exposition a commencé au stade embryonnaire, au premier jour de la ponte. Les paramètres d'histoire de vie (éclosion, tailles des coquilles, reproduction), comportementaux (locomotion, prise alimentaire, stress lumineux), et moléculaires (métabolomique, transcriptomique), ont été mesurés à divers stades du cycle de vie. Les expositions ont été poursuivies sur la descendance, avec des paramètres d'histoire de vie et comportementaux mesurés sur deux générations supplémentaires. Pour la génération F1, suite à un problème au stade juvénile pour le	

groupe exposé à 0,1 µg/L, les contrôles ont été scindés en deux puis repoolées après éclosion de la génération F2. .... 77

#### CHAPITRE IV : Discussion générale

Figure IV-1 – Graphique représentant les GO terms des gènes différentiellement exprimés dans les appareils reproducteurs (en rouge) et les têtes (en gris) des limnées exposées au diclofénac lors de l'étude présentée dans le chapitre III. Le graphique a été tracé avec WEGO (Web Gene Ontology Annotation Plotting) (Ye et al., 2018)..... 131

Figure IV-2 – Métabolites de la voie de formation de novo du NAD<sup>+</sup> sur modulés (↗) et sous modulé (↘) dans l'appareil reproducteur de limnées exposées 16 semaines au DCF (10 µg/L). Le métabolite souligné a été identifié avec un niveau d'annotation de 2 (Sumner et al., 2007), les métabolites en italique n'ont pas été identifiés. ERO : Espèces réactives de l'oxygène. .... 134

Figure IV-3 – Hypothèses des conséquences du métabolisme du DCF chez la limnée..... 135

Figure IV-4 – Fonctions perturbées chez *L. stagnalis* suite à une exposition chronique au DCF. En bleu sont représentés les effets supposés du DCF au vu des modifications observées à l'échelle moléculaire ; en vert les paramètres d'histoire de vie et en orange les paramètres comportementaux. .... 136

Figure IV-5 – Hypothèses de l'impact d'une exposition au DCF sur le métabolisme énergétique de la limnée et conséquences sur l'osmorégulation. Les métabolites inscrits en italique ont été observés comme modulés chez les limnées exposées au DCF pendant tout leur cycle de vie, à 0,1 ou 10 µg/L, les flèches rouges représentent l'impact supposé du DCF. .... 137

Figure IV-6 – Hypothèses des effets du DCF sur les réactions d'oxydoréduction. Les flèches représentent le sens des modulations hypothétiques ; les composés en rouge ont été identifiés comme sous-modulés ou sous-exprimés, les composés en vert comme sur-modulés ou sur-exprimés chez les limnées exposées toute leur vie à 10 µg/L de DCF. En italique sont représentés les métabolites, en souligné sont représentés les DEGs. CySSG : Disulfure de cystéine et glutathion ; DUOX2 : Dual oxydase 2 ; GGT1 : Glutathion hydrolase 1 ; GPx : Glutathion peroxydase ; GR : Glutathion réductase ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; Pxdn : Peroxydasine ; Pxt : Chorion peroxydase ; SOD : Superoxyde dismutase. .... 138

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I : Etat de l'art

Tableau I-1 - Facteurs de bioconcentrations (FBC) du diclofénac chez différentes espèces d'invertébrés aquatiques.....	21
--	----

### CHAPITRE III : Evaluation des effets du diclofénac à long terme et à concentrations environnementales : une étude multi-omique et multigénérationnelle

Tableau III-1 – Pourcentage d'individus présentant les organes sexuels totalement formés (score 2) et la présence de spermatozoïdes pour chaque catégorie de taille de coquille.....	73
--	----

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE I : Supplementary data article n°1 .....	162
ANNEXE II : Supplementary data article n°2 .....	178
ANNEXE III : Supplementary data article n°3 .....	202
ANNEXE IV : Voies métaboliques impactées lors de l'intégration des données métabolomiques et transcriptomiques .....	208

## LISTE DES ABREVIATIONS

3'OH-DCF : 3'-hydroxydiclofénac	GSSG : Glutathion oxydé
4'OH-DCF : 4'-hydroxydiclofénac	GST : Glutathion-S-Transférase
5OH-DCF : 5-hydroxydiclofénac	HRMS : Spectrométrie de Masse Haute
AChE : AcétylCholine Estérase	Résolution
ADN : Acide Désoxyribonucléique	LC : Chromatographie en phase Liquide
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien	LEEM : Les entreprises du médicament
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	LMS : Stabilité de la Membrane Lysosomale
Amperes : Analyse de Micropolluants	LPO : Péroxydation Lipidique
Prioritaires et Emergents dans les Rejets et les Eaux Superficielles	MS : Spectrométrie de Masse
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament	MT : Méthallothionéine
ARN : Acide Ribonucléique	N,5-diOH-DCF : N,5-dihydroxydiclofénac
ATP : Adénosine TriPhosphate	NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
CAT : Catalase	NDOR1 : NADPH-dependant diflavin oxidoreductase 1
CE50 : Concentration Efficace 50	NO : Oxyde Nitrique
CL50 : Concentration Létale 50	NOS : Oxyde Nitrique Synthase
COX : Cyclooxygénase	NQE : Norme de Qualité Environnementale
CYP : Cytochrome P450	OCDE : Organisme de Coopération et de Développement Economiques
CySSG : Disulfure de cystéine et glutathion	PNM : Plan National Micropolluants
DCF : Diclofénac	PNRM : Plan National sur les Résidus de Médicaments dans les eaux
DEG : Gènes Différentiellement Exprimés	PNSE : Plan National Santé Environnement
DT50 : Temps de Dissipation 50	RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
DUOX2 : Dual Oxydase 2	RNA-Seq : Séquençage ARN
ERA : Evaluation du Risque Environnemental	SOD : Superoxyde Dismutase
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène	spe : semaine(s) post-éclosion
FBC : Facteur de Bioconcentration	STEP : Station d'Épuration
GC : Chromatographie en phase Gazeuse	TBT : Tributylétain
GGT1 : Glutathion hydrolase 1	
GO : <i>Gene Ontology</i>	
GR : Glutathion Réductase	
GSH : Glutathion réduit	



---

---

**INTRODUCTION GENERALE**

---

---



Les médicaments constituent une classe de micropolluants ayant suscité une préoccupation accrue ces dernières décennies. En effet, les taux d'évolution des quantités totales, de diversité et d'expansion géographique des composés synthétiques sont au moins équivalents ou supérieurs à ceux de la plupart des agents du changement climatique reconnus jusqu'ici, tels que le dioxyde de carbone atmosphérique, la pollution par les nutriments, la destruction des habitats et la perte de biodiversité (Bernhardt et al., 2017). En France, cette inquiétude grandissante a été matérialisée dans le cadre du plan national santé environnement (PNSE 1, 2004-2008), qui a conduit à des campagnes d'analyse des résidus de médicaments par les agences de l'eau confirmant la présence de médicaments dans les eaux de surface. A la suite du PNSE 1 et du plan cancer 2003-2007, qui s'est intéressé aux résidus de médicaments anticancéreux dans l'environnement aquatique, un plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux a été lancé (PNRM, 2011-2015). Ce dernier a notamment permis la réalisation d'un état des lieux de la contamination des eaux et des sols, et la mise en place de dispositifs de surveillance des milieux (Bilan du PNRM, 2015). Les médicaments, reconnus comme micropolluants des milieux aquatiques, ont été intégrés dans le plan micropolluants 2 (PNM 2, 2016-2021), qui vise la préservation de la qualité des eaux et de la biodiversité. Ce plan intègre l'identification et la conduite d'actions concrètes pour réduire la pollution à la source, la consolidation des connaissances sur la présence des micropolluants dans les eaux et leur impact sur la santé et la biodiversité, ainsi que la poursuite des objectifs non atteints précédemment, tel que la priorisation des molécules d'intérêt.

Les produits pharmaceutiques sont des contaminants dits « émergents », il s'agit de substances aux effets incertains mais susceptibles de causer des dommages notables sur l'environnement (Luo et al., 2014). L'impact négatif de certaines molécules sur l'environnement a malheureusement déjà été prouvé, avec par exemple la féminisation des poissons suite à une exposition au 17  $\alpha$ -éthinyloestradiol (Clouzot et al., 2008), et le déclin des populations de vautour en Asie du Sud-Est lié à l'ingestion de carcasses de bœufs contaminées au diclofénac (Oaks et al., 2004). Au titre de la directive européenne Cadre sur l'eau (2000/60/CE) établissant un cadre pour une politique globale communautaire dans le domaine de l'eau, une liste de vigilance dans le domaine de la politique de l'eau a été établie. Cette liste vise à recueillir des données de surveillance afin d'évaluer le risque représenté par ces substances, et de déterminer si des normes de qualité environnementales devraient être fixées. Publiée pour la première fois en 2015, elle a introduit des médicaments parmi les substances à surveiller : le 17  $\alpha$ -éthinyloestradiol, le 17  $\beta$ -estradiol, le diclofénac et la famille des antibiotiques macrolides (érythromycine, clarithromycine, azithromycine) (European Commission, 2015). L'Union Européenne a publié en décembre 2020 une vue d'ensemble sur les progrès réalisés suite à la mise en application de l'approche stratégique sur les produits pharmaceutiques dans l'environnement (European Union, 2020). Le constat est encourageant, avec par exemple les initiatives



du Pacte Vert européen qui ont permis de réduire l’empreinte environnementale des médicaments, notamment en réduisant les ventes européennes d’antimicrobiens pour les animaux d’élevage et en aquaculture.

Cependant, selon un rapport de l’OCDE (2019), la présence de résidus médicamenteux dans les environnements aquatiques reste alarmante. En effet, les impacts potentiels que peuvent avoir les médicaments sur l’environnement ne sont pas systématiquement étudiés et il y a une absence de données de toxicité environnementale pour 88% des principes actifs utilisés en santé humaine. De plus, les molécules pharmaceutiques sont conçues pour être actives et interagir avec des cibles spécifiques, même à de faibles concentrations. Dans l’environnement aquatique, cette pollution peut courir sur du long terme, et impacter les organismes non-cibles via de multiples voies d’exposition. L’OCDE recommande d’intégrer le risque environnemental tout au long du cycle de vie des produits pharmaceutiques, de la source jusqu’aux rejets, en passant par la consommation, afin de traiter efficacement cette problématique. Actuellement et depuis 2006, pour toute nouvelle demande d’Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) d’un médicament, une évaluation du risque environnemental (ERA) est requise, en vue d’évaluer l’impact environnemental sur la faune et la flore, ainsi que son devenir dans l’environnement (Directive 2004/27/CE). Cependant, cette obligation n’étant pas rétrospective, de nombreuses molécules déjà sur le marché ont été exemptées de cette procédure. Une évaluation du risque environnemental posé par ces polluants, dont on connaît à présent l’occurrence dans l’environnement, et pour lesquels le rejet n’est pas réglementé, est par conséquent nécessaire.

Les effets toxiques potentiels de ces molécules sont étudiés par de nombreux chercheurs, cependant les études publiées sont constituées en majorité d’études d’exposition aiguë (Batucan et al., 2021; Santos et al., 2010). Par conséquent, les évaluations du risque environnemental des molécules pharmaceutiques sont extrapolées à partir de données de toxicité aiguë, partant du principe que les effets observés dans ces études sont similaires à ceux induits par une exposition chronique à de faibles concentrations (Kümmerer, 2010; Verlicchi et al., 2012). Il est donc nécessaire de générer des informations qualitatives sur l’impact chronique de ces molécules, qui peuvent persister dans l’environnement, chez les espèces non cibles. Les organismes étant généralement exposés à ces polluants durant de multiples générations, il est pertinent d’évaluer l’impact de ces contaminants dans le cadre d’études multigénérationnelles. Parmi les espèces susceptibles d’être en contact avec ces contaminants, les mollusques sont largement répandus dans le monde et représentent une fraction majeure des écosystèmes aquatiques (Oehlmann and Schulte-Oehlmann, 2003). De plus, les mollusques dulcicoles, constitués des bivalves et des gastéropodes, représentent le groupe

taxonomique le plus menacé par l'extinction en Europe, avec comme première menace la pollution et le déclin de la qualité de l'eau (European Commission, 2011). La sensibilité de ces espèces aux résidus médicamenteux doit donc être attentivement étudiée.

C'est dans ce contexte que la présente étude a été réalisée, avec pour objectif d'améliorer les connaissances sur l'impact écotoxicologique du diclofénac, un des premiers médicaments inscrit sur la liste européenne de vigilance des substances à risque dans le domaine de la politique de l'eau. Les études de toxicité environnementale des polluants réalisées à long terme restant limitées, ce projet s'est intéressé à l'évaluation des effets du diclofénac sur plusieurs générations chez le gastéropode dulcicole *Lymnaea stagnalis*, avec l'utilisation d'approches omiques. Ce travail est divisé en 4 chapitres. Le premier chapitre est un état de l'art, qui traite tout d'abord du devenir des produits pharmaceutiques, de leur consommation jusqu'à leur rejet dans les écosystèmes. Puis le cas du diclofénac est introduit plus particulièrement, avec son mécanisme d'action, sa consommation, le métabolisme humain, ainsi que la dégradation de la molécule dans les stations d'épuration et son occurrence dans l'environnement. Une revue de la littérature portant sur les études de bioaccumulation et de toxicité de ce médicament, réalisées sur les invertébrés aquatiques, est détaillée dans cette sous-partie. Les progrès réalisés dans les différentes approches omiques et leurs intérêts en écotoxicologie sont ensuite mis en lumière. Enfin, l'organisme modèle *Lymnaea stagnalis* est décrit et les objectifs de la thèse sont détaillés. Le second chapitre est consacré aux produits de biotransformation du diclofénac formés chez *L. stagnalis*, dans le but de caractériser le métabolisme des molécules organiques chez cet organisme. Le troisième chapitre présente les impacts du diclofénac lors d'une exposition de ce gastéropode aquatique durant tout son cycle de vie, tant au niveau physiologique et comportemental que moléculaire (transcriptome et métabolome). Les effets physiologiques et comportementaux d'une exposition multigénérationnelle, surtout focalisés sur le stade adulte, y sont également détaillés. Puis le quatrième et dernier chapitre est un bilan de ces études et est suivi d'une conclusion générale qui présente les perspectives.



---

---

**CHAPITRE I : Etat de l'art**

---

---



## I. Produits pharmaceutiques et devenir dans l'environnement

### A. Consommation

En France, 2800 molécules pharmaceutiques différentes ont été rapportées sur le marché en 2013 (ANSM, 2013). La France a longtemps été présentée comme l'un des premiers pays consommateurs de médicaments, cependant cette affirmation est de plus en plus contestable. Le panorama de la santé de l'OCDE de 2017 classe en effet la France dans la moyenne européenne pour 4 grandes classes de médicaments (antihypertenseurs, hypocholestérolémiants, antidiabétiques et antidépresseurs) (OECD, 2017). La consommation de médicaments en France a eu tendance à diminuer depuis 2004 (Fig. I-1), quand dans le même temps, la consommation dans d'autres pays européens a augmenté (Leem, 2020).

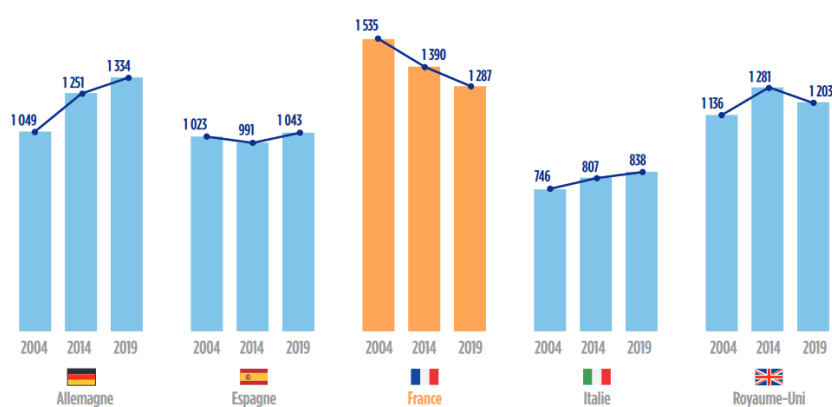


Figure I-1 - Evolution de la consommation de médicaments en ville en unité standard par habitant (unité commune aux différents dosages et présentations) (Leem, 2020)

Cette tendance à l'augmentation est susceptible de se confirmer dans le futur étant donné la croissance de la population mondiale, associée à son vieillissement. En effet, une prévision de l'évolution du nombre de personnes âgées de plus de 65, 75 et 85 ans a été réalisée par Bonnet et al. (2021) pour les 40 pays à longévité plus élevée, à partir du scénario médian des Nations unies (Fig. I-2). Alors qu'en 2020 ces pays comptent 222 millions de personnes âgées de 65 ans et plus, ils risquent d'atteindre 324 millions en 2050, soit une hausse de 46% de cette catégorie. Cette croissance est d'autant plus marquée pour la population des plus de 85 ans, pour laquelle une hausse de 132% est prédite dans les 30 prochaines années. Les personnes âgées étant les plus fortes consommatrices de médicaments, cette augmentation devrait se répercuter sur la consommation globale.

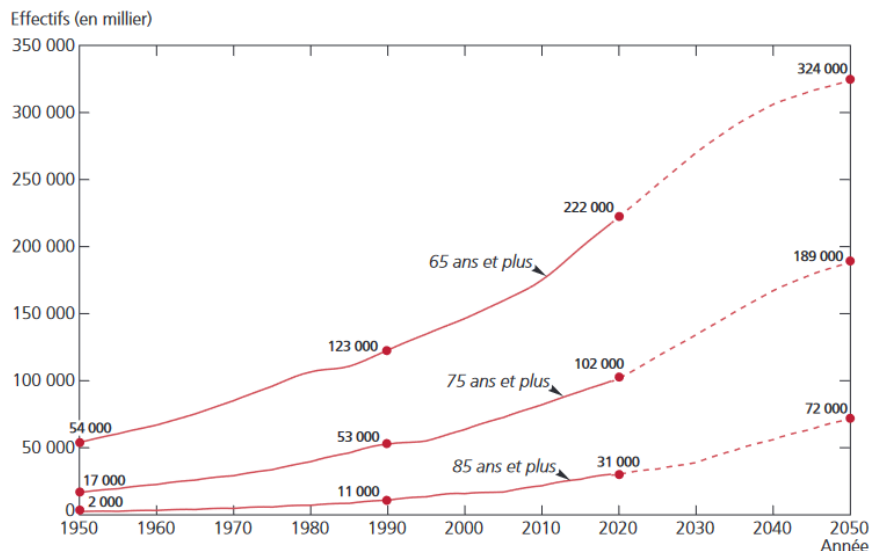


Figure I-2 – Evolution du nombre de personnes de 65 ans et plus, 75 ans et plus et 85 ans et plus de 1950 à 2050 dans les 40 pays à longévité élevée (Bonnet et al., 2021).

En France, la substance active la plus consommée est le paracétamol, avec 500 millions de boîtes vendues en 2013 (ANSM, 2013). Les autres principes actifs les plus employés appartiennent à la classe des analgésiques, anti-inflammatoires, mais aussi des antibiotiques (pénicillines) et des benzodiazépines. En Europe, c'est également le paracétamol qui est le plus consommé malgré des différences de populations entre les pays (Pereira et al., 2020). Une forte consommation d'antibiotiques ainsi que d'hypolipémiants est observée au niveau européen.

## B. Sources de médicaments dans l'environnement

Les substances pharmaceutiques peuvent avoir un usage en santé humaine, sur prescription ou en automédication, mais également un usage vétérinaire (Fig. I-3). Les rejets des particuliers sont les premiers responsables de la contamination des eaux par les produits pharmaceutiques (Pereira et al., 2020). Après consommation des médicaments, les molécules actives sont métabolisées dans le corps et excrétées en composés plus polaires (Kümmerer, 2010). De plus, les médicaments inutilisés ou périmés sont souvent jetés dans les toilettes ou dans les lavabos, les molécules actives se retrouvant ainsi dans le circuit d'eaux usées domestiques (Nikolaou et al., 2007). Les hôpitaux sont une source de présence des médicaments dans les eaux, mais de manière moindre car ils représentent classiquement moins de 3% des rejets pour la plupart des substances pharmaceutiques (Kümmerer, 2010). Les eaux provenant de sites de production des médicaments peuvent contribuer à la pollution aquatique médicamenteuse, notamment dans certaines localisations du globe où la production est majeure (Fick et al., 2009). La dispensation de spécialités vétérinaires destinées d'une part aux animaux de compagnie, et d'autre part à la pisciculture et à l'élevage, va également concourir aux rejets de molécules pharmaceutiques dans l'eau.

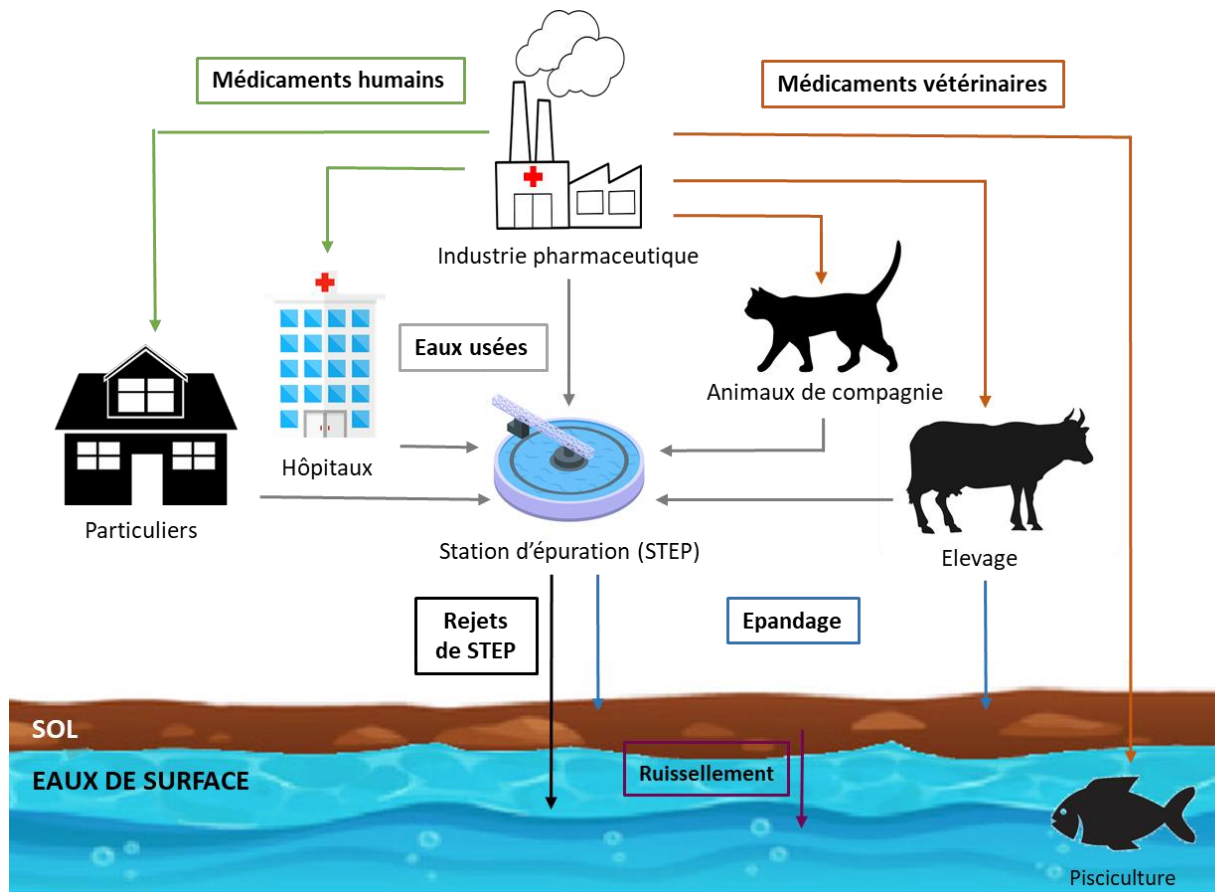


Figure I-3 – Principales sources de molécules médicamenteuses dans l'environnement aquatique.

Ces eaux usées de provenances diverses vont être traitées en station d'épuration (STEP) puis être rejetées dans les eaux de surface. Cependant, les traitements conventionnels ne permettent pas d'éliminer complètement les contaminants émergents présents dans les eaux (Ebele et al., 2017). Les boues issues des STEP et les effluents d'élevage (urines et fèces des animaux ayant été traités avec des médicaments) sont des sources de contamination des sols car ils sont épandus pour servir de fertilisants en agriculture (Santos et al., 2010). Par ruissellement, les contaminants des sols peuvent être entraînés dans les eaux de surface. De plus, l'usage des médicaments en pisciculture va contaminer les milieux aquatiques de manière directe. Les molécules présentes dans les eaux de surface et dans les sols peuvent atteindre les nappes phréatiques par transfert, et se retrouver par la suite dans les circuits d'eau potable (Ebele et al., 2017).

### C. Les traitements en station d'épuration

Il existe plusieurs méthodes en station d'épuration pour l'élimination des contaminants de l'eau avant le rejet dans l'environnement aquatique. Ces traitements ont été conçus pour être efficaces dans l'élimination des composés carbonés, azotés ou phosphorés, arrivant dans des concentrations de l'ordre du mg/L ainsi que des microorganismes (minimum  $10^6$  Most Probable Number (MNP)/100 mL)



(Couto et al., 2019). L'élimination de molécules organiques présentes en concentrations faibles n'a pas été prévue dans les systèmes classiques. Les procédés utilisés peuvent faire appel à des méthodes physiques, chimiques, ou biologiques.

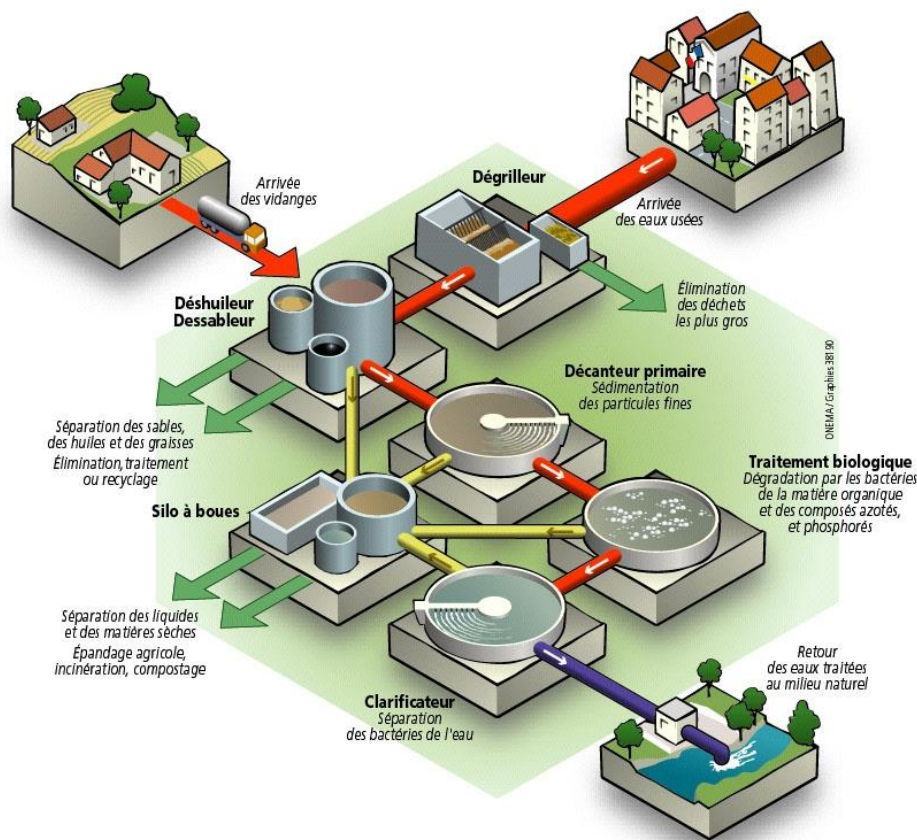


Figure I-4 - Procédés classiques de traitement des eaux usées en station d'épuration (Sispea, 2009).

Classiquement, lors de l'arrivée des eaux dans la station, il y a des étapes de prétraitement : une première étape de dégrillage (Fig. I-4), suivie de dessablage et de déshuilage et dégraissage. Ces procédés permettent l'élimination des déchets solides grossiers, du sable, des graviers, ainsi que des huiles et graisses (Sispea, 2009). Un traitement primaire est ensuite effectué afin de séparer les matières en suspension de la phase dissoute (Pereira et al., 2020). Ces matières en suspension décantent dans le fond des bassins. Des sels de fer ou d'aluminium sont parfois ajoutés dans l'eau pour réduire les forces électrostatiques de répulsion entre les particules et permettre la coagulation. Un brassage de l'eau peut être réalisé pour agglomérer les particules entre elles (floculation) et augmenter leur masse afin de faciliter leur dépôt dans le fond du bassin. Ces procédés sont peu efficaces pour l'élimination des substances pharmaceutiques, qui peuvent présenter de faibles capacités d'absorption sur les particules de par leurs propriétés hydrophiles (Couto et al., 2019; Luo et al., 2014). Le projet Amperes (Analyse de Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets et les Eaux Superficielles), qui a étudié l'efficacité des traitements en STEP française sur une large gamme de polluants, confirme la faible efficacité des traitements primaires sur les molécules pharmaceutiques

(Soulier et al., 2011). Le traitement secondaire biologique consiste ensuite à dégrader les matières organiques dissoutes à l'aide de bactéries. Le système des boues activées, par lequel on insuffle de l'air dans l'eau, qui est ensuite brassée, afin de multiplier naturellement les microorganismes présents dans le milieu, est un traitement classiquement utilisé. Ce procédé est plus efficace que le traitement primaire pour l'élimination des molécules pharmaceutiques : sur 38 molécules pharmaceutiques suivies dans le cadre du projet Amperes, 19 ont présenté des rendements d'élimination supérieurs à 70% à la suite de ce traitement (Soulier et al., 2011). Les produits pharmaceutiques sont sensibles aux processus biologiques d'élimination via la partition, l'adsorption, la biotransformation et la biodégradation (Couto et al., 2019). A la fin du traitement biologique, les bactéries sont séparées par décantation de l'eau, c'est ce qu'on appelle la clarification.

La dégradation des produits pharmaceutiques par les procédés utilisés en STEP est influencée par les conditions opérationnelles et environnementales (temps de rétention hydraulique, temps de rétention des boues, température, pH), mais également par les propriétés physicochimiques des molécules (Pereira et al., 2020). Le partitionnement d'une molécule dans l'eau lié à son hydrophilie ou sa lipophilie (exprimé par le  $\log K_{ow}$ ) n'est pas la seule force qui opère. Les interactions électrostatiques, les liaisons chimiques et les forces non spécifiques entre les molécules ionisées et la matière organique peuvent rentrer en ligne de compte. Le pH de l'eau peut jouer un rôle important dans ces interactions, étant donné que les composés pharmaceutiques présentent une large amplitude de pKa. Le partitionnement octanol/eau pour les composés ionisables est exprimé par le  $\log D_{ow}$ , qui prend en compte le pKa du composé et sera variable selon le pH de l'eau. Les composés hydrophobes ( $\log D_{ow} > 3$ ) vont généralement être éliminés par absorption sur les boues de la station d'épuration, tandis que les composés avec un  $\log D_{ow}$  entre 1,5 et 3 vont être éliminés par biodégradation (Pereira et al., 2020). Les substances actives hydrophiles, comme le triméthoprime, le sulpiride ou l'aténolol ( $\log D_{ow} < 1.5$ ) restent dissoutes dans l'eau (Couto et al., 2019). Les traitements primaires, qui se font principalement par des mécanismes de sorption, seront peu efficaces sur les molécules hydrophiles. Un long temps de rétention des boues va favoriser le développement de microorganismes spécialisés dans la dégradation de l'azote, et va influencer la biodégradation des molécules hydrophobes. Un temps de rétention solide de 10 jours est généralement efficace pour la dégradation des polluants (Clara et al., 2005). La dégradation microbienne est un mécanisme majeur dans la dégradation des médicaments polaires acides, cependant il est possible que certaines substances actives aient un effet inhibiteur sur les microorganismes (Pala-Ozkok et al., 2014; Wang and Gunsch, 2011). Des taux d'abattement négatifs peuvent également être signalés pour certaines molécules, majoritairement liés à la déconjugaison des métabolites (Verlicchi et al., 2012).

Certaines stations d'épuration peuvent utiliser des traitements tertiaires, associés à un coût plus important. Il peut s'agir des processus avancés d'oxydation, de rayonnements ultraviolets ou

d'ozonation, par exemple (Pereira et al., 2020). Ces nouveaux procédés peuvent améliorer l'élimination des molécules pharmaceutiques. L'adsorption sur charbon activé est notamment une méthode performante, ne générant pas de composés toxiques ou pharmacologiquement actifs. L'efficacité de traitements d'affinage (décantation rapide, filtration sur sable, lagunage) et de traitements avancés (ozonation, filtration sur charbon actif, osmose inverse) a été évaluée sur 38 molécules pharmaceutiques (Soulier et al., 2011). Les résultats ont montré une faible efficacité des traitements d'affinage mais de bonnes performances des traitements tertiaires avancés. Cependant, tous ces traitements réalisés en STEP peuvent non seulement conduire à une élimination insuffisante des médicaments, mais également générer des sous-produits ayant conservé un potentiel toxique.

#### D. Concentrations en médicaments dans l'environnement

Les concentrations en médicaments détectées dans l'environnement sont étroitement reliées à leur consommation, leur biodégradabilité et leur solubilité dans l'eau. C'est le rejet continu de ces composés, associé aux efficacités variables des traitements de STEP qui entraînent la présence de ces molécules dans le compartiment aquatique. Les techniques les plus utilisées pour la détection de ces molécules sont la GC-MS, la LC-MS et la LC-MS/MS (Nikolaou et al., 2007). Les progrès réalisés en chimie analytique ont augmenté la sensibilité de ces techniques conduisant à un nombre accru d'études sur l'occurrence de produits pharmaceutiques dans l'environnement. La première étude révélant la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement a été réalisée aux USA en 1976, avec la détection de l'acide clofibrique dans les rejets de STEP, à des concentrations allant de 0,8 à 2 µg/L (Garrison et al., 1976). Richardson and Bowron (1985) ont montré la présence de produits pharmaceutiques dans la rivière Lee en Angleterre à des concentrations allant jusqu'à 1 µg/L. Depuis, de nombreuses études signalant la présence de produits pharmaceutiques dans l'environnement ont été réalisées. La contamination des milieux aquatiques par les résidus médicamenteux est aujourd'hui très documentée (Ebele et al., 2017; Fekadu et al., 2019; Nikolaou et al., 2007). Comme décrit ci-dessus, selon les propriétés physicochimiques des molécules, les traitements classiques en STEP peuvent présenter de faibles efficacités. De plus, le rejet continu dans l'environnement des substances actives intrinsèquement non persistantes peut conduire à les considérer comme « pseudo-persistantes » (Daughton, 2003). En effet, même si les processus environnementaux de biodégradation, de photodégradation et de sorption sur les particules sont efficaces sur ce type de composé, ils seront toujours présents dans l'environnement, conduisant à une exposition accrue des organismes (Ebele et al., 2017).

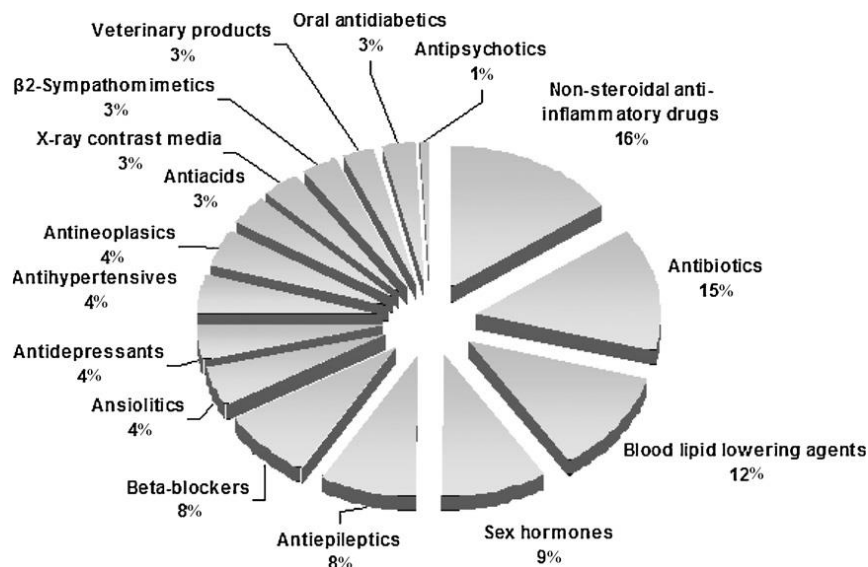


Figure I-5 - Classes thérapeutiques détectées dans l'environnement (pourcentage relatif). Données collectées sur 134 articles publiés entre 1997 et 2009 (Santos et al., 2010).

Santos et al. (2010) ont listé les classes thérapeutiques les plus détectées dans l'environnement (Fig. I-5). Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS), les hypolipémiants et les antibiotiques sont les plus représentés, correspondant aux classes de médicaments les plus consommées. Les concentrations médicamenteuses retrouvées dans les eaux sont classiquement de l'ordre du ng/L et dépassent rarement quelques µg/L (Ebele et al., 2017). Les molécules médicamenteuses sont également détectées dans les sédiments et dans les boues de STEP, généralement en quantité inférieure à 100 ng/g (Martin et al., 2014; Osorio et al., 2016). Les classes thérapeutiques les plus représentées sont les plus étudiées en écotoxicologie.

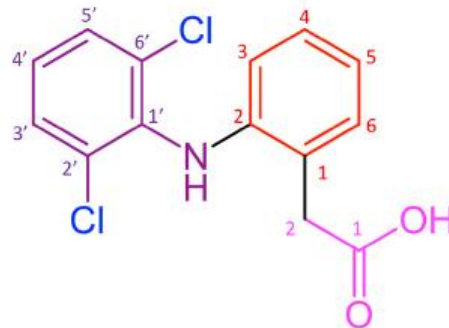
Comme décrit dans l'introduction générale, pour évaluer le risque environnemental des contaminants, la Commission européenne a mis en place une liste de vigilance de substances à surveiller dans les milieux aquatiques (Directive 2013/39/UE). Cette liste, qui en 2015 comportait 17 molécules (dont le diclofénac), compte à ce jour 19 substances prioritaires, parmi lesquelles des antibiotiques (sulfaméthoxazole, triméthoprime, amoxicilline, ciprofloxacine), un antidépresseur (venlafaxine) et des antifongiques (clotrimazole, fluconazole et miconazole) (European Commission, 2020). L'objectif est de recueillir des informations sur ces substances afin d'établir le risque posé au niveau des écosystèmes aquatiques, et de mettre au point une norme environnementale européenne le cas échéant.

## II. Le diclofénac

### A. Généralités et mécanisme d'action

Le diclofénac (DCF) est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). Il s'agit d'un dérivé de l'acide phénylacétique (acide 2-[2,6-dichloranilino]phénylacétique) (Fig. I-6) du groupe des acides

arylcaboxyliques, qui a été introduit au Japon en 1974 sous forme de sel de sodium de diclofénac (Gan, 2010). Il existe également aujourd'hui sous forme de sel de diéthylamine ou d'épolamine selon les spécialités pharmaceutiques.



**DICLOFENAC**  
2-[2-(2,6-dichloroaniline)phenyl]acetic acid

Figure I-6 - Structure et nom systématique du diclofénac (Mulkiewicz et al., 2021)

Il est utilisé pour ses effets anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques, et est notamment indiqué dans la prise en charge des affections rhumatismales ainsi que dans le traitement symptomatique des douleurs. Il a pour mécanisme d'action l'inhibition des cyclooxygénases (COX) (Fig. I-7). L'inhibition de la COX-1 constitutive sera responsable de la plupart des effets secondaires liés à la prise du médicament, tandis que l'inhibition de la COX-2 inducible conduira à l'inhibition des prostaglandines (PG) pro-inflammatoires. En effet, la COX-1 est impliquée dans le fonctionnement des plaquettes, la régulation du flux sanguin rénal, ainsi que la cytoprotection de la muqueuse gastrique via la prostaglandine I2. La COX-2 quant à elle est impliquée dans la réponse aux dommages tissulaires et est responsable de la production des médiateurs de l'inflammation et de la douleur (prostaglandine, leukotriène, thromboxane).

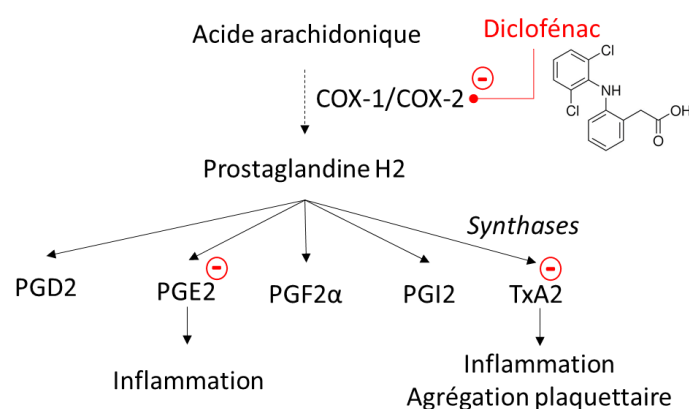


Figure I-7 - Mécanisme d'action établi du diclofénac. COX : cyclooxygénase, PG : prostaglandine, Tx : thromboxane.

## B. Consommation

En France, le DCF a été la 12<sup>ème</sup> molécule la plus vendue en ville en 2013, faisant partie des 30% de médicaments les plus consommés (ANSM, 2013). La consommation de DCF en santé humaine au niveau mondial varie entre 2 et 60 tonnes par an en fonction des pays, avec un total mondial d'environ 1453 t/an (données récoltées entre 2010 et 2013, Fig. I-8) (Acuña et al., 2015). Si l'on considère la consommation individuelle, la moyenne est de 0,33 g par personne et par an.

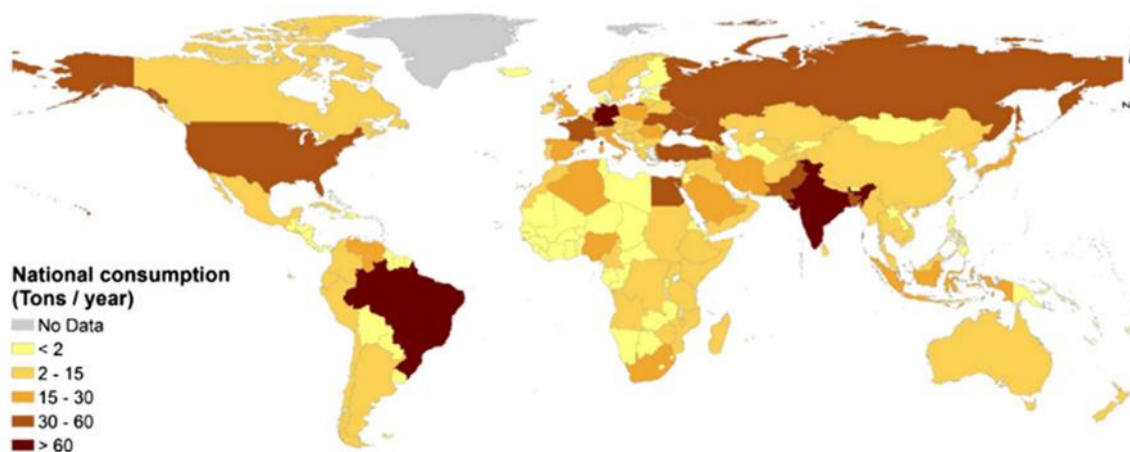


Figure I-8 - Carte de la consommation annuelle de diclofénac au niveau national (adapté de Acuña et al. (2015))

L'usage vétérinaire du DCF est controversé car il a été mis en cause dans le déclin des populations de vautour dans les années 90 en Asie du Sud (Oaks et al., 2004; Swan et al., 2006). Après ingestion de carcasses de bétail traité avec cette molécule, les vautours mouraient suite à des lésions rénales. Le DCF à usage vétérinaire n'est pas autorisé en France, cependant il l'est toujours en Europe. Un cas de mort d'un vautour moine intoxiqué au DCF a par ailleurs été récemment rapporté en Espagne montrant que l'utilisation vétérinaire du DCF (réautorisée en Espagne en 2013) reste une problématique actuelle (Herrero-Villar et al., 2021).

## C. Métabolisme

Les voies d'entrée du DCF dans le corps sont la voie cutanée ou la voie orale, selon la forme galénique utilisée. Par voie cutanée, environ 5% de la molécule va être absorbée et la fraction restant sur la peau sera rincée ou imprègnera les vêtements (Tieppo Francio et al., 2017; Vieno and Sillanpää, 2014). Par voie orale, 65-70% sera excrétée dans les urines et 20-30% dans les fèces (Davies and Anderson, 1997; Stierlin and Faigle, 1979). Seul 1% de la dose administrée sera éliminé sous forme de composé parent, le reste le sera sous forme de métabolites. Le DCF est métabolisé au niveau du foie, par glucuroconjugaison directe de la molécule parente, mais également par hydroxylation et méthylation (Fig. I-9). Les métabolites principaux sont le 4'-hydroxydiclofénac (4'OH-DCF) et le 5-hydroxydiclofénac (5OH-DCF), les composés hydroxylés pouvant ensuite subir un métabolisme de



phase II formant des conjugués à l'acide glucuronique, à la taurine, au glucuronide et au sulfate. Le 3'-hydroxydiclofénac (3'-OH-DCF) et le 4',5-dihydroxydiclofénac (4',5-diOH-DCF) sont également des métabolites majeurs, tandis que le 3'-hydroxy-4'-methoxydiclofénac et le 4'-hydroxy-3'-methoxydiclofénac sont excrétés à l'état de trace dans les urines (Faigle et al., 1988). Les métabolites formés chez l'homme présentent une activité pharmacologique moindre comparée au diclofénac (ANSES, 2019).

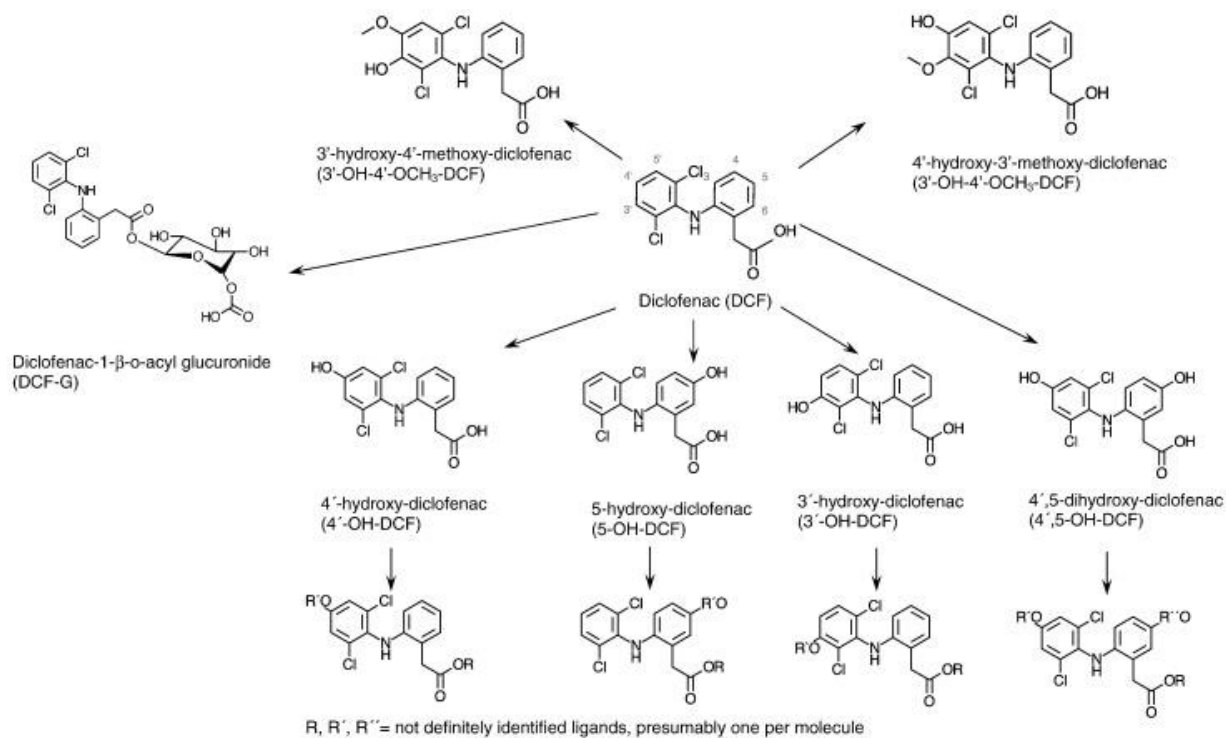


Figure I-9 - Métabolisme du diclofénac chez l'homme (Vieno and Sillanpää, 2014)

## D. Dégradation et occurrence dans l'environnement

### 1. Occurrence dans les eaux usées domestiques

Le DCF est un acide faible retrouvé sous forme anionique dans les milieux. Il présente une forte solubilité dans l'eau sous cette forme. Le  $\log D_{ow}$  de cette molécule est de 0,96 à pH 7 (Zhang et al., 2012). Il est fréquemment mis en évidence dans les eaux usées en France, avec une détection dans le cadre du projet Ampères dans 97% des eaux usées en entrée de STEP, dans des concentrations allant du centième de  $\mu\text{g/L}$  jusqu'à quelques  $\mu\text{g/L}$  (Soulier et al., 2011). Les concentrations retrouvées en France sont plutôt représentatives de ce qui a été observé au niveau mondial, les concentrations moyennes dans les eaux usées domestiques allant de 0,11 à 2,3  $\mu\text{g/L}$  (Vieno and Sillanpää, 2014). Les concentrations dans les eaux usées reflètent la consommation de DCF, et sont donc variables entre les pays et au sein même d'un pays.

## 2. Efficacité des traitements en STEP et concentrations dans les effluents de STEP

Le traitement primaire réalisé en STEP est inefficace sur cette molécule. Après le traitement secondaire, les concentrations détectées dans le cadre du projet Amperes sont similaires à celles en entrée de STEP, du dixième de  $\mu\text{g/L}$  à  $2 \mu\text{g/L}$  (Soulier et al., 2011). Les rendements des traitements secondaires pour l'élimination du DCF sont très variables (écart-type  $> 20\%$ ), mais présentent une moyenne d'efficacité inférieure à  $30\%$  (Soulier et al., 2011). Les traitements tertiaires offrent une meilleure efficacité, avec un rendement supérieur à  $30\%$  pour la décantation rapide et le lagunage de finition, et un rendement supérieur à  $70\%$  pour les traitements tertiaires avancés. Au niveau mondial, les efficacités de traitements sont similaires à celles communiquées dans le projet Amperes, avec des rendements d'élimination pouvant aller de  $0$  à  $80\%$ , mais se situant principalement entre  $21$  et  $40\%$ , selon les conditions opérationnelles des STEP (Zhang et al., 2008). Les effluents de STEP contiennent du DCF dans des concentrations moyennes entre  $0,002$  et  $2,5 \mu\text{g/L}$  (Vieno and Sillanpää, 2014).

Au niveau des STEP, les métabolites conjugués du DCF (glucuronide, sulfate) sont très probablement déconjugués par l'action des enzymes (comme la  $\beta$ -glucuronidase et la sulfatase), ou par des procédés abiotiques, pour redonner la molécule parente (Nguyen et al., 2021). La structure complexe du DCF, avec la présence de deux chlores (Fig. I-6), peut expliquer les difficultés de cette molécule à être dégradée par les procédés classiques car elle le rend moins sensible à l'oxydation. En laboratoire, les produits de transformation primaire du DCF formés par les traitements sont le DCF lactame, le 4'OH-DCF, le 5OH-DCF et l'acide benzoïque DCF (Jewell et al., 2016). Ces composés vont ensuite pouvoir réagir et être transformés en composés secondaires avec des réactions (i) d'hydroxylation sur les cycles aromatiques, (ii) d'amidation ou déamidation intramoléculaire, (iii) de conjugaison au sulfate sur les groupes hydroxyles phénoliques, (iv) de déchlorination réductive du cycle aromatique A, (v) d'ouverture de cycle oxydante du cycle B et (vi) d'oxydations par déshydrogénation des fragments phénoliques (Jewell et al., 2016). La majorité des produits de transformation secondaires issus de ces réactions sont rapidement dégradés. Lors d'une mesure des concentrations de DCF et de ses métabolites dans une STEP en Allemagne, la concentration en acide benzoïque de DCF dans l'effluent a été identifiée supérieure par rapport à celle de l'influent, mettant en évidence sa formation au cours de son passage. Trois produits de transformation secondaire y ont également été détectés (Jewell et al., 2016). D'autres métabolites du DCF ont été retrouvés dans des effluents de STEP, comme le 5OH-DCF en Norvège à une concentration de  $3,7 \text{ ng/L}$  (Langford and Thomas, 2011) ainsi que le 4'OH-DCF, le 5OH-DCF et le 4'OH-DCF lactame en Allemagne (Stülten et al., 2008). La présence des métabolites hydroxylés du DCF dans les effluents de STEP est plus probablement liée aux métabolites humains présents dans les influents qu'aux réactions de transformation des STEP.



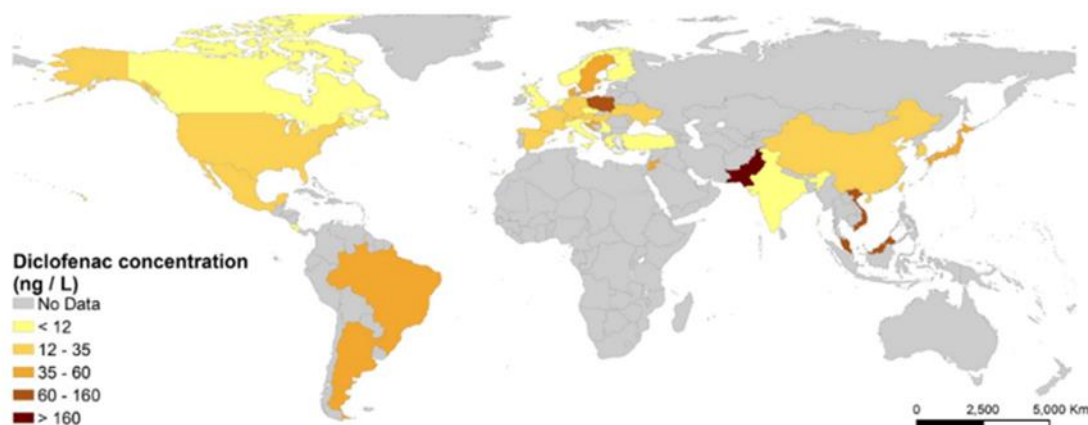


Figure I-10 - Carte mondiale de la concentration médiane de diclofénac dans les écosystèmes d'eau douce (adapté de Acuña et al. (2015)).

### 3. Occurrence dans les eaux de surface

Une fois les effluents rejetés dans les eaux de surface, la concentration médiane de DCF déterminée par Acuña et al. (2015) après analyse de 142 publications de 38 pays est de  $21 \pm 722$  ng/L (Fig. I-10). Les concentrations les plus importantes en DCF ont été signalées dans des rivières recevant directement des effluents de STEP (1,2 µg/L en Allemagne) (Ternes, 1998) ou des eaux usées industrielles et résidentielles non traitées (8,5 µg/L au Pakistan) (Scheurell et al., 2009). Les métabolites humains 3' et 4'OH-DCF y ont également été quantifiés, à 0,3 et 1,8 µg/L (Scheurell et al., 2009). Dans l'environnement, le DCF est non persistant car il est dégradé par biotransformation, notamment par photodégradation. Cependant, il est considéré comme « pseudo-persistant », considérant son rejet régulier dans l'environnement aquatique (Acuña et al., 2015).

## E. Bioaccumulation et effets du diclofénac chez les invertébrés aquatiques

### 1. Bioaccumulation

Pour évaluer le potentiel de bioaccumulation d'une substance, le facteur de bioconcentration (FBC) est classiquement utilisé. Ce dernier permet d'appréhender l'accumulation de la substance via l'eau, la respiration ou le contact direct. Il se définit comme le ratio entre la concentration en contaminant dans l'organisme sur la concentration en contaminant dissous dans l'eau. Selon le règlement Reach, une substance est considérée comme bioaccumulable à partir d'un FBC > 2000 (European Union, 2011). Le FBC du diclofénac a été déterminé expérimentalement chez différentes espèces d'invertébrés aquatiques, avec des valeurs maximales observées chez *Mytilus trossolus* de 118,5 (poids sec) au terme de 7 jours d'exposition à 68,22 µg/L, et de 180 (poids frais) après 8 jours d'exposition à 1 µg/L (Ericson et al., 2010; Świacka et al., 2021). Une relation inverse entre la concentration de DCF et le FBC a été notée dans les études réalisées à plusieurs concentrations d'exposition (Bonfille et al., 2017; Ericson et al., 2010; Nkoom et al., 2019). Ce type de relation

inverse a été signalé avec d'autres médicaments, comme par exemple la tétracycline, la roxithromycine ou le propranolol (Ding et al., 2016; Xie et al., 2019), et pourrait être en lien avec une activation métabolique aux concentrations plus élevées (Ziarrusta et al., 2017). Ces résultats indiquent que la concentration d'exposition est à prendre en compte lors de l'évaluation du potentiel de bioaccumulation d'une molécule pharmaceutique. Les FBC du DCF rapportés chez les invertébrés aquatiques ont été inclus dans le tableau I-1 et démontrent un faible potentiel de bioaccumulation du DCF chez ces différentes espèces.

Tableau I-1 - Facteurs de bioconcentrations (FBC) du diclofénac chez différentes espèces d'invertébrés aquatiques.

Espèce	Concentration d'exposition (µg/L)	Temps d'exposition	Facteur de bioconcentration	Source
<i>Mytilus trossolus</i>	1	8 jours	180 (poids frais)	Ericson et al. (2010)
	10000		10 (poids frais)	
	133,33	1 jour	21,73 (poids sec)	Świacka et al. (2019)
	5 jours	57,43 (poids sec)		
	68,22	7 jours	118,5 (poids sec)	Świacka et al. (2021)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	100	7 jours	16,5 (poids sec)	Bonnefille et al. (2017)
	600		11,3 (poids sec)	
<i>Dreissena polymorpha</i>	0,5 et 5	3 et 6 mois	4 à 13 (poids sec)	Daniele et al. (2016)
<i>Daphnia magna</i>	5	48 heures	70,94 (poids sec)	Nkoom et al. (2019)
	100		8,02 (poids sec)	
<i>Gammarus pulex</i>	200	24 heures	0,5 (poids frais)	Fu et al. (2020)
<i>Hyalella azteca</i>	200	24 heures	3,2 (poids frais)	Fu et al. (2020)

## 2. Survie et état général

Les effets du DCF chez les invertébrés aquatiques ont été investigués chez des organismes marins et d'eau douce. Des études de toxicité aiguë ont été conduites pour déterminer le potentiel impact du DCF sur la survie des organismes. La concentration létale 50 (CL50) après 24 heures d'exposition chez la daphnie (*D. magna*) a été évaluée à 82,3 mg/L, et après 21 jours à 2 mg/L (Du et al., 2016). La survie de *D. magna* après 48h d'exposition a été affectée à partir d'une concentration de 75 mg/L (Lee et al., 2011). Chez le crustacé d'eau douce *Atyaephyra desmarestii* la CL50 à 96h est de 6,3 mg/L (Nieto et al., 2013), tandis que la CL50 à 24h a été évaluée à 216 mg/L chez *H. azteca*, et à 175 mg/L chez le gammare (*G. pulex*) (Fu et al., 2020). Le métabolite méthyl ester diclofénac a quant à lui montré une toxicité plus importante chez *H. azteca* avec une CL50 à 24h de 0,53 mg/L. Des tests d'immobilisation de 48h ont également été réalisés, évaluant la concentration efficace médiane (CE50) du DCF entre 68 et 80,28 mg/L chez *D. magna* et à plus de 100 mg/L chez le crustacé *Artemia salina* (Cleuvers, 2004; Haap et al., 2008; Minguez et al., 2016). Ces études, réalisées pour la plupart sur du court terme, montrent un potentiel d'impact sur la survie des individus dans des concentrations

fortement supérieures aux concentrations environnementales. Ce constat est nuancé par l'observation de l'augmentation des taux de mortalité chez la moule zébrée (*D. polymorpha*) entre 2 et 5 mois d'exposition à des concentrations de 0,041, 0,44 et 3,82 µg/L (Joachim et al., 2021).

### 3. Cyto- et génotoxicité

De nombreuses études se sont intéressées au potentiel de cyto- et de génotoxicité du DCF sur les cellules de mollusques aquatiques, majoritairement les hémocytes (Świacka et al., 2020a). Le principal marqueur étudié est la stabilité de la membrane lysosomale (LMS), qui est un biomarqueur de pollution chimique largement utilisé. Une diminution de la LMS peut entraîner de l'endocytose, l'excrétion d'enzymes hydrolytiques dans le cytosol et peut altérer les fonctions immunitaires des cellules chez les mollusques (Martínez-Gómez et al., 2015). Les dommages à l'ADN observés sont généralement considérés comme la conséquence d'un stress oxydant. Sur les hémocytes de la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*), une mort cellulaire supérieure à 50% a été observée avec le DCF à des concentrations supérieures à 1 µg/L. Par ailleurs, des atteintes de l'ADN ont aussi été notées avec une concentration de DCF de 10 ng/L, montrant le potentiel de cytotoxicité de cette molécule (Parolini et al., 2009). Sur des cellules de moule zébrée (*D. polymorpha*), le DCF induit une diminution de la LMS et des atteintes irréversibles de l'ADN (Parolini et al., 2009, 2011a). Des concentrations allant de 0,001 à 10 mg/L ont été testées sur des cultures primaires de branchies et de glande digestive de *D. polymorpha*, induisant une légère réduction de l'activité mitochondriale et une réduction de la viabilité (Parolini et al., 2011b).

La LMS des hémocytes a été évaluée chez la moule non seulement sur culture cellulaire, mais aussi après exposition des organismes. Une légère diminution de la LMS d'hémocytes de dreissènes exposées 96h a été observée à des concentrations allant de 95 à 637 ng/L (Parolini et al., 2011a). De même la LMS a été diminuée chez la moule brune *Perna perna* exposée 48 et 96h à des concentrations allant de 20 à 2000 ng/L (Fontes et al., 2018). La fonction des hémocytes dans la réponse immunitaire a été plus particulièrement étudiée par Boisseaux et al. (2017) suite à une exposition plus longue de 3 jours chez le gastéropode *Lymnaea stagnalis*. Une augmentation de l'immunocapacité (augmentation de la densité hémocytaire) après une exposition à des concentrations allant de 10 à 1000 µg/L, et de l'immunoefficacité (augmentation de la capacité phagocytaire et de l'activité NADPH oxydase) à 100 µg/L ont été observées, ces effets étant caractéristiques d'une réponse inflammatoire. Une modification des réponses immunitaires des hémocytes de *D. polymorpha* exposée chroniquement à 0,041 jusque 3,82 µg/L a été observée au bout de 63 jours, avec des cassures des brins d'ADN au cours de l'expérimentation de 6 mois (Joachim et al., 2021).

## 4. Expression des gènes et troubles du métabolisme

Les données de la littérature suggèrent que les effets toxiques du DCF chez les invertébrés aquatiques sont principalement dus à l'induction d'un stress oxydant et de mécanismes de détoxification évalués avec des modifications de l'expression des gènes et de l'activité d'enzymes spécifiques (Świacka et al., 2020a). Chez la moule méditerranéenne, une exposition de 15 jours à 250 ng/L a mis en évidence un stress oxydant. En effet, ce traitement a induit une augmentation significative des activités de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion réductase (GR) dans les branchies, associé à une hausse de l'activité de la catalase (CAT) et des niveaux de peroxydation lipidique (LPO) dans la glande digestive (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2014). Une activité acétylcholine estérase (AChE) accrue, indicatrice de neurotoxicité, et des niveaux de protéine vitellogenin-like plus élevés, indiquant une altération de l'activité estrogénique, ont été observés chez les femelles. L'activité AChE est également induite chez *Radix balthica* après 72h d'exposition, avec une augmentation plus prononcée à la concentration de 3 µg/L, confirmant une potentielle neurotoxicité du DCF (Morozov et al., 2021).

Chez *D. magna* exposée pendant 48h à 9,7 mg/L, une augmentation de la LPO et de l'activité de la glutathion peroxydase a été observée, appuyant l'existence d'un stress oxydant, bien que l'activité de la SOD soit diminuée (Gómez-Oliván et al., 2014). Le DCF diminue les niveaux de SOD2 mitochondriale, impliquée dans l'équilibre des espèces réactives de l'oxygène, chez le crustacé d'eau douce *Bryocamptus pygmaeus* après 72h à 50 µg/L (Di Cicco et al., 2021). Après exposition du mollusque bivalve *Ruditapes philippinarum* pendant 14 jours à 15 µg/L de DCF suivi de 7 jours de dépuración, un effet sur les activités d'enzymes antioxydantes et détoxifiantes a été observé. Durant la première semaine d'exposition, une augmentation des activités CAT, GR, GST, AChE et des niveaux de LPO et métallothionéine (MT) a été notée dans la glande digestive, tandis qu'aucun impact significatif n'a été identifié dans les branchies (Trombini et al., 2019). Après 22 jours, c'est une diminution des niveaux de LPO et MT, ainsi que de l'activité GST qui a été observée dans la glande digestive. L'activité GST est également diminuée chez des moules exposées à 1 et 1000 µg/L pendant 14 jours (Schmidt et al., 2014). Dans cette dernière étude, une approche protéomique a été réalisée par Schmidt et al, révélant une réponse au stress, un stress oxydant et un repliement des protéines (28 jours, 1 et 1000 µg/L) (Schmidt et al., 2014). Le DCF a diminué l'activité de la LPO mais a augmenté l'activité de la GST chez la moule commune (*Mytilus spp.*) 24 h après injection à 1 et 1000 µg/L (Schmidt et al., 2011). Après injection à 1000 µg/L, le DCF a augmenté l'activité LPO et GST ainsi que les niveaux de MT chez la moule zébrée (Quinn et al., 2011). De même, l'activité GST est augmentée chez le polychète marin *Hediste diversicolor* exposé à 1 et 2 µg/L pendant 28 jours. Aucune différence des activités CAT et AChE n'a été observée, suggérant un stress oxydant plus modéré (Nunes et al., 2020). D'autres modifications de paramètres impliqués dans les activités antioxydantes des

organismes ont été observées chez plusieurs espèces de bivalves marins, exposés à 1 µg/L pendant 7 ou 28 jours (Costa et al., 2020; Freitas et al., 2019). Ces études réalisées chez différentes espèces, impliquant des marqueurs tels que l'activité SOD, CAT, GR, GST, ou les niveaux de SOD, LPO et MT, sont révélateurs de l'induction d'un stress oxydant par le DCF, avec des différences de sensibilité en fonction des espèces.

En plus de l'induction d'un stress oxydant, des modifications du métabolisme liées au mécanisme d'action spécifique du DCF ont été identifiées chez des invertébrés aquatiques. Chez *P. perna*, le DCF a diminué l'activité de la cyclooxygénase (COX) dans des concentrations de l'ordre du ng/L (Fontes et al., 2018). Les niveaux de prostaglandines, produites par la COX, ont été diminués par le DCF chez la moule méditerranéenne ainsi que chez *H. azteca* (Courant et al., 2018; Fu et al., 2021).

Au niveau du métabolisme, le DCF impacte également chez *H. azteca* la voie de la carnitine, impliquée dans le transport des acides gras, ainsi que les métabolismes de la tyrosine, du tryptophane et des hormones stéroïdes chez *M. galloprovincialis* (Bonafille et al., 2018; Fu et al., 2021). Il a été montré que chez *M. galloprovincialis* exposée 60 jours à 2,5 µg/L de DCF, le métabolisme des lipides était modulé en association à une altération de paramètres immunologiques, à une génotoxicité ainsi qu'à des modifications du renouvellement cellulaire.

#### 5. Reproduction et tératogénicité

La reproduction est un paramètre majeur pour la survie des espèces et le DCF a montré des capacités de modulation des prostaglandines et de la protéine vitellogenin-like, impliquées dans la reproduction des invertébrés (Jubeaux et al., 2012; Osada and Nomura, 1990; Stanley-Samuelson, 1994). La reproduction et les effets tératogènes du DCF ont été des paramètres particulièrement étudiés chez les organismes aquatiques. Chez la daphnie, des études chroniques de 21 jours réalisées à des concentrations de l'ordre du mg/L ont montré une réduction de la production d'œufs (Du et al., 2016; Lee et al., 2011), et un retard de première production d'œufs (Liu et al., 2017). Au contraire, dans un test similaire avec des concentrations allant jusqu'à 100 mg/L, le DCF n'a pas impacté la reproduction de la daphnie en 21 jours (Oliveira et al., 2016). Une étude multigénérationnelle a montré un délai dans l'âge de la première reproduction chez la daphnie dans les générations F0 et F2, ainsi qu'une augmentation de la taille des nouveau-nés des générations F1 et F5 après exposition à 0,36 µg/L (Dietrich et al., 2010). Chez *Moina macrocopa* exposée 7 jours au DCF dans des concentrations de l'ordre du mg/L, une croissance de la population en 7 jours inversement proportionnelle aux concentration de DCF étudiées a été observée, ainsi qu'une diminution de la reproduction (Lee et al., 2011; Sarma et al., 2014). Mohd Zanuri et al. (2017) se sont intéressés à la qualité du sperme de 3 invertébrés marins (*Asterias rubens*, *Psammechinus miliaris*, *Arenicola marina*) après exposition au

DCF, montrant une diminution de la vitesse de nage des spermatozoïdes et une réduction du succès de fécondation (concentrations supérieures à 0,1 µg/L). Chez *P. perna*, le taux de fécondation et le développement embryo-larvaire sont affectés par une exposition aiguë au DCF dans des concentrations de l'ordre du mg/L (Fontes et al., 2018). Un développement larvaire anormal est induit chez *R. philippinarum* exposé à 0,5 µg/L de DCF seul ou combiné avec l'acidification de l'eau (Munari et al., 2016). Une atteinte de la croissance est montrée par Du et al. (2016) chez la daphnie, avec un nombre de carapaces par adulte décroissant avec les concentrations de DCF croissantes (0,5 à 40,5 mg/L).

### 6. Respiration

La réponse respiratoire d'un organisme est un indice de stress en réponse à un polluant qui est régulièrement utilisé chez les organismes aquatiques (Dzialowski et al., 2006; Handy and Depledge, 1999; Lebrun et al., 2020). Une modification de ce paramètre est généralement interprétée comme un ajustement physiologique dans le but de maintenir l'équilibre des activités métaboliques. Des fréquences respiratoires plus faibles ont été observées chez le crustacé d'eau douce *Atyaephyra desmarestii* dans des conditions hypoxiques associées à une concentration de DCF dans le milieu de 13,3 µg/L (Nieto et al., 2016, 2013). Une exposition de 4 à 8 semaines du gammare à des concentrations de DCF allant jusqu'à 1 mg/L n'a pas démontré d'effet sur la respiration (Oskarsson et al., 2012). Chez *R. balthica*, le DCF diminue la consommation d'oxygène à des concentrations de 0,004 à 4 µg/L en 72h, de manière concentration-dépendante (Morozov et al., 2021). Cette observation est associée à une volonté des gastéropodes de passer de la respiration cutanée à la respiration pulmonaire à partir d'une concentration de 0,9 µg/L.

### 7. Comportement

Les effets du DCF sur le comportement ont été peu étudiés chez les invertébrés aquatiques. Nkoom et al. (2019) ont observé une diminution des taux de filtration et d'ingestion chez la daphnie après exposition au DCF pendant 48h à 5 et 100 µg/L. Une récente étude s'est intéressée aux effets du DCF sur la locomotion, montrant une réduction de la vitesse de nage, de l'activité de nage, de la faculté d'exploration et du thigmotactisme, avec une augmentation de la tortuosité du parcours de nage chez le crustacé *B. pygmaeus* exposé 72h à 50 µg/L (Di Cicco et al., 2021).

### 8. Autres effets

Une étude histologique a été réalisée chez *M. trossolus* exposée à des concentrations allant de 4 à 40 µg/L de DCF pendant 12 jours (et 13 jours de dépuración). Cette étude a mis en évidence une

déformation des branchies et des gonades, une atrophie et une vacuolisation de la glande digestive et une accumulation de pigments marrons ainsi qu'une nécrose, avec un effet concentration-dépendant (Świacka et al., 2020b). L'osmorégulation a également été investiguée, et n'a pas été affectée par le DCF chez *A. desmarestii*, tandis qu'elle l'a été chez le crabe *Carcinus maenas* exposé 7 jours à 10 et 100 ng/L (Eades and Waring, 2010; Nieto et al., 2016, 2013).

### 9. Conclusions

Les différents paramètres investigués chez les invertébrés aquatiques l'ont été en majorité après une exposition au DCF dans des concentrations largement supérieures aux concentrations environnementales, et bien souvent de l'ordre du mg/L. Ceci peut être expliqué par la complexité et le temps nécessaire pour conduire une exposition chronique, ce qui est d'autant plus vrai pour les études multigénérationnelles. Cependant, certaines études ont été conduites de manière chronique et avec des concentrations pouvant être considérées comme environnementales (< 10 µg/L), mettant en évidence un impact subléthal du DCF sur les organismes aquatiques, surtout marins mais aussi d'eau douce (Eades and Waring, 2010; Gonzalez-Rey and Bebianno, 2014; Joachim et al., 2021; Morozov et al., 2021; Nkoom et al., 2019; Nunes et al., 2020; Toufexi et al., 2016). Les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets physiologiques observés sont aujourd'hui peu compris, et des études regroupant plusieurs niveaux « omiques » peuvent être pertinentes pour améliorer notre compréhension des effets sous-jacents. On peut noter que peu d'études ont choisi des mollusques d'eau douce comme organismes modèles, bien qu'ils soient largement présents dans les environnements benthiques.

Le DCF a été inclus sur la liste de vigilance européenne de substances à surveiller dans les milieux aquatiques en 2015, dans le but de recueillir des informations sur ses effets sur l'environnement (European Commission, 2015). Il en a été retiré en 2018, la Commission Européenne estimant que suffisamment de données étaient disponibles pour réaliser l'évaluation du risque posé par cette substance. Leverett et al. (2021) ont exposé que, dans une version préliminaire, la Commission Européenne a suggéré une Norme de Qualité Environnementale (NQE) de 0,04 µg/L pour le DCF dans les eaux de surface, correspondant à un niveau d'effet de 10% estimé à 0,22 µg/L chez l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) dans une étude en mésocosme (Joachim et al., 2021), divisé par un facteur de pondération de 5. Cette NQE n'a pas encore été officiellement publiée, et a été critiquée étant donné l'unique étude prise en compte pour sa détermination (Leverett et al., 2021).



### III. Utilisation d'approches innovantes en écotoxicologie : les omiques

#### A. Généralités

Le but des études écotoxicologiques est de comprendre et de prédire les effets d'un contaminant sur l'environnement (Straalen, 2003). Les études de toxicité aiguë n'étant pas suffisantes pour caractériser l'impact d'un polluant sur les organismes, de nouvelles approches ont été développées, utilisant des bioindicateurs et des biomarqueurs (Clements and Rohr, 2009; Moore et al., 2004). En effet, les impacts apparaissent généralement précocement au niveau moléculaire, avant d'être observables au niveau de l'individu. Les approches transcriptomiques, protéomiques et métabolomiques représentent par conséquent des méthodes d'intérêt pour répondre aux problématiques soulevées en écotoxicologie. La « toxicogénomique » a été décrite comme la combinaison de ces méthodes dans le but d'identifier le lien de cause à effet entre l'exposition d'un organisme à un agent chimique ou physique et l'altération de l'expression des gènes, des protéines ou des métabolites (Prat and Degli-Esposti, 2019). Elle a également pour but d'identifier des biomarqueurs d'exposition ainsi que de comprendre la relation entre les mécanismes moléculaires altérés et les modifications physiologiques observées (Fig. I-11). L'utilisation des omiques appliqués à l'écotoxicologie a donné lieu à la naissance du terme « écotoxicogénomique » (Snape et al., 2004). Il s'agit de l'application de la toxicogénomique à des organismes représentatifs des écosystèmes dans le but d'étudier les effets des contaminants à l'échelle de l'individu mais aussi de leur écosystème.

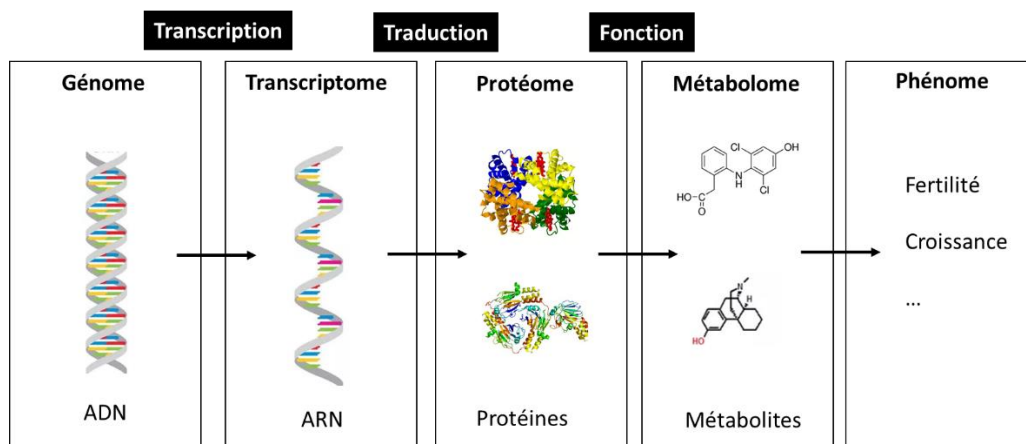


Figure I-11 - Les différents niveaux omiques.

Les progrès réalisés en séquençage et en spectrométrie de masse ont largement contribué à la popularisation de ces méthodes. En effet, la connaissance du génome est un prérequis pour les études omiques. Peu de génomes d'espèces utilisées en écotoxicologie sont séquencés, cependant l'arrivée au début des années 2000 des séquenceurs à haut débit (comme 454, Illumina ou PACBIO RS) permet aujourd'hui de séquencer un génome avec des coûts raisonnables (Gonzalez and Pierron, 2015). Par exemple, le génome de *D. magna*, une espèce clé en écotoxicologie, a été séquencé en 2010 et est disponible publiquement (<http://wfleabase.org/>). D'autres génomes d'intérêt en écotoxicologie,



comme celui de *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Lymnaea stagnalis* ou *Mytilus galloprovincialis* sont disponibles sur la base de données du génome NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) ou sur EnsemblMetazoa (<https://metazoa.ensembl.org/>). Cependant une large partie du génome n'est pas annotée chez ces espèces et certaines protéines restent hypothétiques ou inconnues (Gonzalez and Pierron, 2015).

### B. Transcriptomique

La transcriptomique est l'étude de l'expression des gènes dans son ensemble, c'est-à-dire du profil des ARN messagers (ARNm). Il s'agit de la méthode la plus ancienne, et par conséquent la plus utilisée car moins coûteuse et plus standardisée (Prat and Degli-Esposti, 2019). La première technique de biologie moléculaire a été la qPCR (réaction de polymérase en chaîne quantitative), qui est une approche ciblée. Les puces à ADN ont également permis d'explorer le profil d'expression des gènes, avec des plateformes disponibles pour *D. magna* ou *D. rerio* par exemple (Wang et al., 2008; Watanabe et al., 2007). Le séquençage ARN (RNA-Seq) a ouvert la voie à l'obtention de données transcriptomiques pour n'importe quel organisme d'intérêt, avec une approche sans *a priori*. Le RNA-Seq et les puces à ADN permettent d'identifier les expressions géniques de milliers de gènes pour un échantillon (Prat and Degli-Esposti, 2019).

L'épigénétique constitue un domaine d'investigation d'intérêt croissant. Les modifications épigénétiques permettent la régulation de l'expression des gènes, sans modification de la séquence d'ADN. Le premier mécanisme qui a été étudié a été la méthylation de l'ADN, qui conduit à la condensation du brin d'ADN et donc à une diminution de la transcription (Vandeghechuchte and Janssen, 2011). Les microARNs, piARNs (ARNs interagissant avec Piwi) et siARNs (petits ARNs interférents) sont des mécanismes épigénétiques permettant la régulation post-transcriptionnelle avec éventuellement une transmission à la descendance par les cellules germinales. Ces mécanismes présentent donc un intérêt dans l'évaluation de l'effet d'un toxique sur les organismes présents dans l'environnement.

### C. Protéomique

La protéomique désigne la connaissance du protéome, soit de toutes les protéines présentes dans une cellule, un organe ou un organisme entier. Elle a été utilisée de manière croissante depuis 2006. La première méthode appliquée en protéomique est la combinaison de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide couplée à un spectromètre de masse MALDI-TOF. Il s'agit d'une méthode efficace pour identifier les protéines, cependant elle l'est moins pour assigner les peptides des espèces eucaryotes complexes (Armengaud et al., 2014). Les avancées en spectrométrie de masse ont permis d'améliorer la sensibilité de détection des peptides. La combinaison du RNA-Seq et de la protéomique

*shotgun* a donné naissance à la protéogénomique, qui peut s'appliquer sur des organismes dont le génome n'a pas été séquencé (Armengaud et al., 2014). De plus, la protéomique permet l'étude des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, qui apportent des informations fonctionnelles sur le rôle de la protéine (Nørregaard Jensen, 2004).

### D. Métabolomique

La métabolomique est l'approche la plus récente. Elle désigne l'analyse de tous les métabolites présents dans une cellule, un organe ou dans l'organisme entier (Prat and Degli-Esposti, 2019). Cette approche peut être ciblée ou non, et présente l'avantage de ne pas nécessiter le génome des organismes. Elle est par conséquent directement applicable sur de multiples espèces (Bahamonde et al., 2016). Les méthodes analytiques préférées pour l'identification des molécules sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS). La RMN a été très utilisée pour sa reproductibilité élevée, cependant elle présente une faible sensibilité, avec la nécessité de la présence des molécules dans des concentrations de l'ordre du mM. La MS est une méthode permettant de réaliser des analyses à haut débit, avec une sensibilité élevée. Elle permet l'analyse de toutes les molécules ionisables dans un échantillon, en se basant sur un ratio masse sur charge ( $m/z$ ) (Kim and Kang, 2021). Elle est couplée avec de la chromatographie en phase liquide (LC), de la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou l'électrophorèse capillaire (EC), selon les propriétés des molécules à étudier. La LC va séparer les composés non volatils selon leur polarité ; la GC selon leurs points d'ébullition et l'EC selon la mobilité des ions formés. Pour obtenir une vision plus large du métabolisme d'un organisme, certaines études combinent plusieurs méthodes analytiques (Geier et al., 2011; Tufi et al., 2015a). La fluxomique désigne l'étude des flux métaboliques dans l'organisme et ajoute une notion dynamique à la métabolomique.

### E. Utilisation en écotoxicologie et enjeux

La transcriptomique a été identifiée comme la méthode omique la plus appliquée en écotoxicologie ou en écologie (43%), suivie par la protéomique (30%), la métabolomique (13%) puis les méthodes multiomiques (13%) (Ebner, 2021). Cependant, si la transcriptomique reste constamment utilisée au cours des années, l'usage de la protéomique a été majoritaire de 2017 à 2019 (Fig. I-12). Par ailleurs, la combinaison de plusieurs méthodes omiques a représenté la plus grande part de la littérature en 2020. Les progrès de la bioinformatique et des statistiques appliqués à la biologie ont été corrélés avec l'application de ces méthodes, qui génèrent un grand nombre de données et nécessitent des méthodes poussées pour les analyser (Prat and Degli-Esposti, 2019). Les espèces les plus populaires pour l'application des méthodes omiques en écotoxicologie ou en écologie du stress

ont été *Danio rerio*, *Daphnia magna*, *Mytilus edulis*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas* et *Oncorhynchus mykiss* (Ebner, 2021).

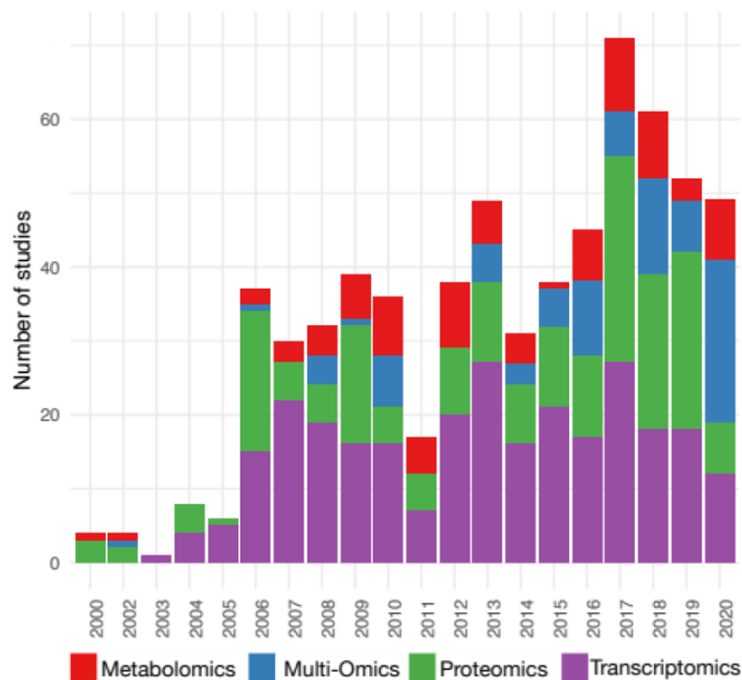


Figure I-12- Etudes d'écotoxicologie et de stress écologique entre 2000 et 2020 qui ont utilisé une ou plusieurs méthode omiques pour investiguer les changements moléculaires après l'exposition à un stresser environnemental ou chimique (Ebner, 2021).

L'utilisation de ces méthodes, seules ou combinées, nous permet d'appréhender la complexité des réponses à un contaminant chez les organismes exposés (Gonzalez and Pierron, 2015). En effet, une exposition à des concentrations faibles va plus probablement entrainer une réponse adaptative et des effets sublétaux, pour lesquels les informations recueillies au niveau moléculaire représentent des marqueurs précoces. De plus, ces approches nous permettent d'améliorer notre compréhension des mécanismes de réponse associés aux changements physiologiques provoqués par les contaminants environnementaux. Il est cependant important de garder en tête que ces méthodes ne donnent une vision au niveau moléculaire qu'à un instant t, et que les réponses à un contaminant varient au cours du temps, rendant pertinentes des études réalisées avec plusieurs durées d'exposition (Gonzalez and Pierron, 2015; Piña and Barata, 2011). L'utilisation croissante de ces techniques permet d'obtenir des informations sur le profil transcriptomique, protéomique et métabolomique des espèces étudiées, en conditions physiologiques et en réponse à un stress environnemental. Ces progrès, identifiant les mécanismes d'action des contaminants chez les espèces non-cibles, permettront dans le futur de faciliter l'évaluation du risque environnemental posé par un produit inconnu (Pfaff et al., 2021). Les études multiomiques présentent parfois une difficulté au niveau de l'intégration des données observées en transcriptomique, protéomique et métabolomique car les expressions des gènes, des protéines et des métabolites ne sont pas synchronisées dans le temps (Nikinmaa and Rytönen, 2011).

#### IV. *Lymnaea stagnalis*

##### A. Généralités

Notre organisme d'étude est *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), aussi appelé la grande limnée ou limnée des étangs. Il s'agit d'un gastéropode d'eau douce, qui appartient au phylum Mollusca, à la classe Gastropoda, à la sous-classe Heterobranchia, au super-ordre Hygrophyta et à la famille Lymnaeidae (Amorim et al., 2019). Cette espèce est largement répandue avec une présence en Asie, en Amérique du Nord, en Nouvelle-Zélande et en Europe (Fig. I-13) (Fodor et al., 2020). Il s'agit d'une espèce benthique et pélagique. Les limnées colonisent les milieux d'eau stagnante ou peu profonde avec un faible courant, et se nourrissent principalement de plantes, bien qu'elles soient omnivores et puissent adapter leur régime alimentaire en fonction des ressources disponibles (Lance et al., 2006). Elles peuvent consommer des microalgues, du périphyton, des bactéries, du mycélium et aussi de petits invertébrés morts. Elles ont pour prédateurs certaines espèces de poissons, les écrevisses, les amphibiens, certains mammifères et oiseaux. Ce gastéropode joue par conséquent un rôle important dans le transfert d'énergie et de matière au sein de la chaîne trophique (Tallarico, 2016).

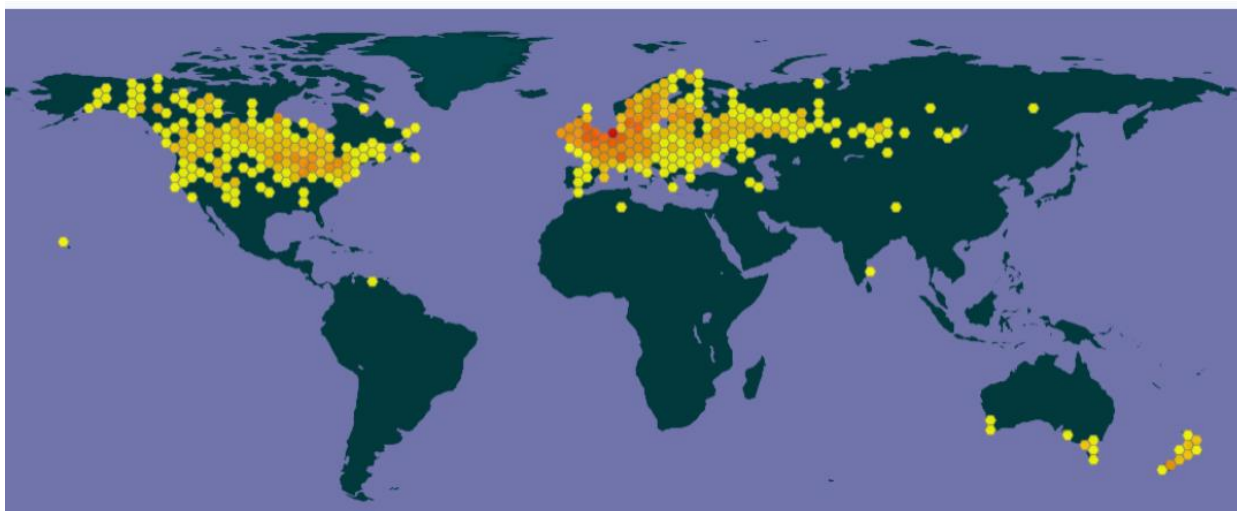


Figure I-13 - Répartition géographique de *L. stagnalis*. Les endroits où cette espèce a été identifiée sont représentés avec des hexagones, qui sont jaunes lorsque la densité est faible et rouges lorsque la densité est élevée (GBIF Secretariat, 2021).

##### B. Physiologie

###### 1. Morphologie et cycle de vie

La coquille de *L. stagnalis* est dextre, avec une morphologie et une couleur variable (Fig. I-14A). De manière unique, cet espèce présente environ 2% d'individus signalés avec une coquille sénestre (Kuroda et al., 2009). La coquille peut être de couleur jaune clair jusque marron foncé, ces variations étant liées à l'environnement plutôt qu'à la génétique (Vinarski, 2014). La longueur de la coquille chez l'adulte est en moyenne de 40 à 47 mm.

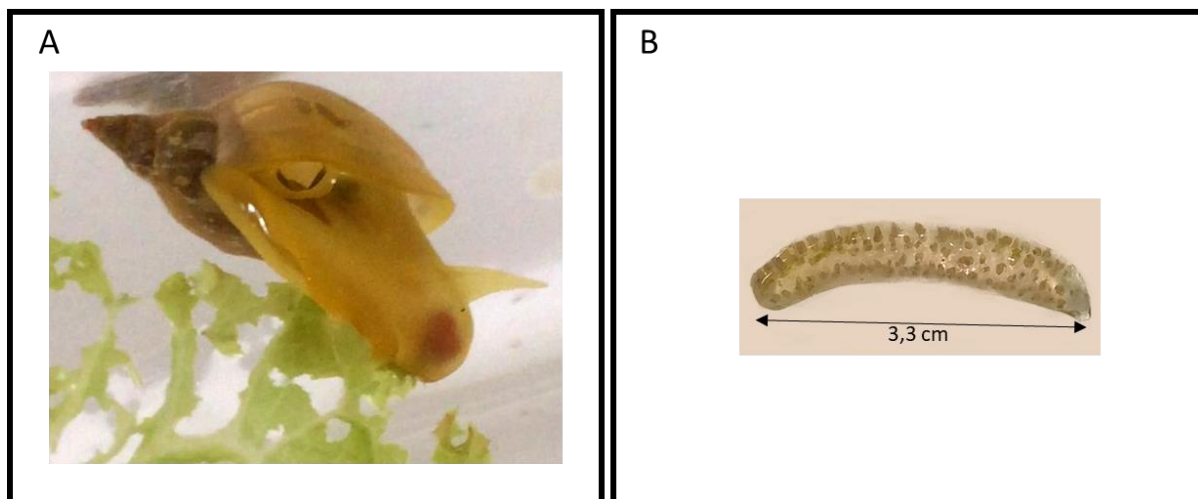


Figure I-14 – A) *L. stagnalis* mangeant de la salade et B) Ponte de *L. stagnalis* (photographies personnelles)

Dans l'environnement naturel, *L. stagnalis* vit au moins un an mais peut avoir une durée de vie de 2 à 5 ans (Meshcheryakov, 1990). Pendant la saison chaude, la grande limnée respire à la surface via son orifice respiratoire, appelé le pneumostome, en utilisant ses poumons. Elle est également capable de remplir ses poumons d'eau et d'en absorber l'oxygène dissous. Pendant l'hiver, la respiration cutanée est préférée (Meshcheryakov, 1990). Elle peut servir d'hôte intermédiaire pour plusieurs douves, parmi lesquelles *Fasciola hepatica* (la grande douve du foie), connue pour être un parasite humain. La grande limnée est un organisme ovipare, hermaphrodite simultané et itéropare. Elle est capable de réaliser de l'auto-fertilisation mais préfère la fécondation croisée. Dans l'environnement naturel, elle se reproduit principalement du printemps à la fin de l'hiver, bien qu'elle soit active toute l'année (Nakadera et al., 2015). Elle n'a pas de rythme circadien défini, mais possède un comportement semblable au sommeil et pond les œufs plutôt le jour (Stephenson and Lewis, 2011; Ter Maat et al., 2012). Les pontes sont proportionnelles à la taille des individus et comptent de 20 à 160 œufs, dans une enveloppe gélatineuse transparente de 2 à 5 cm de long (Fig. I-14B) (Amorim et al., 2019). Il est donc possible de suivre le développement embryonnaire en détail avant l'éclosion, qui a lieu à partir de 11-12 jours en moyenne (Fodor et al., 2020). Le temps précédant l'obtention d'adultes matures dépend de la température, de l'alimentation et de la disponibilité des partenaires, et sera de 3 à 4 mois au laboratoire (Fig. I-15).

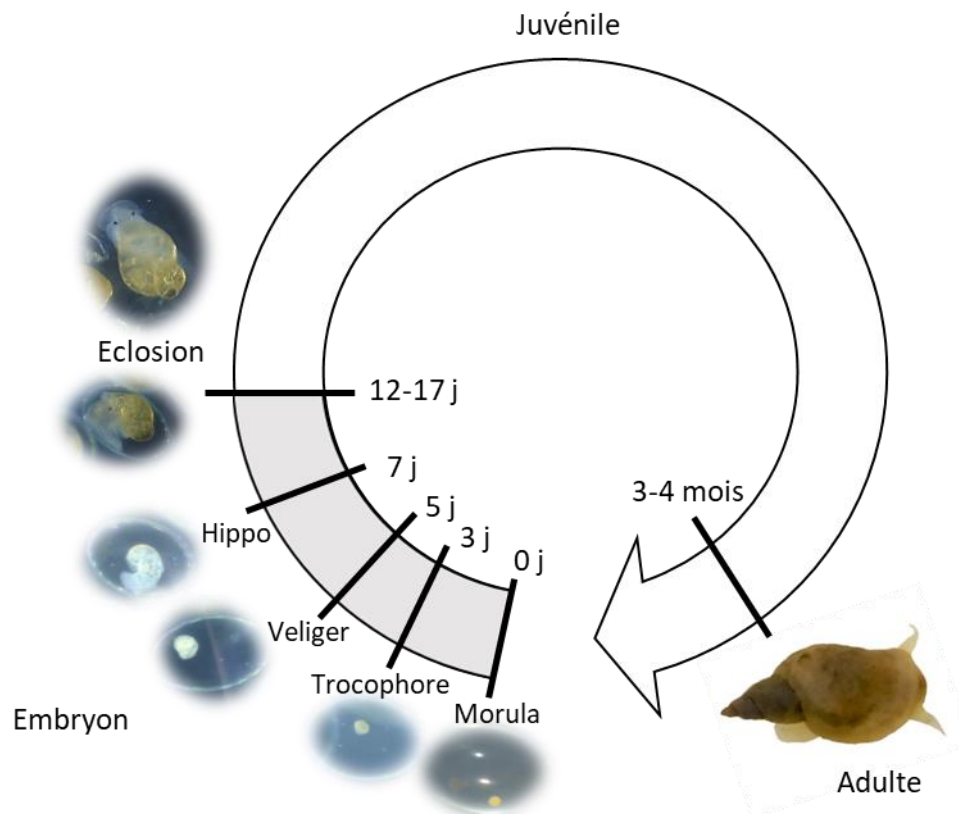


Figure I-15 - Cycle de vie de *L. stagnalis* en conditions de laboratoire (21°C, 16h jour, 8h nuit).

*L. stagnalis* est un modèle relativement facile à élever en laboratoire. Il est généralement nourri avec de la salade ou de la nourriture pour poissons. Les individus élevés en laboratoire présentent une taille inférieure à ceux retrouvés dans la nature, et par conséquent des tailles de ponte plus faibles (Kuroda and Abe, 2020). En effet, la taille des individus est négativement corrélée à la température (règle température-taille), qui est plus élevée et homogène en laboratoire (20-22°C) que sur le terrain (Atkinson, 1994). La photopériode appliquée peut être variable, mais va maximiser la reproduction lorsqu'elle est de 16 h de jour et 8 h de nuit (Bohlken and Joosse, 1981).

## 2. Reproduction

*L. stagnalis* est un organisme protandre, c'est-à-dire que la maturité des organes sexuels mâles précède la maturité sexuelle femelle. Son appareil reproducteur est composé de trois parties : i) l'ovotestis (ou glande hermaphrodite) ; ii) la partie femelle et iii) la partie mâle de l'appareil reproducteur (Plesch et al., 1970). Les organes sexuels femelles sont constitués de l'oviducte, la glande albumen, la glande oothéciale et la glande mucipare, tandis que les organes sexuels mâles sont composés de la prostate, du canal déférent et du complexe pénien (Fig. I-16). Ce gastéropode peut avoir le rôle de mâle ou de femelle lors de la reproduction, avec un seul rôle à la fois (qu'il peut échanger ensuite). Lors de la saison de reproduction, il peut recevoir du sperme à plusieurs reprises (allosperme) et le stocker jusqu'à deux mois, afin d'utiliser le sperme de différents partenaires

(Nakadera et al., 2015). Le comportement sexuel mâle étant un comportement énergétiquement coûteux, il répond à des stratégies spécifiques (Dewsbury, 1982). Il est accru après quelques jours d'isolement, la motivation sexuelle mâle étant liée à la quantité de liquide séminal dans la prostate. Il est également médié par l'effet Coolidge, c'est-à-dire qu'il y a une motivation sexuelle plus importante lors de la rencontre d'un nouveau partenaire (Koene and Ter Maat, 2007). On observe par conséquent une copulation plus importante dans les groupes comportant un plus grand nombre d'individus.

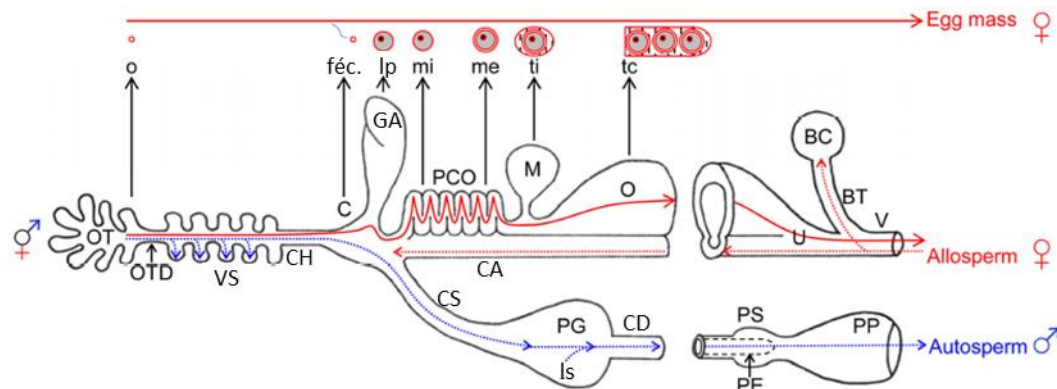


Figure I-16 – Morphologie générale du système reproducteur et des mouvements des gamètes (Koene, 2010). Les lignes pointillées et les flèches bleues indiquent le chemin que prennent les propres spermatozoïdes de l'escargot (autosperme) après avoir été produits pour être stockés (dans les vésicules séminales) et ensuite transférés à un partenaire. Les lignes pointillées et les flèches rouges indiquent le destin des spermatozoïdes reçus (allosperme) dans le tractus femelle. Tous les organes sont indiqués par des lettres majuscules. Les différents composants de la ponte (« egg mass ») sont indiqués en lettres minuscules, et leur origine est indiquée par une flèche noire. Les lignes pleines rouges indiquent le parcours des œufs pendant leur conditionnement dans le tractus femelle. BC, bursa copulatrice ; C, carrefour/poche de fécondation ; CA, canal de l'allosperme ; CD, canal déférent ; CH, canal hermaphrodite ; CS, canal spermatique ; féc, fécondation ; GA, glande albumen ; lp, liquide périvitellin ; ls, liquide séminal ; M, glande mucipare ; me, membrana externa ; mi, membrana interna ; o, ovocyte ; O, glande oothéciale ; OT, ovotestis ; P, pénis ; PCO, pars contorta ; PE, préputium ; PG, prostate ; tc, tunica capsulis ; ti, tunica interna ; V, oviducte ; VS, vésicules séminales.

Les spermatozoïdes sont produits au niveau de l'ovotestis (Fig. I-16). Une fois matures, ils sont libérés au niveau des vésicules séminales et transportés via le canal spermatique jusque dans la prostate, où le liquide séminal est ajouté (Koene, 2010). La copulation mâle chez *L. stagnalis* met en jeu une structure appelée le préputium : il s'agit d'un organe cylindrique composé de muscles longitudinaux et circulaires, qui porte le pénis. Il est attaché à la paroi du corps et aux muscles collumellaires via les muscles extenseur et rétracteur (Koene, 2010). Le début de la copulation est marqué par l'intromission du pénis dans le gonopore de la femelle, les spermatozoïdes et le liquide séminal sont alors transportés de la prostate jusqu'au pénis via le canal déférent puis sont transférés dans l'oviducte de la femelle. Ils sont ensuite acheminés vers le canal hermaphrodite où a lieu la fécondation des ovules. Un fois fécondés, les ovules sont entourés de liquide périvitellin sécrété par la glande albumen dans l'oviducte. Les œufs sont ensuite encapsulés dans deux membranes : la membrane interne et la membrane externe (Meshcheryakov, 1990). L'enveloppe entourant la ponte est alors formée dans les glandes mucipare et oothéciale.



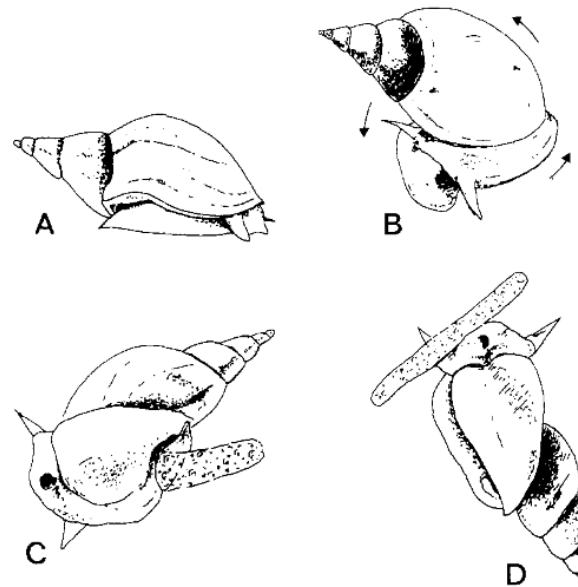


Figure I-17 – Postures caractéristiques de la ponte. A) Phase de repos ; B) Phase de retournement ; C) Oviposition ; D) Inspection (Ter Maat et al., 1989).

Au niveau du comportement, la fécondation est suivie d'une phase de repos de 40 minutes, durant laquelle il y a un arrêt de la locomotion (Fig I-17) (Koene, 2010). Puis il y a une phase de retournement de 60 min, où l'individu fait tourner sa coquille de 90° d'avant en arrière et rase la surface. Ce comportement est lié au passage des œufs dans l'oviducte, détecté par les cellules ciliées qui envoient un signal nerveux via le nerf intestinal (Ferguson et al., 1993; Ter Maat et al., 1989). L'oviposition commence lorsque la gangue contenant les œufs émerge du gonopore de la femelle et dure environ 10 min. L'animal va alors se tordre, arrêter de tourner sa coquille et se mouvoir difficilement. Lorsque la ponte a été déposée, il va glisser le long de la gangue avant de la laisser, il s'agit de la phase d'inspection qui peut durer jusqu'à 30 min (Koene, 2010).

Ces divers comportements de reproduction se déroulent sous contrôle neuroendocrinien (Fig. I-18) (Koene, 2010). Les centres de contrôle principaux du comportement mâle sont situés sur le côté droit du cerveau, ce qui correspond au côté où les organes mâles sont localisés dans le corps. Les groupes de neurones impliqués sont principalement : le lobe antérieur, le lobe ventral droit, le cluster Ib du ganglion pédieux droit, et quelques cellules dispersées sur les ganglions pariétal et pleural droits (De Boer et al., 1996). Les neurones de ces clusters se projettent dans le nerf pénien, qui innerve les organes sexuels mâles. De nombreux neuropeptides sont impliqués dans le comportement copulatoire, parmi lesquels on peut citer l'APGWamide, le FMRFamide ainsi qu'un neurotransmetteur, la sérotonine, qui sont impliqués dans l'éversion du préputium (De Boer et al., 1997a, 1997b; Fong et al., 2005; Muschamp and Fong, 2001). Le comportement reproducteur femelle, quant à lui, est contrôlé principalement au niveau du groupe de cellules caudodorsales bilatérales situé au niveau du ganglion cérébral. Les corps dorsaux constituent également un organe endocrinien bilatéral majeur



dans le comportement femelle et l'oogenèse (Koene, 2010). Les cellules caudodorsales sécrètent une famille de neuropeptides jouant un rôle important dans la ponte, intitulés peptides des cellules caudodorsales (CDCP) et hormone des cellules caudodorsales (CDCH), aussi appelée l'hormone d'ovulation (Hermann et al., 1997).

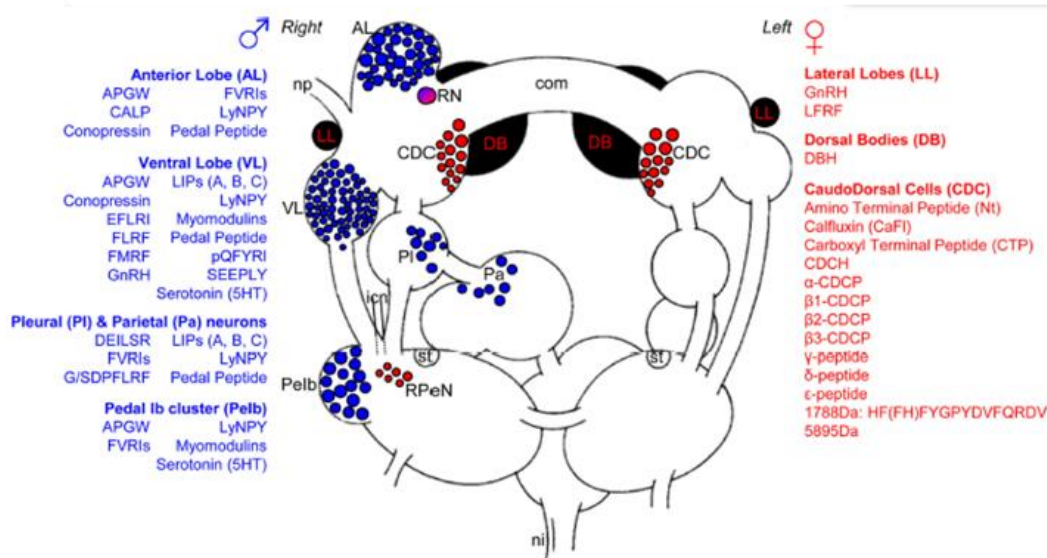


Figure I-18 - Dessin schématique des ganglions impliqués dans la reproduction du système nerveux central. Les zones bleues et rouges indiquent, respectivement, les groupes de neurones impliqués dans la reproduction mâle et femelle. Les substances impliquées dans la reproduction mâle sont également indiquées en bleu ; les substances femelles sont indiquées en rouge. com, commissure cérébrale ; icn, nerf cervical inférieur ; ni, nervus intestinalis ; np, nervus penis ; RN, anneau ganglionnaire ; RPeN, neurone pédieux droit ; st statocyste (Koene, 2010).

### 3. L'alimentation

La prise alimentaire de la limnée se caractérise par une suite de mouvements rythmiques en 3 phases. Lorsque la bouche est ouverte, la radula sort (phase de protraction) puis se rétracte en entraînant le bol alimentaire (phase de rétraction) (Large et al., 2006). La nourriture est ensuite avalée (phase de déglutition). Ce mouvement rythmique est lié à l'activité de 3 classes d'interneurones (N1, N2 et N3) du « central pattern generator » de l'alimentation, situés au niveau du ganglion buccal, chaque classe d'interneurone contrôlant une phase de l'alimentation (Elliott and Benjamin, 1985; Straub et al., 2002). L'activité des motoneurones impliqués dans l'alimentation est contrôlée positivement par la sérotonine, la dopamine, et l'acétylcholine et négativement par le FMRFamide (Kyriakides and McCrohan, 1989). La génération d'oxyde nitrique (NO) a également été démontrée au niveau du ganglion buccal lors de la prise alimentaire et semble avoir un rôle dans le contrôle du comportement alimentaire (Elphick et al., 1995; Kobayashi et al., 2000).

## 4. La locomotion

La reptation chez les gastéropodes aquatiques est l'une des formes de locomotion les plus coûteuses du règne animal, en raison de la nécessité de sécréter du mucus qui est très exigeante en énergie (Lance et al., 2006). Chez *L. stagnalis*, la sole du pied est tapissée d'un épithélium cilié qui recouvre les cellules musculaires lisses du système musculaire horizontal (Fig I-19) (Plesch et al., 1974). Ce gastéropode se déplace en adhérant au substrat par sécrétion du mucus de la sole et glisse sans contraction musculaire visible. Il a été démontré que l'activité motrice basale est liée aux battements ciliaires, dont la fréquence de battements est augmentée par la sérotonine (Pavlova, 2010). Les contractions des muscles lisses sont également déterminantes dans la vitesse locomotrice, et sont modulées par la dopamine (Pavlova, 2013, 2010). L'octopamine influence le comportement locomoteur de la limnée, certainement via une action centrale au niveau du ganglion pédieux (Miyamae et al., 2010; Ormshaw and Elliott, 2006).

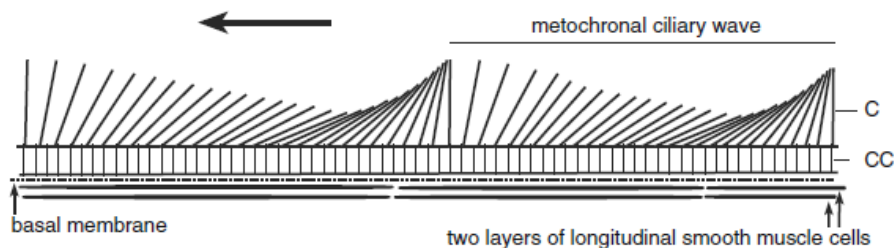


Figure I-19 - Représentation schématique d'une vue latérale de l'appareil locomoteur chez *L. stagnalis* montrant les cils (c), les cellules ciliées (cc), les cellules musculaires ; la flèche montre l'onde ciliaire métachrone et la direction de la limnée (Pavlova, 2010).

## C. Modèle d'intérêt en écotoxicologie

En écotoxicologie, pour évaluer l'action des substances potentiellement toxiques, il est important de réaliser des évaluations du risque sur des espèces différentes et provenant d'écosystèmes divers. Les mollusques constituent le deuxième groupe d'animaux le plus varié et sont considérés comme des bioindicateurs de la santé des écosystèmes (Fodor et al., 2020). De par sa large répartition, sa physiologie qui a été bien caractérisée et sa facilité d'élevage en laboratoire, *L. stagnalis* constitue une espèce de choix pour les études écotoxicologiques. Les premières études réalisées sur cette espèce ont commencé dans les années 1940 et se sont intéressées à l'histologie, la cytologie, et la caractérisation des systèmes reproducteur et neuronal. Il s'agit d'un des premiers mollusques chez lequel les processus neuronaux ont été investigués, et il a été décrit comme « un modèle réductionniste, mais sophistiqué, pour aborder les questions fondamentales de l'apprentissage et de la mémoire » (Rivi et al., 2020). Des années 1970 aux années 2000, l'électrophysiologie du système nerveux et la régulation neuroendocrinienne ont été très étudiées (Elliott and Benjamin, 1985; Ferguson et al., 1993; Roubos and Moorers-van Delft, 1979). Des études écotoxicologiques ont alors

commencé à être conduites sur cet organisme. Ce dernier a été identifié comme très sensible aux métaux, avec une forte capacité à les bioaccumuler (Coeurdassier et al., 2003; Gonçalves et al., 2016; Présing et al., 1993; Pyatt et al., 2002). Il a également été utilisé pour étudier les effets de perturbateurs endocriniens, comme par exemple le tributylétain (TBT) (Czech et al., 2001; Ducrot et al., 2010; Lagadic et al., 2017). Sa capacité à produire un grand nombre de progéniture permet en effet la réalisation d'études de fertilité et de fécondité, ce qui a été appuyé par son choix comme organisme de test standard dans une ligne directrice de l'OCDE relative aux tests prolongés des produits chimiques sur la fonction reproductive (OECD, 2016). De plus, la transparence des pontes rend possible les études de développement embryonnaire. Il s'agit aussi d'un organisme qui possède un large répertoire comportemental, permettant d'étudier la locomotion, l'alimentation ou le comportement de fuite, qui sont indispensables pour la survie de l'animal et pour le maintien de la population (Aonuma et al., 2020; Dobranskyte et al., 2006; Niyogi et al., 2014).

La bonne caractérisation de la physiologie d'un organisme modèle est un prérequis important, cependant les recherches plus récentes s'intéressent également à la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents via des approches omiques (Santama et al., 1995). Au niveau moléculaire, le transcriptome du système nerveux central a été séquencé (Feng et al., 2009; Sadamoto et al., 2012) ainsi que le génome de l'organisme entier (Coutellec et al., 2019), procurant des outils moléculaires pour l'application des méthodes omiques. La méthode d'édition du génome CRISPR/Cas9 a également été appliquée à cet organisme dans le but d'étudier la chiralité de la coquille, qui existe sous 2 formes (dextre et sénestre) (Abe and Kuroda, 2019). Les métabolomes du système nerveux central, de la glande digestive et de la glande albumen ont été investigués par Tufi et al. (2015a), avec deux méthodes analytiques complémentaires, la chromatographie en phase liquide et la chromatographie en phase gazeuse, couplées à de la spectrométrie de masse haute performance. Cette étude a permis de fournir un profil métabolique organe-spécifique. L'application de méthodes omiques sur cet organisme ouvre de nombreuses possibilités pour une meilleure compréhension des processus moléculaires mis en jeu dans la réponse à un contaminant.

## V. Objectifs de la thèse

Comme nous avons pu le voir dans cette synthèse bibliographique, les composés pharmaceutiques sont des contaminants émergents d'intérêt majeur. Parmi eux, le diclofénac a suscité une inquiétude importante de par sa forte utilisation et la faible efficacité des traitements classiques réalisés en station d'épuration. Il a par conséquent été considéré comme une substance « pseudo-persistante », fréquemment détectée dans les cours d'eau au niveau mondial, et a été inscrit comme substance prioritaire sur la liste de vigilance européenne des substances à surveiller dans le cadre de

la politique de l'eau de 2015 à 2018. Cependant, les études écotoxicologiques réalisées sur des invertébrés aquatiques ont pour la plupart utilisé des concentrations de diclofénac bien au-dessus des concentrations environnementales. Le comportement, qui regroupe des fonctions majeures pour la survie d'une espèce (alimentation, locomotion, fuite), a été peu étudié chez ces organismes, et les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'apparition d'un impact au niveau physiologique ont été peu caractérisés. De plus, bien que les organismes aquatiques soient au contact de cette molécule pendant plusieurs générations, une seule étude s'est intéressée aux effets multigénérationnels d'une exposition au diclofénac.

Il apparaît donc important de répondre à ces différentes problématiques en s'intéressant aux effets d'une exposition chronique, aux concentrations environnementales, sur un organisme benthique montrant un intérêt grandissant en écotoxicologie, *Lymnaea stagnalis*. Il présente une physiologie largement décrite avec un cycle de vie en laboratoire de 3 mois, permettant la réalisation d'études multigénérationnelles. De plus, les méthodes omiques sont en plein développement sur cet organisme, ouvrant de larges possibilités pour une compréhension accrue des mécanismes à l'échelle moléculaire.

Par conséquent, l'objectif de cette thèse est d'étudier les effets au long court de concentrations environnementales de diclofénac sur le gastéropode d'eau douce *L. stagnalis*. Cet objectif a été détaillé en plusieurs sous-objectifs :

- (i) Caractérisation des produits de biotransformation du diclofénac chez *L. stagnalis*.
- (ii) Evaluation des effets du diclofénac sur la physiologie et le comportement des organismes après une exposition multigénérationnelle à des concentrations environnementales en étudiant des paramètres physiologiques et comportementaux.
- (iii) Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse à une exposition au diclofénac.

Ce manuscrit est divisé en deux parties. La première traite de la biotransformation du diclofénac chez *L. stagnalis*. En effet, si les mécanismes de détoxification des métaux ont été très étudiés chez cette espèce, nous avons peu d'informations sur les voies mises en jeu dans la détoxification des substances organiques. La seconde partie concerne l'étude des effets chroniques du diclofénac sur notre organisme modèle. Nous avons réalisé une étude multigénérationnelle, avec exposition à des concentrations environnementales (0,1, 2 et 10 µg/L) durant la durée d'un cycle de vie sur 3 générations, en s'intéressant à des paramètres physiologiques (succès d'éclosion, reproduction) et comportementaux (locomotion, réponse au stress lumineux, alimentation), ciblant des fonctions précises. Sur la génération parentale (F0), des approches moléculaires

(transcriptomique, métabolomique) non ciblées permettant une étude sans a priori ont été conduites au stade adulte.

Ces différentes données nous permettront d'améliorer la compréhension du devenir du diclofénac chez un gastéropode aquatique ainsi que des mécanismes d'action impliqués dans l'impact d'une exposition à long terme

---

**CHAPITRE II : Caractérisation du métabolisme du diclofénac chez le  
gastéropode aquatique *Lymnaea stagnalis***

---



## I. Synthèse

Si la biologie du gastéropode aquatique *Lymnaea stagnalis* a été bien caractérisée, les processus de détoxification chez cet organisme ont surtout été étudiés dans le contexte d'une exposition aux métaux. Les voies impliquées dans le métabolisme des contaminants organiques restent donc à élucider chez cette espèce. Lors de l'évaluation du risque environnemental, il est intéressant de prendre en compte les métabolites formés chez les organismes. En effet, ils peuvent être une explication (parmi d'autres) des effets spécifiques d'un contaminant sur une espèce. C'est dans cet objectif que le profilage métabolique des métabolites formés après exposition au diclofénac (DCF) a été réalisé chez *L. stagnalis*, avec une approche non ciblée permettant la détection de métabolites non caractérisés dans la littérature, ainsi qu'avec une recherche ciblée des métabolites précédemment identifiés. Des limnées adultes ont été exposées au DCF à une concentration de 300 µg/L au laboratoire pendant 3 et 7 jours puis leurs profils métaboliques ont été explorés par LC-HRMS et comparés avec le profil des contrôles, afin d'identifier les signaux exprimés uniquement après exposition au DCF.

Les organismes proviennent de l'élevage du laboratoire BTSB (Biochimie et toxicologie des Substances Bioactives, Albi), commencé en 2019 à partir de limnées provenant de l'IRSTEA de Lyon. Ils ont été sélectionnés à taille adulte, et ont été exposés pendant 3 et 7 jours au DCF à une concentration de 300 µg/L. Cinq individus contrôles et 5 individus exposés ont été sélectionnés au jour 3 et au jour 7 pour étudier le métabolisme du DCF. Aux jours 3 et 7, le DCF a été quantifié dans l'eau par LC-UV, et le DCF ainsi que ses deux métabolites principaux, le 4'- et le 5-hydroxydiclofénac (4' et 5OH-DCF), ont été quantifiés dans les organismes par LC-HRMS. Les métabolites du DCF ont été identifiés avec une approche non-ciblée en LC-HRMS, en comparant les signaux observés chez les exposés avec ceux observés chez les contrôles. Les métabolites précédemment signalés dans la littérature ont également été recherchés.

Le facteur de bioconcentration (FBC) du DCF chez *L. stagnalis* a été calculé ( $j=3$  et  $7$ ) et se situe entre 9 et 17 (poids sec), montrant une faible bioaccumulation du DCF chez la limnée. Cette faible bioaccumulation est cohérente avec ce qui a été observé chez les organismes aquatiques avec des concentrations d'exposition similaires. Le FBC est inférieur au jour 7 par rapport au jour 3, ce qui est en faveur d'une activation des voies métaboliques au cours du temps. Les concentrations de 4'OH-DCF dans le corps de l'animal doublent entre 3 et 7 jours, supportant l'hypothèse d'une activation des voies métaboliques par une exposition chronique au contaminant. Ces concentrations sont supérieures à ce qui a été observé auparavant chez la moule méditerranéenne dans des conditions expérimentales similaires, révélant une importance supérieure de cette voie de détoxification du DCF chez la limnée. Dix-neuf métabolites du DCF ont été identifiés, parmi lesquels 14 de phase I et 4 de phase 2. Douze de



ces métabolites ont été observés pour la première fois chez un organisme aquatique. Le métabolisme de phase I semble être une voie majeure de détoxification avec des métabolites provenant principalement de réactions d'hydroxylation, probablement dues à la présence de cytochrome P450, avec 3 métabolites hydroxylés et 3 métabolites dihydroxylés. La présence de métabolites lactames, acides benzoïques et p-benzoquinone imine a également été démontrée. Un métabolisme de phase II a été mis en évidence, avec 4 métabolites dont 3 conjugués au glucose et 1 conjugué au sulfate. De manière surprenante, il n'y a pas eu détection de métabolites conjugués au glutathion bien que la glutathion-S-transférase ait été reportée chez cette espèce, et qu'il s'agisse d'un mécanisme de détoxification des quinones imines réactives chez les mammifères. Les voies impliquées dans le métabolisme du DCF chez la limnée semblent différentes de celles observées chez la truite arc-en-ciel, la moule, et les crustacés, qui identifient par exemple des métabolites conjugués aux acides aminés ou le méthyl ester DCF.

## II. Article n°1

### Metabolism of the aquatic pollutant diclofenac in the *Lymnaea stagnalis* freshwater gastropod

Lucie Bouly<sup>a,b</sup>, Hélène Fenet<sup>b</sup>, Jean-Luc Carayon<sup>a</sup>, Elena Gomez<sup>b</sup>, Florence Gélet<sup>a</sup> and Frédérique Courant<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Albi, France

<sup>b</sup>HydroSciences Montpellier, University of Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France

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

Submitted at *Environmental Science and Pollution Research* (2022 January 07)

**Abstract:** Pharmaceuticals are continuously released in the aquatic environment, thereby representing a risk to aquatic organisms. Lower invertebrates may be affected by this pollution since they are likely to bioaccumulate contaminants. The metabolism of pharmaceuticals in invertebrates such as *Lymnaea stagnalis* requires further investigation to highlight their detoxification mechanisms. In this study, a non-targeted strategy using liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry was applied to highlight metabolites formed in *Lymnaea stagnalis* freshwater snails exposed to 300 µg/L diclofenac for 3 and 7 days. Nineteen metabolites were revealed by this approach, 12 of which were observed for the first time in an aquatic organism exposed to diclofenac. Phase I metabolism involved hydroxylation, with detection of 3'-, 4'- and 5-hydroxydiclofenac and three dihydroxylated metabolites, as well as cyclization, oxidative decarboxylation and dehydrogenation, while Phase II metabolism consisted of glucose and sulfate conjugation.

**Keywords:** NSAID, biotransformation, LC-HRMS/MS, invertebrates, metabolite, pharmaceutical

## 1. Introduction

In recent decades, aquatic pollution by pharmaceuticals has prompted growing concern about their potential impact on aquatic organisms. Indeed, these drugs are widely used to an increasing extent in human and veterinary medicine, in turn leading to continuous release in the environment (Nikolaou et al., 2007). Among these pharmaceuticals, diclofenac (DCF) was included in the first Watch List under the Water Framework Directive (EU Decision 2015/495 European Commission, 2015) which was geared towards generating high-quality monitoring data to be able to draw conclusions on actual risks posed. This non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) is administered as a painkiller in the treatment of minor pain or as an anti-inflammatory drug in chronic inflammatory disease management (Zhou et al., 2014). This drug is commonly sold over-the-counter, thus explaining its high use, with a global mean per-capita consumption rate of 0.33 g/person/year between 2010 and 2013 (Acuña et al., 2015), therefore explaining its high release into the aquatic environment. Moreover, the poor efficacy of conventional wastewater treatment plants in removing pharmaceuticals contributes to the presence of DCF in surface waters at concentrations ranging from ng/L to a few µg/L (Sathishkumar et al., 2020; Zhang et al., 2008).

Gastropods are widespread in the freshwater environment and have an important function in the transfer of energy and materials through food webs (Tallarico, 2016). The freshwater great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) is representative of lentic systems and, like other gastropods, is considered to be an excellent bioindicator of ecosystem health (Amorim et al., 2019; Baroudi et al., 2020). It is reported to have high sensitivity to pollutants, as well as a high bioaccumulation capacity (Elangovan et al., 1997; Grosell et al., 2006; Niyogi et al., 2014), making it a good model to study xenobiotic impacts on the aquatic environment. *L. stagnalis* has been studied with regard to metal (Atli and Grosell, 2016; Ng et al., 2011; Walton et al., 2011) and pesticide (Gnatyshyna et al., 2020) exposure, but little is currently known about detoxification processes involved in the metabolism of organic contaminants in this species and information on how to predict DCF metabolism is lacking. It would be essential to gain further insight into pharmaceutical biotransformation processes in the great pond snail.

DCF metabolism has been investigated in a few aquatic organisms exposed to this drug under controlled conditions, resulting in the identification of Phase I and II metabolites. Hydroxylated DCF metabolites and acyl glucuronide conjugates were detected in the bile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to this drug at 1–50 µg/L concentration (Kallio et al., 2010; Lahti et al., 2011; Mehinto et al., 2010). In addition, DCF sulfo-conjugates (Kallio et al., 2010; Lahti et al., 2011) and methyl esters (Mehinto et al., 2010) were identified. In aquatic invertebrates, DCF metabolism has been particularly investigated in mussels, revealing Phase I metabolism with the presence of 5-hydroxydiclofenac (5OH-DCF) and 4'-hydroxydiclofenac (4'OH-DCF) (Bonafille et al., 2017; Świacka et al., 2019). In addition to the identified Phase I metabolites, the non-targeted study of Bonafille et al. (2017) led to the

detection of 10 Phase II metabolites (mostly amino-acid conjugates) after 7 days of exposure to 600 µg/L DCF. Regarding aquatic crustaceans, Fu et al. (2020) conducted a study on *Gammarus pulex* and *Hyalella azteca* after 1 and 0.2 mg/L DCF exposure over a 24 h period. The non-targeted analysis revealed 6 metabolites in *G. pulex* and 8 in *H. azteca*, with DCF methyl esters and taurine conjugates being the major metabolites detected.

The non-targeted approach was successfully applied in several of these studies, allowing the detection of metabolites that had not been previously reported (Bonnefille et al., 2017; Fu et al., 2020). We thus opted to use this approach to explore DCF metabolism in *L. stagnalis* to offset the lack of information on the process. The study was designed to identify DCF metabolites (already known and non-documented ones) in *L. stagnalis* following exposure to 300 µg/L DCF concentration. The approach was conducted with liquid chromatography (LC) coupled with high resolution mass spectrometry (HRMS), with putative identification of metabolites in tissues and quantification using available analytical standards.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

Diclofenac (DCF, purity ≥98%) and diclofenac-d4 (DCF-d4, purity ≥98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), while 4'-hydroxydiclofenac (4'OH-DCF, purity ≥97%) and 5-hydroxydiclofenac (5OH-DCF, purity 98% ± 2%) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Stock standard solutions of individual compounds were prepared at 1,000 mg/L in methanol and stored at -20°C. Ultrapure water was generated by a Simplicity UV system from Millipore (Bedford, MA, USA) with a specific resistance of 18.2 MΩ.cm at 25 °C. Analytical grade solvent hydrochloric acid (37%) was obtained from PanReac (Barcelona, Spain), HPLC grade trifluoroacetic acid was from VWR Chemicals (Leuven, Belgium) and hyper-grade acetonitrile for LC/MS was from Merck (Molsheim, France). Pesticide analytical-grade solvents (methanol, dichloromethane and ethanol) and LC/MS grade solvents (water, acetonitrile, formic acid 99%) were from Carlo Erba (Val de Reuil, France).

### 2.2. Animals and diclofenac exposure experiment

*Lymnaea stagnalis* snails used in this study were from BTSB laboratory cultures (Biochemistry and Toxicology of Bioactive Substances, EA 7417, Albi). The rearing conditions were previously described in Bouly et al. (2021).

Adult snails were chosen with a shell size ranging from 25 to 32 mm. They were randomly distributed in twelve 1 L beakers with a density of 4 individuals per beaker in 800 mL of water. The snails were acclimated for 3 days before the experiment. They were fed fresh organic lettuce daily. Two groups were then randomly constituted: 6 beakers of snails corresponding to controls and 6

beakers of snails exposed to a nominal concentration of 300 µg/L DCF. Snails from three control beakers and from three exposed beakers (12 snails/condition) were dissected after 3 days of exposure, while snails from the 3 remaining beakers of each group (control and exposed) were dissected after 7 days of exposure. The shells were discarded and the whole-body tissues were frozen at -80°C. Among these 12 individuals/condition, 5 controls and 5 organisms exposed at days 3 and 7 were randomly selected to study DCF metabolism. The remaining organisms were retained for further analysis, but not within the scope of this study. Water was sampled at days 3 and 7 in the control and exposed beakers and stored at -20 °C until analysis. No mortality was observed during the acclimation phase and the exposure experiment.

### **2.3. DCF quantification in water samples by LC-UV**

Chemical analysis was as described in Bouly et al. (2021). For each sample, 1 mL HCl acidified water (pH 2) was extracted on a SPE Strata C18-E column, 1 g/6 mL (Phenomenex, Le Pecq, France). The columns were then rinsed with 4 mL deionized water with HCl (pH 2) and dried for 4 h in a laboratory oven at 45°C. Components were eluted with 4 mL acetonitrile (ACN). The extracts were then dried under a nitrogen stream and reconstituted with 1 mL ACN. HPLC 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 × 250 mm) capillary column (Agela Technologies, Torrance, USA). The solvents were water (A) and ACN (B), both modified with 0.05% trifluoroacetic acid. The elution gradient was as follows (t in min): t<sub>0</sub>, B = 30%; t<sub>11</sub>, B = 100%; t<sub>13</sub>, B = 100%, t<sub>13.5</sub>, B = 30%, t<sub>18</sub>, B = 30%. The column oven temperature was set at 40 °C, with a 10 µL injection volume and 1 mL/min flow rate. The working UV wavelength was 275 nm. Data analyses were performed using ChromQuest 5.0. For DCF concentration quantification, a 4-point calibration curve spanning the 0.1 mg/L to 1 mg/L range was plotted in triplicate, with DCF dissolved in ACN (external standard method). DCF concentrations of the stock solutions were measured using the same analytical method. The limit of quantification (LOQ) was 0.1 mg/L and the limit of detection (LOD) was 0.03 mg/L.

### **2.4. Tissue sample analysis**

#### **2.4.1. Sample preparation**

Tissue samples were freeze-dried and crushed until a fine powder was obtained. Tissue sample preparations were adapted from Bonnefille et al. (2017). Tissue samples of 60 mg dry weight (± 1 mg) were spiked with DCF-d<sub>4</sub> (1 mg/kg) and extracted twice with 576 µL ACN and 24 µL formic acid using ultrasound (10 min each). After each extraction, samples were centrifuged (2,000 g, 15 min, 4 °C). Supernatants were collected in a glass tube, dried under a nitrogen stream and reconstituted in 1 mL

ultrapure water and 100  $\mu\text{L}$  methanol. 30 mg SPE Oasis HLB (1  $\text{cm}^3$ ) from Waters (Mildford, MA, USA) was preconditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of ultrapure water before the cleaning step. After the supernatants were loaded, the columns were rinsed with 2x1 mL methanol/water (5/95; v/v) and eluted with 3 mL methanol/water (80/20; v/v). Extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted in 150  $\mu\text{L}$  ACN/water (80/20; v/v). The samples were filtered directly into an analysis vial using a 0.20  $\mu\text{m}$  PTFE syringe filter (Minisart SRP 4, Sartorius).

#### 2.4.2. LC-MS analysis

The injections were performed on a Q Exactive Orbitrap LC-HRMS (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated electrospray ionization source (HESI). LC-MS analysis was the same as described in Bonnefille et al. (2017). A reverse phase pentafluorophenylpropyl (PFPP) analytical column (100 x 2.1 mm; 3  $\mu\text{m}$  particle size; Sigma Aldrich) was used for LC separation. The LC mobile phases were water (A) and ACN (B), both modified with 0.1% formic acid. Each sample (10  $\mu\text{L}$ ) was loaded onto the column. The flow rate was 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  according to the following gradient (A/B): 95/5 at 0 min, 86/14 at 3 min, 66/34 at 14 min, 55/45 at 18 min, 5/95 from 20 to 25 min and a return to the initial conditions at 28 min, followed by a 7 min re-equilibration period (95/5), for a total run time of 35 min. Samples were analyzed simultaneously in both positive and negative electrospray ionization modes (ESI+ and ESI-). The ESI+ and ESI- parameters were as follows: sheath gas 55 arbitrary units (AU), auxiliary gas 10 AU, capillary temperature 275  $^{\circ}\text{C}$ , heater temperature 150 $^{\circ}\text{C}$ , while the electrospray voltage was set at 4.5/-3 kV. The tube lens was set at 95/-110 V, the skimmer at 22/-16 V and the capillary voltage at 40/-60 V. Full scan mode with a mass range of  $m/z$  50–750 at a mass resolving power of 35,000 was used in both ionization modes. In addition, some samples were reanalyzed with a parallel reaction monitoring (PRM) MS/MS mode using a mass inclusion list consisting of the  $m/z$  of the parent ions of interest. A mass resolving power of 35,000 was used and 10 to 20 eV energy was applied to the high energy collision dissociation (HCD) cell. The mass window selection parameter was set at 5 to monitor the isotopic patterns of parent and product ions.

#### 2.4.3. LC-MS quantification of DCF and its hydroxylated metabolites in tissue samples

Solvent calibration curves for DCF, 5OH-DCF and 4'OH-DCF were established by adding increasing quantities of analytes (0–5 mg/kg for DCF, 0–0.5 mg/kg for 5OH-DCF and 0–50 mg/kg for 4'OH-DCF) with a fixed amount of DCF-d4 (1 mg/kg) internal standard.  $R^2$  values were above 0.99 for all target analytes. The DCF quantification method was assessed in Bonnefille et al. (2017) and analytical performances were considered similar. To determine DCF bioconcentrations in snail tissues, a bioconcentration factor (BCF) was calculated at days 3 and 7 as follows:

$$BCF = \frac{\text{concentration in tissues } (\mu\text{g/kg dw})}{\text{concentration in water } (\mu\text{g/L})}$$

#### 2.4.4. Data processing and DCF metabolite identification strategy

Chemical profiles from control and DCF exposed samples at days 3 and 7 (5/condition) were generated by LC-HRMS. The presence of DCF metabolites in snail tissues was assessed by a non-targeted approach, as described below, as well as by a suspect screening approach based on metabolites reported in the literature. Raw data were converted into mzXML files with MSConvert freeware (ProteoWizard 3.0, Holman et al., 2014). ESI+ and ESI- acquisitions were processed separately using the XCMS package (Smith et al., 2006) in the R environment to integrate the chromatographic peaks per sample. This multi-step strategy has already been described by Dumas et al. (2020). XCMS parameters were applied as follows: the  $m/z$  interval was set at 0.01, the signal to noise ratio threshold at 10, the group bandwidth at 8, and the minimum fraction at 0.5. After data processing, XCMS generated a table containing peak information and feature abundances per sample. The peaks detected only in the exposed samples (absent in the control samples) and found in at least three replicates among the five were considered to indicate potential DCF metabolites. Extracted ion chromatograms (EICs) were also extracted by Thermo Freestyle 1.7 to confirm the absence of signal in the controls. Elemental compositions of unknown metabolites were generated by the Thermo Xcalibur Qual Browser (XCalibur 4.2.47), and those with the most suitable C, H, N, O and Cl compositions, based on the DCF composition, were reported. Confidence levels of the metabolite identification were proposed according to Schymanski et al. (2014). Level 1 corresponds to structures confirmed by analytical standard injection, based on MS, MS/MS and retention time matching. Level 2 refers to probable structures, proposed based on evidence from the literature or library spectrum data (2a), or on diagnostic MS/MS fragments and/or ionization behavior, parent compound information and the experimental context, in the absence of previously reported information (2b). Level 3 is a tentative candidate with an uncertain exact structure. Level 4 describes compounds for which an unequivocal formula is proposed based on spectral information, while level 5 describes those where only the exact mass ( $m/z$ ) is available.

### 3. Results

#### 3.1. DCF quantification

Table 1 – Mean concentration ( $\pm$  standard deviation) of DCF in exposure water and of DCF, 4'OH-DCF and 5OH-DCF in exposed snail tissues at days 3 and 7 and experimental BCF

Time	Day 3	Day 7
DCF concentration in water ( $\mu\text{g/L}$ ) (n=3)	304.4 $\pm$ 7.0	311.8 $\pm$ 7.7
DCF concentration in tissues (mg/kg dw) (n=5)	5.17 $\pm$ 3.02	2.89 $\pm$ 1.78
Experimental BCF	17.0	9.3
4'OH-DCF concentration in tissues (mg/kg dw) (n=5)	7.77 $\pm$ 4.62	15.83 $\pm$ 14.24
5OH-DCF concentration in tissues (mg/kg dw) (n=5)	0.30 $\pm$ 0.28	0.36 $\pm$ 0.22

DCF concentrations were measured in exposed beakers to monitor snail exposure. The actual DCF concentrations in exposed beakers at days 3 and 7 were 304.4  $\pm$  7.0 and 311.8  $\pm$  7.7  $\mu\text{g/L}$ , respectively (Table 1). DCF was not detected in control organisms. The whole-body concentration of exposed individuals was 5.17  $\pm$  3.02 mg/kg dw on day 3 and 2.89  $\pm$  1.78 mg/kg dw on day 7 (Table 1). Considering the water concentration, the bioconcentration factors (BCF) ranged from 9.3 to 17.0, depending on the exposure time (Table 1).

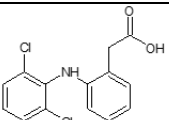
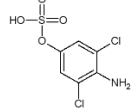
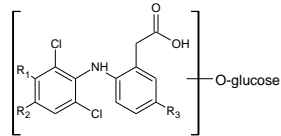
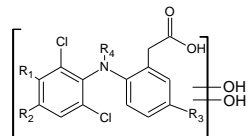
#### 1.1. Biotransformation products

Nineteen metabolites were detected by suspect-screening and non-targeted approaches. These metabolites are reported in Table 2 and numbered from M1 to M19 according to their increasing retention times. These metabolites presented a specific dichlorinated isotopic pattern of M/M+2/M+4 – or at least M/M+2, reflecting the natural abundance of dichlorinated isotopes (Bonnetille et al., 2017). Each identified metabolite was found to be absent in the control samples. The extracted ion chromatograms (EIC) for DCF and its metabolites are presented for days 3 and 7 in the Supplementary material (Fig. S1 and S3 and Fig. S2 and S4, respectively). Due to a chlorine mass defect, masses filtered on the chromatogram were specific to chlorinated compounds, thus explaining the absence of signal or noise in the control samples on the EIC.



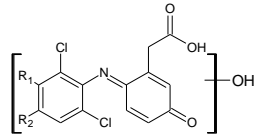
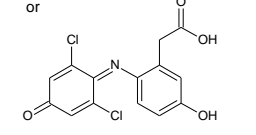
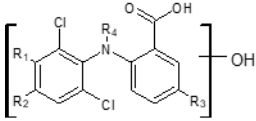
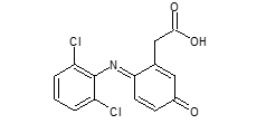
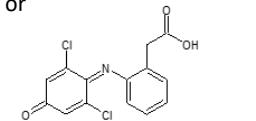
CHAPITRE II : Caractérisation du métabolisme du diclofénac chez le gastéropode aquatique  
*Lymnaea stagnalis*

Table 2 – Summary of DCF and its metabolites detected in snail tissues by HPLC and mass spectrometer analysis

ID	Name	Proposed structure	Rt (min)	Formula (neutral form)	Polarity	Observed [M-H] <sup>-</sup> or [M+H] <sup>+</sup> (m/z) ( $\Delta m$ )	Relevant fragments (m/z)	Confidence level <sup>a</sup>	Abundance <sup>b</sup> d3	Abundance <sup>b</sup> d7	Reference
DCF	Diclofenac		23.27	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-	294.0086 (-2.59 ppm)	250.0190 (-CO <sub>2</sub> ) 214.0418 (250-HCl)	1	+++	+++	
M1	4-amino-3,5-dichlorophenyl hydrogen sulfate		10.65	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> S	-	255.9238 (-2.14 ppm)	175.9674 (-SO <sub>3</sub> )	3	+	+	
M2	OH-DCF, glucose		15.55	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	-	472.0553 (-3.91 ppm)	310.0044 (-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> ) 266.0144 (310-CO <sub>2</sub> ) 230.0378 (266-HCl)	2b	++	+++	Fu et al., 2017; Sarda et al., 2012
M3	OH-DCF, glucose	See M2 structure	16.26	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	-	472.0555 (-3.46 ppm)	310.0043 (-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> ) 266.0144 (310-CO <sub>2</sub> )	2b	+	++	Fu et al., 2017; Sarda et al., 2012
M4	OH-DCF, glucose	See M2 structure	16.96	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	-	472.0552 (-4.16 ppm)	428.0674 (-CO <sub>2</sub> ) 266.0145 (428-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> )	2b	+	++	Fu et al., 2017; Sarda et al., 2012
M5	Dihydroxy-DCF		17.50	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	-	325.9982 (-3.30 ppm)	282.0092 (-CO <sub>2</sub> )	2b	+	+	Bort et al., 1999a, 1999b; De Bartolo et al., 2006; Sarda et al., 2012
M6	Dihydroxy-DCF	See M5 structure	17.74	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	-	325.9982 (-3.30 ppm)	282.0096 (-CO <sub>2</sub> )	2b	+	+	Bort et al., 1999a, 1999b; De Bartolo et al., 2006; Sarda et al., 2012

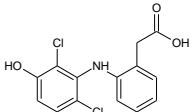
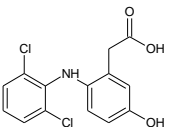
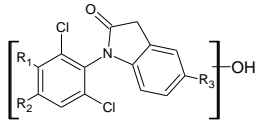
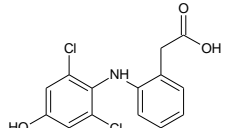
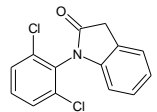
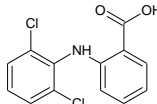
## CHAPITRE II : Caractérisation du métabolisme du diclofénac chez le gastéropode aquatique

### *Lymnaea stagnalis*

M7	OH-QI of OH-DCF	 or 	17.85	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	-	323.9827 (-2.74 ppm)	279.9938 (-CO <sub>2</sub> ) 244.0170 (280-HCl)	3	++	+	
M8	OH-QI of OH-DCF	See M7 structure	18.47	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	-	323.9826 (-3.19 ppm)	279.9942 (-CO <sub>2</sub> ) 244.0174 (280-HCl)	3	++	++	
M9	Dihydroxy-DCF	See M5 structure	18.62	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	-	325.9979 (-4.13 ppm)	282.0098 (-CO <sub>2</sub> )	2b	+/-	+/-	Bort et al., 1999a, 1999b; De Bartolo et al., 2006; Sarda et al., 2012
M10	OH-DCF benzoic acid		20.88	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	-	295.9875 (-3.99 ppm)	260.0104 (-HCl) 224.0342 (260-HCl) 196.0394 (224-CO) 279.9930 (-H <sub>2</sub> O) 245.0243 (280-Cl) 184.0736 (245-CO <sub>2</sub> , Cl)	2b	+	+/-	Jewell et al., 2016
M11	QI of OH-DCF	 or 	21.05	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	+	310.0031 (-0.47 ppm)	291.9928 (-H <sub>2</sub> O)	2b	+	+	Fu et al., 2020; Gröning et al., 2007; Huber et al., 2016; Jewell et al., 2016
M12	OH-DCF benzoic acid	See M10 structure	21.55	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	-	295.9874 (-4.26 ppm)	260.0106 (-HCl) 224.0342 (260-HCl) 196.0394 (224-CO) 168.0447 (196-CO) 279.9934 (-H <sub>2</sub> O) 262.0272 (-HCl) 263.0349 (-Cl) 246.0321 (263-OH)	2b	++	+	Jewell et al., 2016

CHAPITRE II : Caractérisation du métabolisme du diclofénac chez le gastéropode aquatique

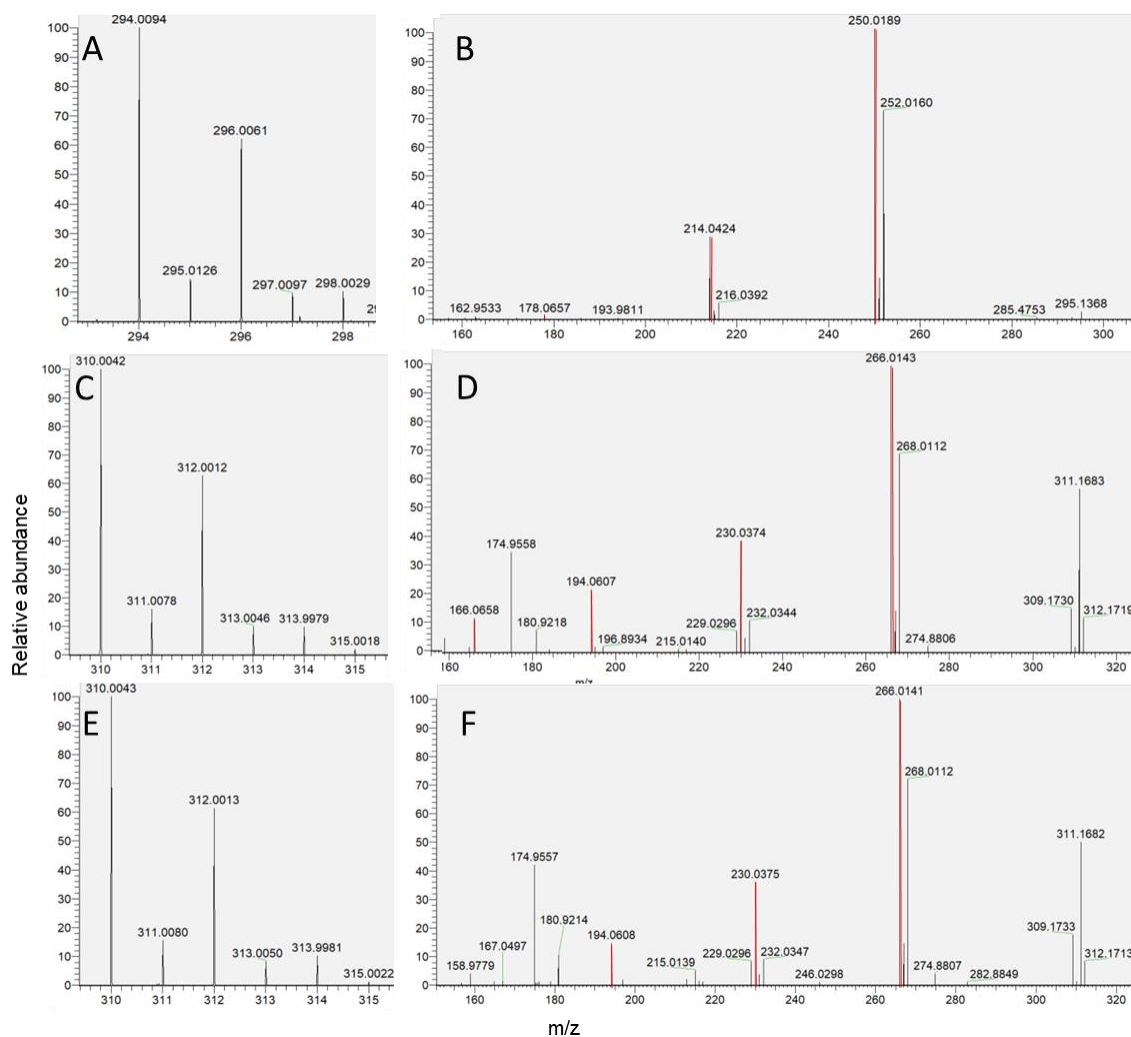
*Lymnaea stagnalis*

M13	3'OH-DCF		21.55	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	-	310.0033 (-3.30 ppm)	184.0738 (263-CO <sub>2</sub> , Cl) 266.0147 (-CO <sub>2</sub> ) 230.0381 (266-HCl)	2b	++	++	Stierlin and Faigle, 1979; Stierlin et al., 1979; Wiesenberg-Boettcher et al., 1991
M14	5OH-DCF		21.67	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	-	310.0033 (-3.30 ppm)	266.0148 (-CO <sub>2</sub> )	1	+	+	Bonnefille et al., 2017; Fu et al., 2020; Kallio et al., 2010; Sarda et al., 2012
M15	Unassigned	—	21.70	Unassigned	-	380.9857	336.9976 (-CO <sub>2</sub> ) 301.0354 (337-HCl)	5	+	+	
M16	OH-DCF, lactam dehydrate		21.90	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-	291.9930 (-2.46 ppm)	256.0160 (-HCl) 228.0208 (256-CO) 220.0393 (256-HCl) 212.0264 (228-O) 192.0447 (220-CO)	2b	+	+	Bonnefille et al., 2017; Fu et al., 2020; Stülten et al., 2008
M17	4'OH-DCF		21.90	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	-	310.0034 (-2.9 ppm)	181.0497 (196-CH <sub>3</sub> ) 266.0147 (-CO <sub>2</sub> ) 230.0379 (266-HCl) 194.0612 (230-HCl)	1	+++	+++	Bonnefille et al., 2017; Fu et al., 2020; Kallio et al., 2010; Sarda et al., 2012
M18	DCF, lactam dehydrate		22.90	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> NOCl <sub>2</sub>	+	278.0130 (-1.42 ppm)	214.0419 (-CO,HCl) 215.0502 (-CO,Cl) 208.0765 (-Cl <sub>2</sub> ) 171.9719 (-C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O)	2a	+	+/-	Jewell et al., 2016
M19	DCF benzoic acid		23.01	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	+	282.0088 (+1.70 ppm)	263.9982 (-H <sub>2</sub> O) 247.0296 (-Cl) 230.0372 (247-OH) 201.0141 (263-CO,Cl)	2a	+	+/-	Jewell et al., 2016

<sup>a</sup>Based on the study of Schymanski et al. (2014); <sup>b</sup>Mean signal abundance +++ (E7), ++ (E6), + (E5), +/- (E4)

### 1.1.1. Diclofenac

DCF was highlighted in negative electrospray ionisation mode (ESI-) at  $m/z$  294.0086, representing a mass error of 2.59 ppm, and was eluted at 23.27 min retention time (Rt). DCF identification was confirmed by analytical standard injection under the same conditions. In the analytical standard, DCF was characterized by the M ( $m/z$  294.0094) / M+2 ( $m/z$  296.0061) / M+4 ( $m/z$  298.0029) diagnostic isotopic pattern (Fig. 1A), which is typical of a dichlorinated compound. Abundances were related to the presence of two  $^{35}\text{Cl}$  (abundance of 9), one  $^{35}\text{Cl}$  and one  $^{37}\text{Cl}$  (abundance of 6), or two  $^{37}\text{Cl}$  (abundance of 1). HCD fragmentation (20 eV) demonstrated the presence of a fragment at  $m/z$  250, corresponding to  $\text{CO}_2$  loss in the DCF structure (Fig. 1B). This fragment presented a M/M+2 isotopic pattern. M+4 was not observed there, certainly due to the lack of abundance of this fragment. Another fragment was noted at  $m/z$  214, consistent with an HCl loss relative to the previously observed fragment (Fig. 1B). The same ion patterns were observed in exposed samples, thus confirming the presence of DCF in the snail tissues (Fig. S5).



**Fig. 1** - High-resolution mass spectrum of analytical standards of DCF (A,B), 4'-OH-DCF (C,D) and 5OH-DCF (E,F) molecular ions in negative electrospray ion mode (ESI-). The red insets show the fragments of interest.

### 1.1.2. Phase I - Oxidative metabolism – Hydroxylation

Three metabolites, i.e. M13, M14 and M17, presented an  $m/z$  of 310.0033 in ESI-. The mass shift with DCF mass corresponded to the RH to ROH structure transformation, which could hypothetically correspond to mono-hydroxylated DCF (mass error ranging from 2.90 to 3.30 ppm). The M/M+2/M+4 diagnostic pattern was observed for these metabolites (Figs. S18A, S19A and S22A). Fragments were noted at  $m/z$  266, 230 and 194, depending on the metabolite, which corresponded to a CO<sub>2</sub> loss, followed by two HCl losses. These fragments were consistent with fragmentation of the parent compound. M14 and M17 signals were assigned to 5-hydroxydiclofenac (5OH-DCF) and 4'-hydroxydiclofenac (4'OH-DCF), respectively, based on the Rt of analytical standards (21.67 and 21.90 min). In addition, the isotopic pattern of 4'OH-DCF and 5OH-DCF analytical standards (Fig. 1C and E) and the fragmentation pattern (Fig. 1D and F) were similar to those observed in the samples, therefore strongly implying that these metabolite identifications were correct. The nomenclature used to differentiate hydroxylation positions on the phenolic rings is highlighted in Fig. 2. 4'OH-DCF and 5OH-DCF concentrations in snail tissues were quantified at 7.77 and 0.30 mg/kg dw on day 3 and 15.83 and 0.36 mg/kg dw on day 7, respectively (Table 1). 4'OH-DCF and 5OH-DCF were already reported for DCF metabolism in aquatic species (Bonnefille et al., 2017; Fu et al., 2020; Kallio et al., 2010). The third mono-hydroxylated metabolite highlighted, i.e. M13, was hypothetically associated with 3'-hydroxydiclofenac (3'OH-DCF) based on previous reports. Indeed, this metabolite has been described in humans, baboons and rhesus monkeys with the same fragments in ESI- (Stierlin et al., 1979; Stierlin and Faigle, 1979; Wiesenberg-Boettcher et al., 1991). However, the hydroxyl group could be in other positions on the benzene cycles or on the nitrogen.

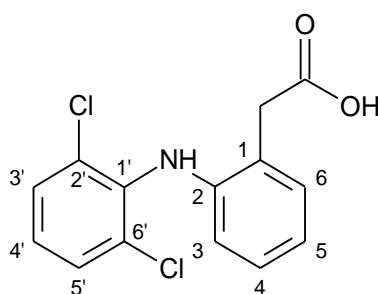


Fig. 2 – Structure of diclofenac and associated carbon numbering

Potential dihydroxylated metabolites M5, M6 and M9 were also observed at 17.50, 17.74 and 18.62 min Rt in ESI- ( $m/z$  325.9982, mass error ranging from 3.30 to 4.13 ppm). These metabolites were minor components and M+4 of the diagnostic isotopic pattern was not observed. Fragmentation revealed a fragment at  $m/z$  282 for all three metabolites, corresponding to a CO<sub>2</sub> loss, as observed for the parent compound (Figs. S10B, S11B and S14B). Two dihydroxylated metabolites, i.e. 4'5-dihydroxydiclofenac and N,5-dihydroxydiclofenac, have been previously reported in mammals (Bort et al., 1999b, 1999a; De Bartolo et al., 2006; Sarda et al., 2012; Stierlin et al., 1979; Stierlin and Faigle,

1979). Based on the observed hydroxylated metabolites, the 3<sup>rd</sup> dihydroxylated metabolite could be the 3'5-dihydroxydiclofenac, however it has never been reported and therefore could not be compared to previous data. We were not certain of the position of the hydroxyls groups since no further MS/MS data could be exploited due to the low abundance of these metabolites.

### 1.1.3. Phase I - Oxidative decarboxylation

The analysis also revealed probable oxidative decarboxylation followed by re-oxidation, leading to a CH<sub>2</sub> loss compared to the parent structure. This process, giving a benzoic acid function instead of the carboxylic acid function, was reported in mice by Sarda et al. (2012), with benzoic acid conjugates observed. The benzoic acid DCF is formulated as C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>, which was in line with the M19 metabolite observed at 23.01 min Rt in ESI+ (*m/z* 282.0088, mass error 1.70 ppm). Only a M/M+2 isotopic pattern was observed, which was not surprising regarding the low abundance of this metabolite (Fig. S24A). Fragmentation revealed 4 fragments: *m/z* 264 (-H<sub>2</sub>O), *m/z* 247 (-Cl), *m/z* 230 (*m/z* 247-OH), *m/z* 201 (*m/z* 264-CO,Cl) (Fig. S24B). Benzoic acid DCF has also been reported to be a transformation product in water (Jewell et al., 2016) in ESI+, revealing a major fragment of *m/z* 329, yet this was not observed in the present study, as well as fragments at *m/z* 264 and *m/z* 201, as noted in our study. We could hypothesize that the fragmentation differed due to the use of a Q-TOF mass spectrometer, which is often equipped with collision-induced dissociation (CID), unlike our equipment which is based on high energy collision dissociation (HCD).

Two potential metabolites, i.e. M10 and M12, were attributed to two hydroxylated benzoic acid DCF based on their *m/z* of 296 in ESI- (mass error 3.99–4.26 ppm) and 298 in ESI+ (mass error 0.08 ppm). The M/M+2/M+4 diagnostic pattern was highlighted in ESI- (Figs. S15A and S17A). M10 and M12 fragments in ESI- were *m/z* 260, 224 and 196, corresponding to two HCl losses followed by a CO loss (Figs. S15B and S17B). A second CO loss was noted for M12 with a fragment observed at *m/z* 168. In ESI+, fragments were identified at *m/z* 280 (-H<sub>2</sub>O), *m/z* 245 (*m/z* 280-HCl) and *m/z* 184 (-CO<sub>2</sub>, -Cl<sub>2</sub>) for M10 and *m/z* 280 (-H<sub>2</sub>O), *m/z* 263 (-HCl), *m/z* 262 (-Cl), *m/z* 246 (*m/z* 262-OH) and *m/z* 184 (*m/z* 262 - CO<sub>2</sub>, -Cl) for M12 (Figs. S15D and S17D). M12 co-eluted with M13 (3'OH-DCF) but the signal abundances were not correlated (*r*<sup>2</sup><0.01) in the exposed samples and the observed fragments were different. Hydroxybenzoic acids were previously reported by Jewell et al. (2016) in the form of DCF transformation products in water. They reported a 4'-hydroxybenzoic acid DCF and a 5-hydroxybenzoic acid DCF, with the same fragmentation pattern for both. The main fragments noted in ESI+ by these authors were *m/z* 280, 245, 217 and 182. The fragmentation pattern of our metabolites differed, but was consistent with the DCF metabolite fragmentation pattern. The fragments did not enable us to determine the hydroxyl group location.

#### 1.1.4. Phase I - Lactam formation

The M18 metabolite eluted at 22.90 min was highlighted in ESI+ at  $m/z$  278. The mass shift with DCF mass corresponded to an H<sub>2</sub>O loss (mass error 1.42 ppm). Fragments were observed at  $m/z$  215 (-CO, Cl),  $m/z$  214 (-CO, -HCl),  $m/z$  208 (-Cl<sub>2</sub>) and  $m/z$  172 (-C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O) (Fig. S23B). These fragments were similar to those observed in water by Jewell et al. (2016) and corresponded to DCF-lactam. The fragment at  $m/z$  172 in ESI+ was reported to be typical of metabolites without hydroxylation on the chlorine-bearing ring, which is in line with the proposed structure (Jewell et al., 2016). In addition, metabolite M16, which eluted at 21.90 min, was observed in both ESI- and ESI+ mode at  $m/z$  292 and 294, respectively. This corresponded to an oxygen gain compared to the M18 metabolite. M16 could therefore be a hydroxy-DCF lactam. Regarding fragmentation in ESI-, fragments were observed at  $m/z$  256 (-HCl), 228 (256-CO), 220 (256-HCl), 212 (228-O) and 192 (220-CO) (Fig. S21B). In ESI+, fragments had  $m/z$  of 231 (-CO, Cl), 196 (231-Cl) and 181 (196-CH<sub>3</sub>) (Fig. S21D). These fragments have been reported in humans and mussels and were associated with a lactam dehydrate of hydroxy-DCF (Bonfille et al., 2017; Stülten et al., 2008). The M16 retention time was the same as that of 4'-OH-DCF (M17), and the signal abundances were not perfectly correlated but were close ( $r^2=0.85$ ). M16 and M17 fragments differed, but we could not exclude the possibility that M16 could be a fragment or adduct of 4'-OH-DCF (M17). The MS<sup>2</sup> fragmentation data was not sufficient to determine the position of the hydroxyl group.

#### 1.1.5. Phase I - Dehydrogenation

The M11 metabolite was highlighted at 21.05 min Rt in ESI+ at  $m/z$  310. This mass corresponded to a loss of two hydrogens and a gain of one oxygen (mass error 0.47 ppm), and was probably due to hydroxylation followed by dehydrogenation. This type of compound has been reported as being p-benzoquinone imine (QI) of hydroxylated diclofenac in plants, water, marine organisms and humans (Fu et al., 2020; Huber et al., 2016; Jewell et al., 2016). ESI+ fragmentation revealed a fragment at  $m/z$  292, probably due to H<sub>2</sub>O loss (Fig. S16B). This metabolite could be formed after M13 (putative 3'-OH-DCF), M14 (4'-OH-DCF) or M17 (5OH-DCF) formation. It was unlikely to be a QI of 3'-OH-DCF because it has never been previously reported to our knowledge. It was most probably a QI of 5OH-DCF based on the findings of previous studies and the fragmentation of this metabolite (Huber et al., 2016; Jewell et al., 2016), but we were unable to confirm this hypothesis. In addition, M7 and M8 metabolites, which eluted at 17.85 and 18.47, presented an  $m/z$  of 324 in ESI-. There was a mass shift of 16, with M11 probably being due to an oxygen gain. The MS<sup>2</sup> fragmentation pattern showed two fragments at  $m/z$  280 (-CO<sub>2</sub>) and  $m/z$  244 ( $m/z$  280-HCl) (Figs. S12B and S13B). The CO<sub>2</sub> loss followed by an HCl loss resembled the DCF fragmentation pattern. M7 and M8 could be hydroxylated derivatives of M11 (QI of OH-DCF) or dehydrogenated derivatives of M5, M6 and M9 (dihydroxy-DCF), generating a

hydroxylated p-benzoquinone imine of OH-DCF (OH-QI of OH-DCF). This hypothesis was not confirmed by literature as this is the first time these metabolites have been reported to our knowledge.

#### 1.1.6. Phase II – Conjugation

##### *Sulfatation*

M1 was detected in ESI- at 10.65 min, with an  $m/z$  of 256. The theoretical chemical formula attributed by XCalibur for [M-H]<sup>-</sup> was C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>S (mass error 2.14 ppm). In addition, one fragment at  $m/z$  175 was observed, corresponding to a sulfate loss (Fig. S6B). Regarding this information, we proposed that M1 is a derivative of 4'OH-DCF sulfate, hydrolyzed between nitrogen and phenylacetic acid. The 4'OH-DCF sulfate presence was not demonstrated by the suspect screening approach in this study. This metabolite has been reported in various species, such as mussels, fish and mice (Bonnetille et al., 2017; Kallio et al., 2010; Sarda et al., 2012), but a similar phenylacetic acid loss has never been previously highlighted in animals to our knowledge.

##### *Glucosidation*

M2, M3 and M4 ( $m/z$  472) were detected in ESI- at 15.55, 16.26 and 16.96 min Rt, respectively. The mass shift with OH-DCF was 178, consistent with the addition of hexose, which was most likely glucose. MS<sup>2</sup> fragmentation of M2 showed a glucose loss ( $m/z$  310) followed by a CO<sub>2</sub> ( $m/z$  266) and HCl ( $m/z$  230) loss (Figs. S7B, S8B and S9B). Similar fragments were observed for M3, without the  $m/z$  230 fragment. Interestingly, the M4 fragmentation pattern was different: there was first a CO<sub>2</sub> loss ( $m/z$  428) followed by a glucose loss ( $m/z$  266). Both 4' and 5OH-DCF glucose have been observed in mice and plants (Fu et al., 2017; Sarda et al., 2012). Glucose conjugation may occur on the carboxyl or the hydroxyl group. We hypothesized that the conjugation was more likely on the hydroxyl group, but we lacked information to confirm the hydroxyl position. In addition, the M4 fragmentation pattern indicated that glucose was not on the carboxyl function for this metabolite. The lack of information generated by the analyses did not enable us to formulate more precise hypotheses regarding the structures of these metabolites.

#### 1.1.7. Unassigned metabolite

The M15 metabolite has yet to be structurally identified. It was detected at  $m/z$  381 in ESI- and eluted at 21.70 min Rt. Although the retention time was close to that of 5OH-DCF Rt, the signal abundances were not correlated ( $r^2=0.03$ ). This metabolite was identified with a M/M+2 isotopic pattern, and was present in all exposed samples and absent from the control samples. The fragmentation pattern showed a CO<sub>2</sub> loss ( $m/z$  337) followed by an HCl loss ( $m/z$  301), like DCF (Fig. S20). Those observations were in line with a potential DCF metabolite structure, but we were unable



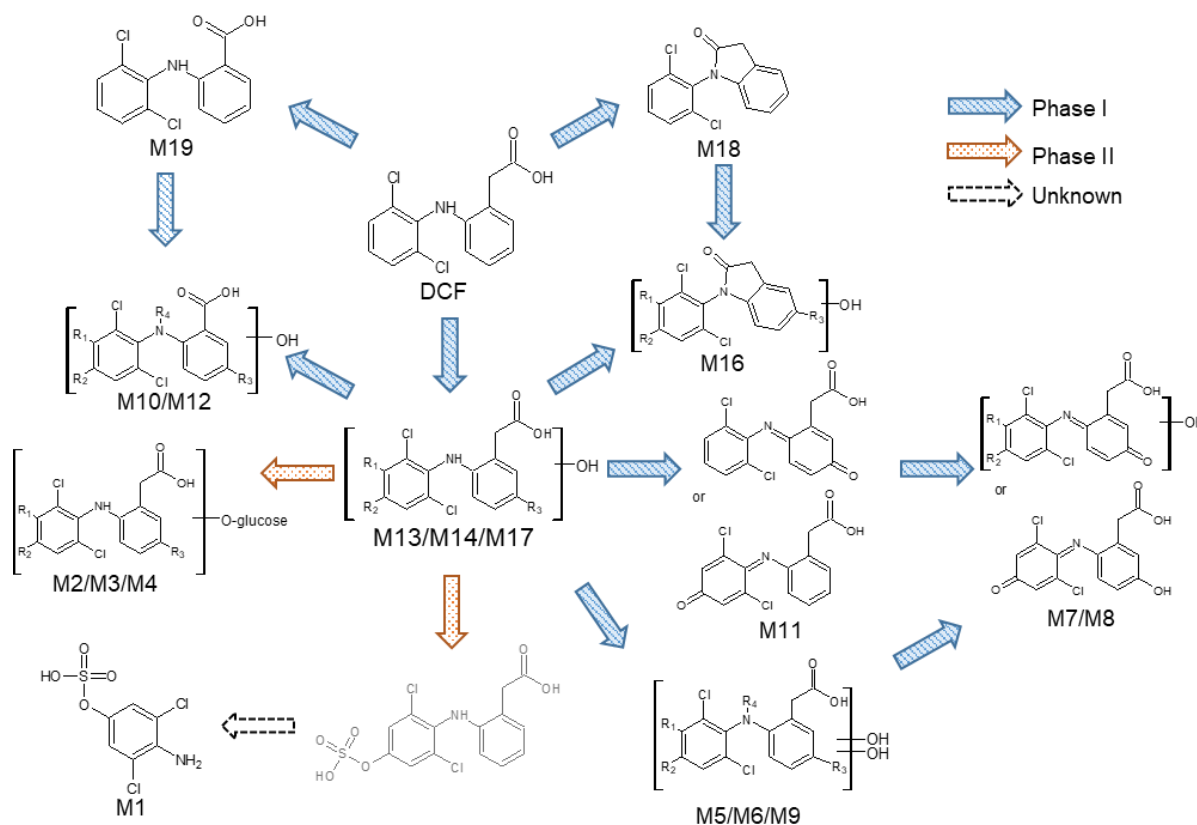
to come up with a formula for this compound. The parity mass change only allowed us to postulate on a change in the number of nitrogen atoms in the structure compared to DCF (nitrogen rule).

#### 4. Discussion

Bioconcentration depends on chemical uptake by the organism, as well as on chemical elimination via respiratory exchange, fecal egestion, growth dilution or metabolic biotransformation (Arnot and Gobas, 2006). DCF has not been found to be bioaccumulable in fish or freshwater crustaceans at similar exposure concentrations since the BCF ranged from 0.5 to 9 (ww) (Fu et al., 2020; Memmert et al., 2013; Nkoom et al., 2019). Similarly, the BCF values obtained in mussels ranged from 11 to 118.5 (dw) depending on the DCF concentration (100–600 µg/L) and exposure time (5–7 days) (Bonnefille et al., 2017; Świacka et al., 2021, 2019). The BCF values obtained in *L. stagnalis* were in line with those observed in other aquatic species and we concluded that there was little DCF bioconcentration in the tissues of this freshwater snail. In addition, BCF was lower at 7 days than at 3 days as the DCF concentration measured in tissues at day 3 (5.17 mg/kg) was higher compared to that at day 7 (2.89 mg/kg). Conversely, the 4'OH-DCF concentration was lower on day 3 (7.77 mg/kg) than on day 7 (15.83 mg/kg). The low BCF associated with the increased 4'OH-DCF concentrations in tissues indicated marked DCF metabolic transformation. Moreover, the metabolic transformation of DCF into hydroxylated metabolites appeared to be more substantial in snails than mussels. Indeed, after a 7 day exposure to 100 and 600 µg/L DCF concentrations, the 4'OH-DCF concentration in mussel tissues ranged from 89.0 to 178.6 µg/kg dw (7.77–15.83 mg/kg dw here), while the 5OH-DCF concentration ranged from 10.7 to 17.3 µg/kg dw (0.30–0.36 mg/kg dw here) (Bonnefille et al., 2017). In addition, signal abundances corresponding to OH-DCF glucose metabolites (M2, M3 and M4) were greater at day 7 than at day 3, thereby suggesting that metabolic transformation was higher in *L. stagnalis* compared to mussels. In the *H. azteca* freshwater crustacean, DCF transformation was also observed, with formation of the diclofenac taurine conjugate that reached concentrations 40 times higher than DCF in tissues (Fu et al., 2021). Yet DCF benzoic acid (M19) and OH-DCF benzoic acid (M10 and M12) were less detected at day 7 than at day 3 in this study (Table 2). Those compounds were previously assumed to be reaction intermediates that lead to more polar compound, which could explain their reduced abundance over time (Sarda et al., 2012). Unfortunately, we did not observe any benzoic acid DCF conjugates to support this hypothesis.

In this study, *L. stagnalis* snails were exposed to DCF concentrations higher than those detected in the environment so as to increase the possibility of minor metabolite detection. These concentrations remained low compared to reported LC50 in various aquatic invertebrates, which ranged from 2 to 216 mg.L<sup>-1</sup> depending on the exposure time (24h-21d) and the organisms (*Daphnia magna*, *Atyaephyra desmarestii*, *Hyaella azteca*, *Gammarus pulex*) (Du et al., 2015; Fu et al., 2020; Nieto et al., 2013). The

snail survival did not appear to be affected at this concentration. However, the metabolic pathways involved in the DCF detoxification could differ at environmental concentrations. Fourteen Phase I metabolites and 4 Phase II metabolites were identified in snail tissues. All metabolites had a lower retention time than DCF, thus supporting the hypothesis of the formation of more polar compounds. Based on the identified Phase I and Phase II metabolites, a possible DCF transformation pathway in *L. stagnalis* is presented in Fig. 3. M10, M12 (OH-DCF benzoic acids) and M16 (OH-DCF lactam) could be formed from hydroxylated intermediates (M13, M14 or M17) after oxidative decarboxylation (for M10 and M12) or intermolecular cyclization (for M16), or otherwise could be derived from M18 (DCF-lactam) or M19 (DCF benzoic acid) after hydroxylation. Similarly, M7 and M8 (OH-QI of OH-DCF) could be formed from M5, M6 or M9 (dihydroxy-DCF) after dehydrogenation, or from M11 (QI of OH-DCF) after hydroxylation.



**Fig. 3**– Proposed metabolic pathway of diclofenac in snail tissues. The metabolite shown in grey is a proposed intermediary metabolite that was not observed in this study. Blue arrows represent Phase I metabolism reactions, and orange arrows represent Phase II metabolism reactions. Dotted line arrows represent uncharacterized reactions.

In mammals, the DCF metabolism described includes direct conjugation (Grillo et al., 2003; Sarda et al., 2012; Stierlin and Faigle, 1979) and hydroxymethoxylation (Blum et al., 1996; Faigle et al., 1988), which were not observed in this study. In humans, DCF Phase I metabolism is performed by cytochrome P450 (CYP) complexes (Bort et al., 1999a). In aquatic organisms, the detoxification pathways observed are mostly hydroxylation and hydroxylation, followed by conjugation

(Sathishkumar et al., 2020). CYP enzymes were detected in *L. stagnalis*, with the identification of a specific family called CYP10 (Teunissen et al., 1992)—this CYP family, which has only been described in female gonadotropic hormone producing dorsal bodies, is involved in the hormone metabolism. (Teunissen et al., 1992). Furthermore, the CYP-based metabolic detoxification capacity of *L. stagnalis* has been shown in embryos exposed to the molluscicide metaldehyde (Hallett et al., 2016). The hydroxylations reported in this study could have been due to the CYP10 family, or other CYPs not yet described in *L. stagnalis*. One of the three hydroxylated metabolites (M13) and the three dihydroxylated metabolites (M5, M6 and M9) had never been previously described in aquatic organisms.

Few Phase II metabolites were identified in this study. The major Phase II metabolism observed was glucosidation (M3, M4, and M5), which has been demonstrated to predominate over glucuronidation in aquatic invertebrates (Livingstone, 1998). C-N bond cleavage—leading to the formation of the 4-amino-3,5-dichlorophenyl hydrogen sulfate (M1) metabolite—was reported before DCF degradation in bacteria (Ivshina et al., 2019). A 2,6-dichlorobenzoic acid was also noted in DCF metabolism in plants (Fu et al., 2017). Amino acid conjugates were not detected in this study although they have been documented in many species, including mussels (Bonafille et al., 2017). Similarly, although the presence of the glutathione-S-transferase (GST) enzyme has been observed in *L. stagnalis* (Wilbrink et al., 1991), the DCF glutathione conjugate was not found. The DCF metabolites that were not documented in this study could have been due to the possibility that: (i) their presence as minor metabolites was not detected by our method, (ii) the extraction or analytical method was unsuitable, or (iii) they are not formed in snail DCF metabolism. Our study was conducted under the same extraction and analytical conditions as that of Bonafille et al. (2017). We therefore could reasonably exclude hypothesis (ii) considering the non-observation of amino acid conjugates. Conversely, our analytical conditions were not suited for the glucuronide conjugate as the analytical standard was only detected at high concentrations. Further studies could thus be necessary to investigate the Phase II metabolism in the great pond snail.

To date, the DCF mechanism of action (MoA) reported in aquatic organisms is close to its MoA in humans, with inhibition of prostaglandin synthesis via cyclooxygenases (COX) (Bouly et al., 2021; Courant et al., 2018; Fu et al., 2021). The same MoA was reported for 5-, 3'- and 4'-hydroxydiclofenac metabolites in humans (Wiesenberg-Boettcher et al., 1991). A hepatotoxicity potential was also reported for 4'OH-DCF, 5OH-DCF and N,5-dihydroxydiclofenac in mammals (Lim et al., 2006; Syed et al., 2016). Quinone imine intermediates—formed spontaneously from 4'OH-DCF and 5OH-DCF—were suggested to have a high toxicity potential (Boelsterli, 2003; Gröning et al., 2007; Shen et al., 1999). Finally, the DCF methyl ester that has been documented in the metabolism of *H. azteca* and *G. pulex* showed a 430-fold increase in acute toxicity compared to DCF (Fu et al., 2020). Although DCF does not

accumulate in aquatic organisms, metabolites resulting from DCF biotransformation may therefore pose a similar and even a greater risk to non-target organisms.

## Conclusion

The combination of targeted and non-targeted approaches was successfully applied to study the biotransformation products of DCF in the great pond snail. The parent compound bioaccumulation was shown to be insignificant. Nineteen metabolites were detected, including some that were reported for the first time. Among these metabolites, 14 were Phase I metabolites and 4 were Phase II metabolites. The major Phase I biotransformation in *Lymnaea stagnalis* appeared to be hydroxylation, with the detection of 3 hydroxylated and 3 dihydroxylated metabolites. The main Phase II metabolism was glucosidation, with 3 gluco-conjugated metabolites being observed. In addition, intermolecular cyclization, oxidative decarboxylation and dehydrogenation were documented, with the presence of lactam, benzoic acid and benzoquinone imine metabolites. The findings of this study provide insight into the metabolism of freshwater snails, while enhancing our understanding of the adverse effects of pharmaceuticals on non-target organisms.

## Acknowledgement

The authors thank the Platform Of Non-Target Environmental Metabolomics (PONTEM) of the Montpellier Alliance for Metabolomics and Metabolism Analysis (MAMMA) consortium facilities.

## Statements & Declarations

**Funding:** This study was funded by a grant from Région Occitanie (Toulouse, France) and from Jean-François Champollion University Institute (Albi, France).

**Competing Interests:** The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

**Author contributions:** **Lucie Bouly:** conceptualization, investigation, formal analysis and writing.

**Hélène Fenet:** supervision and review. **Jean-Luc Carayon:** investigation and resources. **Elena Gomez:** project administration. **Florence Gérard:** supervision and review. **Frédérique Courant:** conceptualization, methodology, supervision and review.

## Ethics declarations

**Ethical approval:** Ethical approval is exempted in accordance with the European Union directive on the protection of animals used for scientific purposes.

**Consent to participate:** Not applicable.

**Consent to publish:** All authors agree to publish.

**Availability of data and materials:** Not applicable.

## References

- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barceló, D., 2015. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International* 85, 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.023>
- 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. *Science of The Total Environment* 669, 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>
- Arnot, J.A., Gobas, F.A., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14, 257–297. <https://doi.org/10.1139/a06-005>
- Atli, G., Grosell, M., 2016. Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure. *Aquatic Toxicology* 176, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.007>
- Baroudi, F., Al Alam, J., Fajloun, Z., Millet, M., 2020. Snail as sentinel organism for monitoring the environmental pollution; a review. *Ecological Indicators* 113, 106240. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106240>
- Blum, W., Faigle, J.W., Pfaar, U., Sallmann, A., 1996. Characterization of a novel diclofenac metabolite in human urine by capillary gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl* 685, 251–263. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(96\)00198-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(96)00198-3)
- Boelsterli, U.A., 2003. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192, 307–322. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00368-5](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00368-5)
- Bonnefille, B., Arpin-Pont, L., Gomez, E., Fenet, H., Courant, F., 2017. Metabolic profiling identification of metabolites formed in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) after diclofenac exposure. *Science of The Total Environment* 583, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.063>
- Bort, R., Macé, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M.-J., Pfeifer, A., Castell, J., 1999a. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochemical Pharmacology* 58, 787–796. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00167-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00167-7)
- Bort, R., Ponsoda, X., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J., Castell, J.V., 1999b. Diclofenac Toxicity to Hepatocytes: A Role for Drug Metabolism in Cell Toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 65–72.
- Bouly, L., Courant, F., Bonnafé, E., Carayon, J.-L., Malgouyres, J.-M., Vignet, C., Gomez, E., Gélet, F., Fenet, H., 2021. Long-term exposure to environmental diclofenac concentrations impairs growth and induces molecular changes in *Lymnaea stagnalis* freshwater snails. *Chemosphere* 133065. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133065>
- Courant, F., Arpin-Pont, L., Bonnefille, B., Vacher, S., Picot-Groz, M., Gomez, E., Fenet, H., 2018. Exposure of marine mussels to diclofenac: modulation of prostaglandin biosynthesis. *Environ Sci Pollut Res* 25, 6087–6094. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9228-6>
- De Bartolo, L., Morelli, S., Giorno, L., Campana, C., Rende, M., Salerno, S., Maida, S., Drioli, E., 2006. Polyethersulfone membrane biohybrid system using pig hepatocytes: Effect of diclofenac on cell biotransformation and synthetic functions. *Journal of Membrane Science* 278, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.11.005>
- Du, B., Haddad, S.P., Scott, W.C., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2015. Pharmaceutical bioaccumulation by periphyton and snails in an effluent-dependent stream during an extreme drought. *Chemosphere* 119, 927–934. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.044>
- Dumas, T., Boccard, J., Gomez, E., Fenet, H., Courant, F., 2020. Multifactorial Analysis of Environmental Metabolomic Data in Ecotoxicology: Wild Marine Mussel Exposed to WWTP Effluent as a Case Study. *Metabolites* 10, 269. <https://doi.org/10.3390/metabo10070269>
- Elangovan, R., White, K.N., McCrohan, C.R., 1997. Bioaccumulation of aluminium in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* at neutral pH. *Environmental Pollution* 96, 29–33. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00009-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00009-2)
- European Commission, 2015. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2015) 1756) Text with EEA relevance, OJ L.

- Faigle, J.W., Böttcher, I., Godbillon, J., Kriemler, H.P., Schlumpf, E., Schneider, W., Schweizer, A., Stierlin, H., Winkler, T., 1988. A new metabolite of diclofenac sodium in human plasma. *Xenobiotica* 18, 1191–1197. <https://doi.org/10.3109/00498258809042242>
- Fu, Q., Fedrizzi, D., Kosfeld, V., Schlechtriem, C., Ganz, V., Derrer, S., Rentsch, D., Hollender, J., 2020. Biotransformation Changes Bioaccumulation and Toxicity of Diclofenac in Aquatic Organisms. *Environ. Sci. Technol.* 54, 4400–4408. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07127>
- Fu, Q., Scheidegger, A., Laczko, E., Hollender, J., 2021. Metabolomic Profiling and Toxicokinetics Modeling to Assess the Effects of the Pharmaceutical Diclofenac in the Aquatic Invertebrate *Hyalella azteca*. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07887>
- Fu, Q., Ye, Q., Zhang, J., Richards, J., Borchardt, D., Gan, J., 2017. Diclofenac in Arabidopsis cells: Rapid formation of conjugates. *Environmental Pollution* 222, 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.022>
- Gnatyshyna, L., Falfushynska, H., Stoliar, O., Dallinger, R., 2020. Preliminary Study of Multiple Stress Response Reactions in the Pond Snail *Lymnaea stagnalis* Exposed to Trace Metals and a Thiocarbamate Fungicide at Environmentally Relevant Concentrations. *Arch Environ Contam Toxicol* 79, 89–100. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00728-9>
- Grillo, M.P., Hua, F., Knutson, C.G., Ware, J.A., Li, C., 2003. Mechanistic studies on the bioactivation of diclofenac: identification of diclofenac-S-acyl-glutathione in vitro in incubations with rat and human hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 16, 1410–1417. <https://doi.org/10.1021/tx034038b>
- Gröning, J., Held, C., Garten, C., Claußnitzer, U., Kaschabek, S.R., Schlömann, M., 2007. Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere* 69, 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.037>
- Grosell, M., Gerdes, R.M., Brix, K.V., 2006. Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates—*Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans*, and *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 97–104. <https://doi.org/10.1897/04-654R.1>
- Holman, J.D., Tabb, D.L., Mallick, P., 2014. Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass Spectrometry Data. *Current Protocols in Bioinformatics* 46, 13.24.1–13.24.9. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1324s46>
- Huber, C., Preis, M., Harvey, P.J., Grosse, S., Letzel, T., Schröder, P., 2016. Emerging pollutants and plants – Metabolic activation of diclofenac by peroxidases. *Chemosphere* 146, 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.059>
- Ivshina, I.B., Tyumina, E.A., Kuzmina, M.V., Vikhareva, E.V., 2019. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Sci Rep* 9, 9159. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45732-9>
- Jewell, K.S., Falås, P., Wick, A., Joss, A., Ternes, T.A., 2016. Transformation of diclofenac in hybrid biofilm-activated sludge processes. *Water Research* 105, 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.002>
- Kallio, J.-M., Lahti, M., Oikari, A., Kronberg, L., 2010. Metabolites of the Aquatic Pollutant Diclofenac in Fish Bile. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7213–7219. <https://doi.org/10.1021/es903402c>
- Lahti, M., Brozinski, J.-M., Jylhä, A., Kronberg, L., Oikari, A., 2011. Uptake from water, biotransformation, and biliary excretion of pharmaceuticals by rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 1403–1411. <https://doi.org/10.1002/etc.501>
- Lim, M.S., Lim, P.L.K., Gupta, R., Boelsterli, U.A., 2006. Critical role of free cytosolic calcium, but not uncoupling, in mitochondrial permeability transition and cell death induced by diclofenac oxidative metabolites in immortalized human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 322–331. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.09.012>
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 43–49. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9)
- Mehinto, A.C., Hill, E.M., Tyler, C.R., 2010. Uptake and Biological Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceutical Diclofenac in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 44, 2176–2182. <https://doi.org/10.1021/es903702m>
- Memmert, U., Peither, A., Burri, R., Weber, K., Schmidt, T., Sumpter, J.P., Hartmann, A., 2013. Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish. *Environ Toxicol Chem* 32, 442–452. <https://doi.org/10.1002/etc.2085>
- Ng, T.Y.-T., Pais, N.M., Wood, C.M., 2011. Mechanisms of waterborne Cu toxicity to the pond snail *Lymnaea stagnalis*: Physiology and Cu bioavailability. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1471–1479. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.010>



- Nieto, E., Blasco, J., González-Ortegón, E., Drake, P., Hampel, M., 2013. Is *Atyaephyra desmarestii* a useful candidate for lethal and sub-lethal toxicity tests on pharmaceutical compounds? *Journal of Hazardous Materials* 263, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.035>
- Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem* 387, 1225–1234. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1035-8>
- Niyogi, S., Brix, K.V., Grosell, M., 2014. Effects of chronic waterborne nickel exposure on growth, ion homeostasis, acid-base balance, and nickel uptake in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology* 150, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.012>
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Dong, H., Yang, H., 2019. Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res* 26, 5704–5712. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-04072-3>
- Sarda, S., C, P., K, P., T, S.-U., I, W., 2012. Diclofenac metabolism in the mouse: novel in vivo metabolites identified by high performance liquid chromatography coupled to linear ion trap mass spectrometry. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 42. <https://doi.org/10.3109/00498254.2011.607865>
- Sathishkumar, P., Meena, R.A.A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., Gu, F.L., 2020. Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of The Total Environment* 698, 134057. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134057>
- Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>
- Shen, S., Marchick, M.R., Davis, M.R., Doss, G.A., Pohl, L.R., 1999. Metabolic Activation of Diclofenac by Human Cytochrome P450 3A4: Role of 5-Hydroxydiclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 214–222. <https://doi.org/10.1021/tx9802365>
- Smith, C.A., Want, E.J., O’Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78, 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Stierlin, H., Faigle, J.W., 1979. Biotransformation of Diclofenac Sodium (Voltaren®) in Animals and in Man.: II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile. *Xenobiotica* 9, 611–621. <https://doi.org/10.3109/00498257909042328>
- Stierlin, H., Faigle, J.W., Sallmann, A., Kung, W., Richter, W.J., Kriemler, H.-P., Alt, K.O., Winkler, T., 1979. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren®) in animals and in man. *Xenobiotica* 9, 601–610. <https://doi.org/10.3109/00498257909042327>
- Stülten, D., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M., 2008. Isolation and characterization of a new human urinary metabolite of diclofenac applying LC–NMR–MS and high-resolution mass analyses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.01.024>
- Świacka, K., Smolarz, K., Maculewicz, J., Michnowska, A., Caban, M., 2021. Exposure of *Mytilus trossulus* to diclofenac and 4’-hydroxydiclofenac: Uptake, bioconcentration and mass balance for the evaluation of their environmental fate. *Science of The Total Environment* 791, 148172. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148172>
- Świacka, K., Szaniawska, A., Caban, M., 2019. Evaluation of bioconcentration and metabolism of diclofenac in mussels *Mytilus trossulus* - laboratory study. *Marine Pollution Bulletin* 141, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.050>
- Syed, M., Skonberg, C., Hansen, S.H., 2016. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicology in Vitro* 31, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.020>
- Tallarico, L. de F., 2016. Freshwater Gastropods as a Tool for Ecotoxicology Assessments in Latin America \*. *American Malacological Bulletin* 33, 330–336. <https://doi.org/10.4003/006.033.0220>
- Teunissen, Y., Geraerts, W.P.M., van Heerikhoizen, H., Planta, R.J., Joosse, J., 1992. Molecular Cloning of a cDNA Encoding a Member of a Novel Cytochrome P450 Family in the Mollusc *Lymnaea stagnalis*. *The Journal of Biochemistry* 112, 249–252. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123885>
- Walton, R.C., McCrohan, C.R., White, K.N., 2011. The use of complementary techniques in understanding the detoxification of aluminium in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis* 23, 4.
- Wiesenberg-Boettcher, I., Pfeilschifter, J., Schweizer, A., Sallmann, A., Wenk, P., 1991. Pharmacological properties of five diclofenac metabolites identified in human plasma. *Agents and Actions* 34, 135–137. <https://doi.org/10.1007/BF01993259>

- Wilbrink, M., van de Merbel, N.C., Vermeulen, N.P.E., 1991. Glutathione-5-transferase activity in the digestive gland of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 99, 185–189. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(91\)90098-E](https://doi.org/10.1016/0742-8413(91)90098-E)
- Zhang, Y., Geißen, S.-U., Carmen Gal, 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>
- Zhou, Y., Boudreau, D.M., Freedman, A.N., 2014. Trends in the use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the general U.S. population. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 23, 43–50. <https://doi.org/10.1002/pds.3463>





---

**CHAPITRE III : Evaluation des effets du diclofénac à long terme et à concentrations environnementales : une étude multi-omique et multigénérationnelle**

---



## I. Prérequis

### A. Détermination de la relation entre la taille de la coquille et le degré de maturité sexuelle

#### 1. Introduction

*Lymaea stagnalis* est un organisme protandre, chez lequel la maturité sexuelle mâle précède la maturité sexuelle femelle. La maturité sexuelle chez cette espèce a été décrite comme reliée à la taille des individus plutôt qu'à leur âge (Fodor et al., 2020). Un des objectifs de notre étude est d'évaluer l'impact du DCF sur les paramètres reproductifs. Dans le but de sélectionner précisément les individus pour les tests de reproduction, nous avons souhaité caractériser la taille de coquille à partir de laquelle les organes sexuels étaient matures. Dans ce but, nous avons réalisé des dissections afin d'observer la maturité des organes sexuels hermaphrodites, mâles et femelles, ainsi que la présence de spermatozoïdes.

#### 2. Matériel et méthodes

La longueur de la coquille des individus a été mesurée de l'apex jusqu'à l'ouverture avec un pied à coulisse (Fig. III-1). Trente-sept limnées ont été sélectionnées avec une taille allant de 14,04 à 20,57 mm.



Figure III-1 - Mesure de la longueur de coquille d'une limnée à l'aide d'un pied à coulisse électronique (photographies personnelles).

Les limnées ont ensuite été anesthésiées au froid puis disséquées pour observer la maturité des organes sexuels (Fig III-2). Les organes étudiés ont été :

- pour la partie hermaphrodite : l'ovotestis et les vésicules séminales
- pour la partie mâle : la prostate et le préputium
- pour la partie femelle : les glandes oothéciale, albumen et mucipare.

Un score a été attribué pour chaque organe : 0 (absence) ; 1 (présence de l'organe au stade précoce) et 2 (présence de l'organe mature).

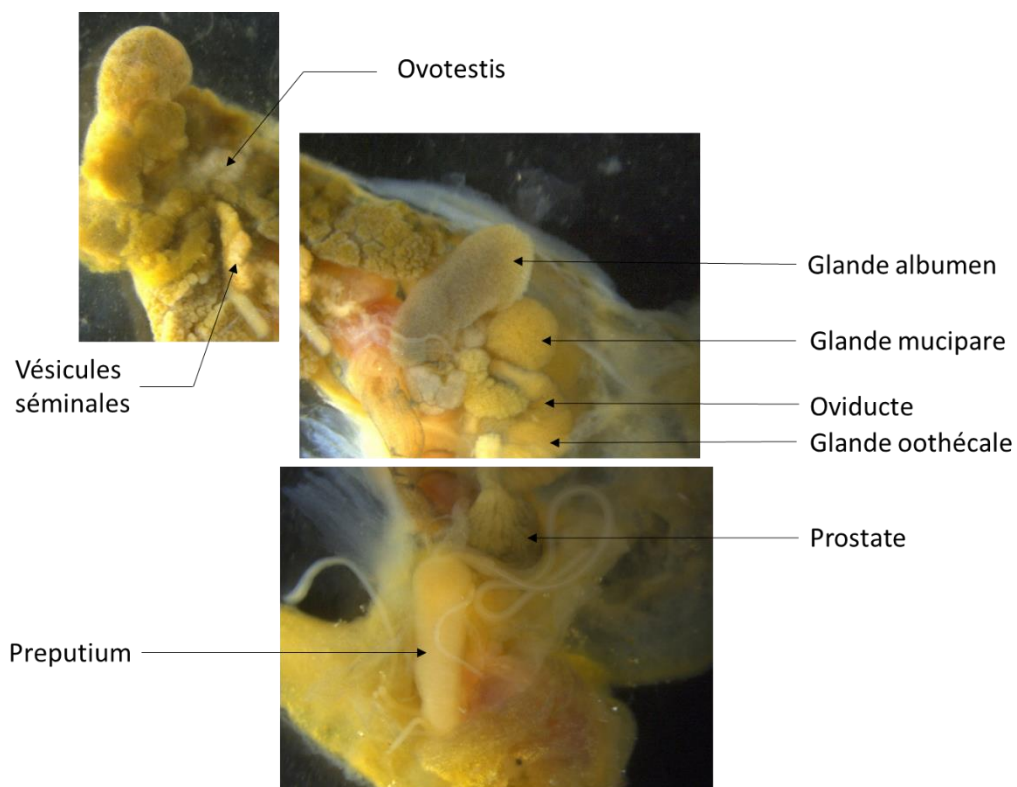


Figure III-2 – Photographies annotées du système reproducteur de la limnée prises sous loupe binoculaire.

La présence de spermatozoïdes dans les vésicules séminales a également été notée, après observation sur lame au microscope (Fig. III-3) (Leica DM-300). La présence des ovocytes n'a pas pu être observée.



Figure III-3 – Photographie de spermatozoïdes de *L. stagnalis* observés au microscope [x400].

### 3. Résultats et conclusion

Les résultats des dissections pour chaque gamme de taille ont été reportés dans le tableau III-

1. Le pourcentage d'individus présentant des organes matures (score 2) ou des spermatozoïdes dans les vésicules séminales y ont été inscrits.

Tableau III-1 – Pourcentage d'individus présentant les organes sexuels totalement formés (score 2) et la présence de spermatozoïdes pour chaque catégorie de taille de coquille.

Taille de la coquille (mm)	$\leq 15,5$	$15,5 > X \leq 16,5$	$16,5 > X \leq 17,5$	$17,5 > X \leq 18,5$	$18,5 > X \leq 19,5$	$> 19,5$
n	4	11	7	7	3	5
Ovotestis	25%	36%	86%	100%	66%	100%
Vésicules séminales	25%	63%	86%	100%	66%	100%
Prostate	50%	63%	100%	100%	100%	100%
Preputium	100%	72%	100%	100%	100%	100%
Glandes oothéciale, albumen, mucipare	0%	27%	71%	71%	66%	100%
Spermatozoïdes (lame)	50%	91%	100%	100%	100%	100%

Pour les individus de taille inférieure à 15,5 mm, la partie femelle de l'appareil reproducteur est totalement immature. La présence de spermatozoïdes est observée chez 50% des individus, alors même que les vésicules séminales et l'ovotestis ne sont complètement formés que chez 25% des organismes observés. La maturité sexuelle mâle commence aux alentours de la taille de 15,5 mm et semble totale à partir de la taille de 16,5 mm. Les organes hermaphrodites (ovotestis et vésicule séminales), s'ils sont présents chez tous les individus à partir de 15,5 mm, ne sont pas totalement formés. Ils sont certainement matures pour la production des gamètes mâles mais pas pour celle des gamètes femelles. Entre 18,5 et 19,5 mm, un seul individu présente des organes sexuels immatures. A partir de la taille de 19,5 mm, tous les organes sexuels sont bien présents et totalement formés. Pour la réalisation des tests de reproduction, les individus ont donc été systématiquement choisis avec une taille supérieure à 19,5 mm.

### B. Caractérisation de la locomotion au cours de la journée

#### 1. Introduction

*Lymnaea stagnalis* a été décrit comme un organisme préférentiellement actif la journée, et possédant un comportement semblable au sommeil, décrit comme une relaxation posturale du pied, du manteau et des tentacules pendant environ 20 min (Stephenson and Lewis, 2010). Cependant les variations de comportement de locomotion au cours de la journée n'ont pas été caractérisées.

L'objectif de cette étude a été de comparer le comportement locomoteur de la limnée le matin et l'après-midi, afin d'identifier si ce comportement diffère au cours de la journée.

## 2. Matériel et méthodes

Les individus ont été sélectionnés aléatoirement dans les aquariums d'élevage et la longueur de leur coquille a été mesurée de l'apex à l'ouverture. La locomotion de 16 individus a été étudiée le matin et celle de 16 autres l'individu l'après-midi. Ils ont été placés dans des boîtes de Pétri en verre de 14 cm de diamètre remplies avec 150 mL d'eau, permettant d'immerger totalement les organismes. Les déplacements des animaux ont été filmés (caméra Basler, acA 1300-60 gm, lens Kowa LMVZ4411) pendant 2 heures, les boîtes de Pétri étant disposées sur un plancher lumineux (Fig. III-4). La distance parcourue (mm) a été analysée avec le logiciel de comportement Ethovision XT (Noldus). Les tailles des animaux étant variées, les résultats ont été normalisés avec la longueur de la coquille (mm).

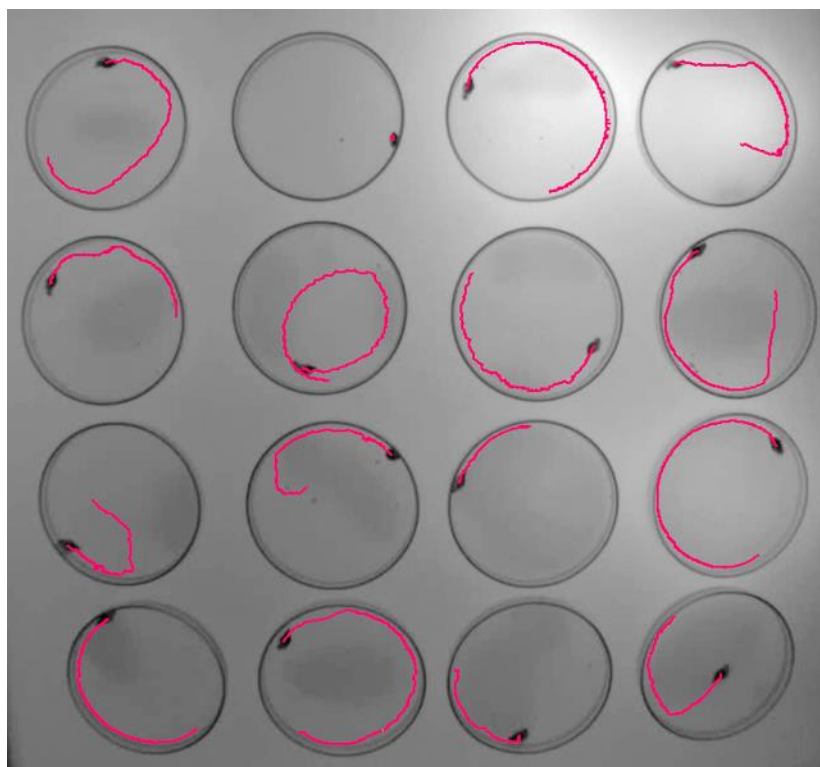


Figure III-4– Déplacement des animaux enregistré par Ethovision XT. 16 individus ont été étudiés par enregistrement, image filmée par caméra Basler acA 1300-60 gm, lens Kowa LMVZ4411.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec RStudio Version 1.3.1056, contenant R Version 4.1.0. Les conditions de normalité et d'homoscédasticité ont été vérifiées avec un test de Shapiro-Wilk et un test de Fisher, puis les différences entre les conditions ont été identifiées avec un test de Student. Les graphiques ont été construits avec GraphPad Prism Version 6.01.

### 3. Résultats et conclusion

Pendant le test de locomotion, deux individus se sont échappés (1 le matin, 1 l'après-midi) avant la fin des 2 heures de test. Ces individus ont été retirés des résultats. La distance moyenne parcourue en deux heures, normalisée par la taille des individus, a été comparée entre les animaux filmés le matin et ceux filmés l'après-midi, ne révélant pas de différence statistique entre ces deux périodes de la journée ( $t = 0.2166$ ,  $p\text{-value} = 0.8301$ ). L'observation des distances parcourues en 2 min, normalisées par la taille, tout au long du test de 2 h, montre que l'activité augmente progressivement pendant la 1<sup>ère</sup> heure puis se stabilise au cours de la 2<sup>ème</sup> heure (Fig. III-5A). La première heure semble donc être une période d'acclimatation.

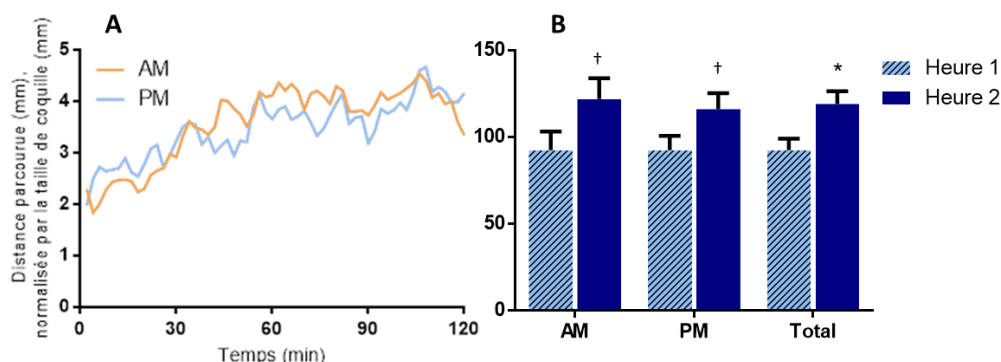


Figure III-5 – Distances parcourues par les limnées pendant le test de locomotion de 2h. A) Moyennes des distances parcourues (mm) en 2 min pendant 2 h, normalisées par la taille de la coquille (mm). B) Moyenne des distances totales parcourues (mm) en 1 h pendant l'heure 1 et l'heure 2, normalisées par la taille de la coquille. AM : matin ; PM : après-midi ; Total : pool des groupes matin et après-midi. \* $p < 0.05$ , † $p < 0.1$ , comparé à la distance parcourue pendant l'heure 1.

La distance moyenne parcourue en 1 h, normalisée par la taille de la coquille, a été comparée entre l'heure 1 et l'heure 2 du test chez les individus testés le matin et l'après-midi (Fig. III-5B). Une tendance à l'augmentation d'activité a été observée en deuxième heure pour le groupe testé le matin ( $t = -1.8366$ ,  $p\text{-value} = 0.0769$ ) et celui testé l'après-midi ( $t = -1.9068$ ,  $p\text{-value} = 0.0669$ ). Afin d'augmenter la puissance statistique, les données des deux groupes ont été poolées, mettant en évidence une augmentation statistiquement significative ( $t = -2.6612$ ,  $p\text{-value} = 0.0101$ ) de l'activité après une heure d'acclimatation.

En conclusion, aucune différence de l'activité locomotrice de *L. stagnalis* entre le matin et l'après-midi n'a été identifiée ici. Les études d'impact du DCF sur la fonction de locomotion réalisées dans la suite de cette étude ont donc été conduites indifféremment le matin ou l'après-midi. Un couvercle a été rajouté sur les boîtes de Pétri afin d'empêcher la fuite des individus durant le test. La durée de 2 h a été conservée, afin d'avoir une vision de la locomotion en phase d'acclimatation (heure 1) et en phase de stabilisation (heure 2).



## II. Synthèse

Comme décrit dans le chapitre I, la présence de DCF dans l'environnement aquatique a suscité un intérêt particulier ces dix dernières années. Son impact sur les organismes aquatiques a fait l'objet de nombreux travaux de recherche, mettant notamment en évidence un potentiel d'impact sur plusieurs paramètres, parmi lesquels la reproduction. Cependant, ces études ont été majoritairement conduites à concentrations élevées, largement supérieures aux concentrations environnementales, et sur des temps d'exposition courts. Le DCF étant un polluant aquatique pseudo-persistant, les organismes aquatiques sont susceptibles d'être au contact de cette molécule pendant toute la durée de leur cycle de vie, voire pendant plusieurs générations pour les espèces présentant un cycle de vie relativement court. De plus, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'induction des effets observés à l'échelle physiologique restent peu connus. Dans ce chapitre, nous avons choisi d'étudier les effets multigénérationnels d'une exposition au DCF à des concentrations environnementales (0,1 ; 2 et 10 µg/L), chez le gastéropode aquatique *Lymnaea stagnalis*. Ce chapitre est constitué de deux articles (articles n°2 et n°3) : l'objectif de l'article n°2 est l'évaluation de l'impact du DCF sur des paramètres d'histoire de vie (éclosion des pontes, croissance, reproduction), comportementaux (alimentation, locomotion, réponse au stress lumineux) et moléculaires (métabolome, transcriptome), après une exposition pendant tout le cycle de vie de l'organisme. Au regard des données de la littérature, nous avons émis l'hypothèse que la reproduction serait une fonction particulièrement touchée. Les approches moléculaires ont par conséquent été conduites au stade adulte sur les appareils reproducteurs, ainsi que les têtes, qui contiennent les ganglions neuronaux ayant un rôle important dans le contrôle de la reproduction. De plus, les approches métabolomiques conduites par le passé par Bonnefille et al. (2018) chez la moule ont montré un impact du DCF sur le métabolisme de la sérotonine, un neurotransmetteur impliqué dans le contrôle du comportement chez les invertébrés. L'objectif de l'article n°3 est l'évaluation des effets multigénérationnels du DCF sur la physiologie et le comportement de la limnée. Le DCF a en effet peu perturbé les paramètres physiologiques et comportementaux lors de l'étude sur la génération parentale, tandis qu'au niveau moléculaire des modulations avaient été mises en évidence. Nous avons par conséquent émis l'hypothèse que les modifications observées à l'échelle moléculaire pourraient être des marqueurs précoces d'impact, menant à une toxicité accrue au cours des générations.

L'exposition au DCF a été débutée au stade embryonnaire, sur des pontes issues de l'élevage de limnées du laboratoire. Elle a été réalisée en conditions statiques, avec renouvellement de l'eau tous les 7 jours. Les concentrations de DCF dans l'eau (0,1 ; 2 et 10 µg/L) ont été mesurées à J0 et à J7 tout au long de l'exposition par LC-UV. Concernant la génération parentale (F0), l'éclosion des pontes a été suivie, puis la croissance a été mesurée à 7, 10 et 14 semaines post-éclosion (spe), et un test de

reproduction de 28 jours, adapté du test de l'OCDE, a été réalisé à 16 spe (Fig. III-6) (OECD, 2016). La prise alimentaire (surface de salade consommée en 6h) a été évaluée à 8, 11 et 15 spe ; la locomotion (distance parcourue en 2h) et la réponse au stress lumineux ont été mesurées à 16 spe. Le métabolome des têtes et de l'appareil reproducteur a été exploré à 16 spe par LC-HRMS pour les contrôles et les exposés à 0,1 et 10 µg/L, avec une approche non ciblée. L'analyse transcriptomique a été réalisée à 17 spe sur les mêmes organes et aux mêmes concentrations que pour l'analyse métabolomique, avec un séquençage RNA-Seq sur la plateforme Illumina NovaSeq6000. Les générations suivantes (F1 et F2) ont également été exposées au DCF à partir du stade embryonnaire, dans les mêmes conditions que la génération parentale. Dans la génération F1, suite à un problème technique, nous avons dû différer les tests pour la condition d'exposition 0,1 µg/L. Par conséquent, la condition d'exposition 0,1 µg/L a été séparée des conditions 2 et 10 µg/L, ainsi que les contrôles associés. Ces conditions ont été resynchronisées à partir du stade juvénile de la génération F2. L'éclosion des pontes a été suivie puis les coquilles ont été mesurées à 8 et 16 spe. Le test de reproduction de 28 jours a été réalisé à 16 spe. La prise alimentaire a été évaluée à 16 spe et la locomotion et la réponse au stress lumineux à 17 spe. La durée totale d'exposition a été de 128 jours pour chaque génération.

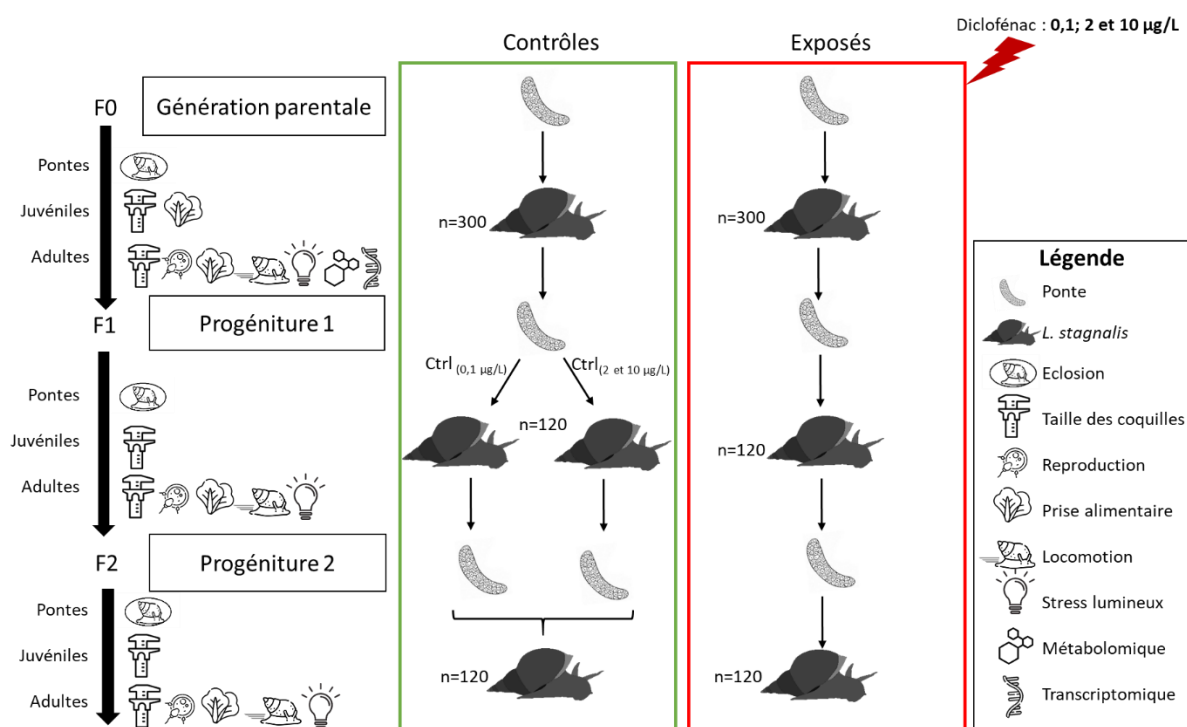


Figure III-6 – Design expérimental de l'exposition de *L. stagnalis* au diclofénac pendant 3 générations. Pour la génération parentale, l'exposition a commencé au stade embryonnaire, au premier jour de la ponte. Les paramètres d'histoire de vie (éclosion, tailles des coquilles, reproduction), comportementaux (locomotion, prise alimentaire, stress lumineux), et moléculaires (métabolomique, transcriptomique), ont été mesurés à divers stades du cycle de vie. Les expositions ont été poursuivies sur la descendance, avec des paramètres d'histoire de vie et comportementaux mesurés sur deux générations supplémentaires. Pour la génération F1, suite à un problème au stade juvénile pour le groupe exposé à 0,1 µg/L, les contrôles ont été scindés en deux puis repoolées après éclosion de la génération F2.

Dans la génération parentale, la croissance a été plus rapide chez les individus exposés que chez les contrôles, avec des tailles de coquilles plus grandes chez les exposés à 7 et 10 spe. Une fois l'âge adulte atteint (14 spe), plus aucune différence significative entre les tailles de coquilles n'a été observée. Le DCF a impacté la prise alimentaire des juvéniles (8 spe) à une concentration de 2 µg/L, avec une consommation de salade diminuée par rapport au contrôle. Aucun impact du DCF n'a été mis en évidence sur l'éclosion, la production des œufs, le comportement locomoteur et la réponse au stress lumineux sur la génération F0. Les métabolites modulés chez les individus exposés appartiennent majoritairement aux métabolismes des purines, des pyrimidines et des acides aminés. Les modulations du métabolisme des purines et pyrimidines, qui sont à la base de la synthèse de l'ADN, peuvent impacter le renouvellement et la réparation de l'ARN et de l'ADN. D'autres hypothèses ont également été formulées concernant ces composés : l'adénine et l'adénosine étant utilisées lors de la synthèse d'ATP, leur surmodulation (associée à une diminution des niveaux de carnitine et d'acétylcarnitine, impliquées dans la β-oxydation des acides gras) peut être une réaction à une demande d'énergie plus importante. La guanosine quant à elle, surmodulée dans les têtes, pourrait être une réponse à un effet neurotoxique induit par une augmentation des niveaux de glutamate. Les modulations des niveaux d'acides aminés (principalement à la hausse), quant à elles, peuvent être liées à une osmorégulation perturbée chez la limnée. Le métabolisme de l'acide arachidonique semble impacté également, avec des modulations des signaux correspondant probablement aux prostaglandines. Ces modulations sont probablement dues au mécanisme d'action du DCF, qui inhibe les cyclooxygénases (COX) synthétisant les prostaglandines. Les gènes différentiellement exprimés chez les exposés sont associés au contrôle du développement, à la réponse immunitaire, à la reproduction, au stress oxydant et à la neurogenèse. Ces résultats suggèrent un impact neurotoxique du DCF et l'induction d'un stress oxydant, ainsi que des modulations des métabolismes énergétiques. L'impact du DCF sur la reproduction a été observé au niveau moléculaire mais n'a pas été confirmé par un effet sur la production des œufs.

Les résultats de l'exposition du DCF sur les générations F1 et F2 ont montré un impact accru du DCF au cours du temps sur le comportement et la physiologie des limnées. Sur la génération F1, un effet opposé du DCF sur la croissance selon la concentration d'exposition a été observé. La prise alimentaire a été diminuée, l'activité locomotrice augmentée et les pontes produites contenaient moins d'œufs. Ces modifications semblent indiquer une stimulation de certaines fonctions (croissance, locomotion), pouvant conduire à une diminution de l'énergie allouée à d'autres fonctions (alimentation, reproduction). Un effet hormétique est suggéré, notamment au niveau de la croissance qui est plus rapide chez les organismes exposés à 0,1 µg/L et plus lente chez ceux exposés à 2 et 10 µg/L. Sur la génération F2, le DCF a surtout eu un impact stimulant, notamment à la concentration 10 µg/L, avec une éclosion et une croissance plus rapides, une consommation de salade accrue et la

production de plus de pontes par individu. Ceci pourrait indiquer une réponse au stress ayant pour but une maximisation de la fonction reproductive. Les fonctions impactées dans les générations F1 et F2 montrent l'importance des facteurs moléculaires comme marqueurs précoces d'effets, qui ne sont pas immédiatement traduits à l'échelle de l'organisme.

### III. Article 2

#### Long-term exposure to environmental diclofenac concentrations impairs growth and induces molecular changes in *Lymnaea stagnalis* freshwater snails

Lucie Bouly<sup>a,b</sup>, Frédérique Courant<sup>b,\*</sup>, Elsa Bonnafé<sup>a</sup>, Jean-Luc Carayon<sup>a</sup>, Jean-Michel Malgouyres<sup>a</sup>,  
Caroline Vignet<sup>a</sup>, Elena Gomez<sup>b</sup>, Florence Géret<sup>a</sup> and Hélène Fenet<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Albi, France

<sup>b</sup>HydroSciences Montpellier, University of Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France

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

Published in *Chemosphere*. 2021 Nov 27

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133065>

**Abstract:** As pharmaceutical substances are highly used in human and veterinary medicine and subsequently released in the environment, they represent emerging contaminants in the aquatic compartment. Diclofenac (DCF) is one of the most commonly detected pharmaceuticals in water and little research has been focused on its long-term effects on freshwater invertebrates. In this study, we assessed the chronic impacts of DCF on the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis* using life history, behavioral and molecular approaches. These organisms were exposed from the embryo to the adult stage to three environmentally relevant DCF concentrations (0.1, 2 and 10 µg/L). The results indicated that DCF impaired shell growth and feeding behavior at the juvenile stage, yet no impacts on hatching, locomotion and response to light stress were noted. The molecular findings (metabolomics and transcriptomic) suggested that DCF may disturb the immune system, energy metabolism, osmoregulation and redox balance. In addition, prostaglandin synthesis could potentially be inhibited by DCF exposure. The molecular findings revealed signs of reproduction impairment but this trend was not confirmed by the physiological tests. Combined omics tools provided complementary information and enabled us to gain further insight into DCF effects in freshwater organisms.

**Keywords:** NSAID, Gastropod, Pharmaceutical, Metabolomics, Gene expression

## 1. Introduction

Traces of pharmaceutical substances are regularly found in surface waters, with a lower detection threshold regarding the advances in analytical chemistry techniques (Ebele et al., 2017). A diverse range of pharmaceutical compounds, including nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), have been identified in freshwaters (Santos et al., 2010). Diclofenac (DCF) is one of the most commonly detected NSAIDs compounds in the aquatic environment at reported concentrations ranging from a few to several  $\mu\text{g/L}$  (Sathishkumar et al., 2020). DCF is often prescribed for human and veterinary care to treat acute pain and symptoms induced by chronic inflammatory diseases (McGettigan and Henry, 2013). When this compound is flushed into the wastewater sewage system, it may be partly removed via processing in conventional wastewater treatment plants (WWTPs), yet the removal efficiency is generally around 30% (Zhang et al., 2008). The presence of DCF—considered to be biologically active—in the aquatic environment has raised the issue of its potential impact on non-target organisms. Hence, DCF had been included for the 2015-2018 period in the list of priority substances identified under the EU Water Framework Directive (WFD) 2000/60/EC (surface water Watch List, European Commission, 2015), in order to determine the risk it may pose to the aquatic environment.

DCF, like many pharmaceuticals, may have effects on non-target species exposed in aquatic environments. Toxic concerns regarding DCF have been studied in laboratories using model organisms (polychaetes, crustaceans, mollusks and fish), and the findings have highlighted that even at low concentrations in the  $\mu\text{g/L}$  range, continuous exposure to this compound contributes to the disruption of many physiological processes in model organisms, vertebrates (Zebrafish, Medaka) and invertebrates (Daphnias, Mediterranean mussel) (Świacka et al., 2020). The main reported impacts of NSAIDs exposure in aquatic organisms were reproductive and locomotive disorders, teratogenicity, oxidative stress, body deformation and genotoxicity (Świacka et al., 2020). Reproductive effects and teratogenicity of DCF on aquatic species were documented in aquatic invertebrates at concentrations in the  $\mu\text{g/L}$  to  $\text{mg/L}$  range (Fontes et al., 2018; Lee et al., 2011; Mohd Zanuri et al., 2017; Munari et al., 2016). Behavioral studies have shown an impact of NSAIDs on locomotion in freshwater crustacean (De Lange et al., 2009). At the molecular level, oxidative stress induction has been reported in both vertebrate and invertebrate species, with changes in enzyme activity or in the expression of genes involved in antioxidant and detoxification pathways (Fu et al., 2021; Gonzalez-Rey and Bebianno, 2014; Guiloski et al., 2017; Liu et al., 2017; Schmidt et al., 2014, 2011). Metabolic disorders have also been reported, with DCF having an impact on metabolic pathways of *Mytilus galloprovincialis* and *Hyalella azteca* (Bonnefille et al., 2018; Fu et al., 2021). Physiological and behavioral assessments are needed to understand the sublethal impacts of DCF on aquatic organisms, in addition to “omics” techniques, which are highly efficient tools for studying detoxification mechanisms. Furthermore, the impacts of DCF exposure on freshwater invertebrates at environmentally relevant concentrations has barely been

explored to date. The reported effects of DCF on freshwater invertebrates at concentrations in the  $\mu\text{g/L}$  range included cyto- and genotoxicity in *D. magna* and *Dreissena polymorpha* (Liu et al., 2017; Parolini et al., 2011, 2009) and induction of an immune response in *Lymnaea stagnalis* (Boisseaux et al., 2017). These studies demonstrated a potential impact of DCF on lower organisms in the freshwater environment, but this has been less documented as no information is available on biochemical pathways and physiological processes.

The phylum Mollusca is a major constituent in aquatic ecosystems, and can represent 80% of the invertebrate biomass in some lentic systems (Mouthon, 1982). The latter are the ultimate recipient of many chemicals, which means that *L. stagnalis* snails are an ecological receptor of environmental contaminants (Amorim et al., 2019). Regarding the widespread presence of this snail in continental surface waters and their trophic position, it has been suggested that it could serve as an interesting model for ecotoxicological assessment (Amorim et al., 2019). This snail is a simultaneous hermaphrodite which can produce a high number of offspring, and it has thus been used as a functional tool in fertility and fecundity tests (Amorim et al., 2019). In addition, a standard test is available in which *L. stagnalis* is used as test organism for reproduction assessment in ecotoxicological studies (OECD, 2016). The genome of this organism has been sequenced (Coutellec et al., 2019), while the metabolome of *L. stagnalis* has been investigated by Tufi et al. (2015a and b).

Regarding the literature, we hypothesized that DCF could impair life history traits, as egg mass hatching, growth and reproduction, behaviors as feeding and locomotion, and could lead to oxidative stress at molecular level. The present study was conducted to assess the long-term impacts of relevant environmental concentrations of DCF (0.1, 2 and 10  $\mu\text{g/L}$ ) on *L. stagnalis* freshwater snails. These organisms were exposed throughout their life cycle (embryonic to adult stage) for a 128 days period using a combination of life history, behavior and molecular (transcriptomic and metabolomic) assessment approaches. Transcriptomic and metabolomic approaches were conducted using RNA-seq and liquid chromatography combined with high resolution mass spectrometry. Non-targeted approaches were preferred to highlight possible undocumented effects of DCF at molecular level, as well as the preconceived hypotheses. This is the first time that DCF exposure of an aquatic invertebrate is conducted at environmental concentrations on such long period. The approach of coupling phenotypic and molecular measurements is as well a novelty and may allow us to improve our understanding of the biochemical pathways affected by DCF exposure and fill current gaps in the literature.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Diclofenac (purity  $\geq 98\%$ , CAS number 15307-79-6) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Stock solutions of DCF were prepared at 2 mg/L in water and stored at 4 °C in opaque glass bottles. Analytical grade solvent hydrochloric acid (37%) was obtained from PanReac (Barcelona, Spain), HPLC grade trifluoroacetic acid was from VWR Chemicals (Leuven, Belgium) and hyper-grade acetonitrile for LC/MS was from Merck (Molsheim, France). Pesticide analytical-grade solvents (methanol, dichloromethane and ethanol) and LC/MS grade solvents (water, acetonitrile, formic acid 99%) were from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Ultrapure water was generated by a Simplicity UV system from Millipore (Bedford, MA, USA), with a specific resistance of 18.2 M $\Omega$ .cm, at 25 °C. Analytical pure standards used for identification at level one (Sumner et al., 2007) were obtained from the four following suppliers: Sigma-Aldrich (now part of Merck), Santa Cruz Biotechnology, Toronto Research Chemicals and LGC Standards.

### 2.2. Test organisms

*Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) were obtained from the IRSTEA Lyon laboratory (France). Adult genitors were acclimated in a controlled-temperature chamber (21 °C  $\pm$  1 °C) with a simulated natural summer photoperiod (16 h L: 8 h D) (Bohlken and Joosse, 1981). They were held in mineral water (calcium 45 mg/L, magnesium 4.2 mg/L, sodium 7.5 mg/L, potassium 4.5 mg/L, sulfate 9.5 mg/L, chloride 4.6 mg/L, nitrate <1 mg/L, bicarbonate 151.6 mg/L) and fed fresh organic lettuce 3 times/week. The water was renewed weekly during acclimatation and exposure. For the exposure experiments, egg masses (average 80 eggs/egg mass) were collected from 50 non-exposed adult genitors.

### 2.3. Diclofenac exposure

Exposure was conducted at three nominal DCF concentrations: 0.1, 2 and 10  $\mu\text{g/L}$ , prepared weekly in containers by diluting the stock solution in mineral water. For control and each exposure concentration (0.1, 2 and 10 DCF  $\mu\text{g/L}$ ), 15 egg masses were randomly placed in three containers (Fig. S-1). *L. stagnalis* snails were exposed throughout their life cycle, from the embryonic to the adult stage. At the beginning, static DCF exposure was performed in 1 L glass beakers with 300 mL of exposure medium. After hatching, snails (randomly selected) from a beaker were divided in 3 beakers with a total of 9 beakers/treatment concentration (40 snails/beaker; 360 snails/condition). At 7 weeks post-hatch (wph), snails were randomly assigned to two 30 L aquaria with 20 L of exposure medium, containing 150 snails each (300 snails/condition). *L. stagnalis* were fed boiled organic lettuce until 4 wph and were then fed fresh organic lettuce (Hoefnagel and Verberk, 2017). Dead snails were removed



every week and a final mortality rate was calculated at 14 wph. Snail mortality at 14 wph ranged from 12.5 to 22.5%, with no significant effects ( $p > 0.05$ ) of DCF treatment on mortality (Table 1). Chemical analyses of DCF in water are described in the Supplementary data, Section 1. The Mann-Whitney U-test was used to assess differences between DCF concentrations at day 0 and at day 7. DCF concentrations measured after renewal of the medium (day 0) were close to the nominal concentration (See Supplementary data, Table S-1). There were no statistical differences between days 0 and 7 for the 3 DCF concentrations (Mann-Whitney U-test,  $p > 0.05$ ).

## **2.4. Life history traits and behavioral test conditions**

### **2.4.1. Life history traits**

Egg mass hatching was monitored daily between days 8 and 18 after egg laying, with 12 egg masses monitored per condition. Egg masses with undeveloped embryos were discarded. Shell size was determined for the entire population ( $n=300/\text{condition}$ ) using a caliper to measure the distance between the shell aperture and apex at 7, 10 and 14 wph.

Reproduction tests were performed at 16 wph on 6 replicates of 5 individuals in 1 L beakers with 800 mL of exposure medium (30 snails/condition). Animals were chosen that had a homogeneous shell size ( $21.5 \pm 1.5$  mm) and they were allowed to acclimate for 3 days. This test was conducted over a 28 day period. Water was renewed weekly and egg masses were removed and counted daily. Shell sizes were measured at the end of the test. Endpoints were the number of egg masses/snail, number of eggs/egg mass and number of eggs/snail.

### **2.4.2. Behavioral test conditions**

Snail shell sizes (mm) and wet weight (mg) were noted before behavioral tests. Snails were gently dried on a paper towel before the wet weight measurements. Food intake was determined via feeding tests on randomly chosen snails at 8, 11 and 15 wph. Feeding tests were conducted on snails placed in individual exposure systems (32 snails/condition) with standardized lettuce disks (300 mm dia., 28.26 cm<sup>2</sup> area). Pictures were taken of the remaining lettuce (iPhone 6, Apple) on the top of the aquaria, while respecting same distance between the aquaria and the camera lense at each shot. The images were processed with Photoshop CS6 software according to the method described by Lebreton et al. (2021) and analyzed using ImajeJ software (National Institute of Health, version 1.52a). The consumed lettuce area after 6 h of feeding was calculated and normalized by snail wet weight, as described by Niyogi et al. (2014).

Locomotion behavior was monitored in 24 randomly sampled adult snails per condition at 16 wph. Snails were monitored for 2 h in petri dishes (140 mm dia.) containing 150 mL of exposure medium using EthoVision XT behavior software (Noldus, Wageningen, Netherlands) with a camera (Basler, acA

1300-60 gm, lens Kowa LMVZ4411). The average distance moved (in mm) in 2 h normalized by the snail wet weight (mg) was calculated. The stress response test was performed on the same individuals and under the same conditions as used in the locomotion tests. 24 animals per condition were filmed for 15 min with the light on, followed by 15 min in the dark, and 15 min with the light on. The average distance moved (mm) in each light condition (15 min), normalized by the snail wet weight (mg) was calculated.

#### 2.4.3. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with R. Studio 1.3.1056 software using a one-way analysis of variance (ANOVA), following a Shapiro-Wilk and a Bartlett test to confirm that the data met the parametric test assumptions. Differences were further analyzed with a multiple comparison Tukey test. A multiple comparison test after a non-parametric Kruskal-Wallis test (pgrimess R package) was used for data that had not fulfilled the normality and homoscedasticity assumptions.

### 2.5. Metabolomics study

#### 2.5.1. Tissue sample preparation

At 16 weeks post-hatch (wph), snails were anaesthetized by cold and dissected: 4 reproductive apparatuses (preputium, prostate, oviduct, seminal vesicles, albumen gland, oothecal gland and mucipareous gland) and 4 heads (cut just behind the tentacles, with cerebral ganglia inside) were pooled and placed in cryotubes and directly frozen in liquid nitrogen, before being stored at -80 °C. This resulted in 10 pools of 4 organs per condition and per organ. Snails were chosen with a 20-25 mm shell size after sexual maturity.

Samples were lyophilized for 3 days and crushed with a metal ball until a fine powder was obtained. Metabolomics studies were performed on control, 0.1 µg/L and 10 µg/L exposed snails. Considering the low mass of lyophilized organs, only pools containing sufficient tissue were used for the metabolomics approach.

15 mg dry weight ( $\pm 0.20$  mg) of pooled reproductive apparatus ( $n=8$  at 0.1 µg/L and  $n=9$  at 0 and 10 µg/L) were extracted with a biphasic mixture of methanol/dichloromethane/water (16:16:13 v/v/v) as described by Bonnefille et al. (2018) and Dumas et al. (2020). Samples were mixed with 120 µL of methanol and 37.5 µL of water and vortexed for 45 s. 120 µL of dichloromethane and 60 µL of water were added and then vortexed again for 45 s. After a 15 min rest at 4 °C, samples were centrifuged (2000 g; 15 min; 4 °C). 40 µL of supernatant (polar phase) were collected in a glass tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream. Samples were then reconstituted with 150 µL of water/acetonitrile (95:5; v/v) and filtered into vials with modified polyethersulfone membrane (VWR, cut off at 10 kDa) by centrifugation (10 min, 10 000 g). A quality control (QC) was prepared by pooling 40 µL of each

sample extract included in the experiment. 12 mg dry weight ( $\pm 0.20$  mg) of the pooled heads ( $n=9$  at  $0.1 \mu\text{g/L}$  and  $n=10$  at  $0$  and  $10 \mu\text{g/L}$ ) were extracted using the same protocol.

#### 2.5.2. Data acquisition

The reproductive apparatus injections were randomly performed on an Exactive Orbitrap LC-HRMS (Thermo Fisher Scientific) equipped with a heated electrospray ionization source (HESI). For LC separation, a reverse phase pentafluorophenylpropyl (PFPP) analytical column ( $100 \times 2.1$  mm;  $3 \mu\text{m}$  particle size; Sigma Aldrich) was used. The LC mobile phases were water (A) and acetonitrile (B), both modified with 0.1% formic acid. Each sample ( $10 \mu\text{L}$ ) was loaded onto the column with full loop injection. The flow rate was  $200 \mu\text{L}/\text{min}$  according to the following gradient system (A/B): 95/5 from 0 to 3 min, 60/40 at 8 min, 50/50 at 9 min, 30/70 at 13 min, 5/95 from 15 to 18 min, return to initial conditions at 21 min followed by a re-equilibration period (95/5) for 7 min (total run time, 28 min). The Exactive HRMS was tuned to a mass resolution of 25,000 (FWHM,  $m/z$  200) with a mass spectrum range of 50-750  $m/z$ . Samples were analyzed simultaneously in both positive and negative electrospray ionization modes (ESI+ and ESI-). The analyses were completed with a spray voltage of  $3.35 \text{ |kV|}$  a sheath gas flow rate of 55, auxiliary gas flow rate of 10, a capillary voltage of 43 V, a tube lens voltage of 90 V, and a skimmer voltage of 21 V, while the capillary temperature was  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  and the heater temperature was  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ .

The pooled head injections were randomly performed on the Q Exactive Focus Orbitrap LC-HRMS (Thermo Fisher Scientific), equipped with a heated electrospray ionization source (HESI). The LC conditions were the same as described for the reproductive apparatus. The Exactive HRMS was tuned to a mass resolution of 35,000 (FWHM,  $m/z$  200) with a mass spectrum range of 50-750  $m/z$ . Samples were analyzed simultaneously in both positive and negative electrospray ionization modes (ESI+ and ESI-) and acquired with the following parameters: spray voltage at  $3.35 \text{ |kV|}$ , sheath gas flow rate of 55, aux gas flow rate of 10, S-lens RF level of 50, while the capillary temperature was  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  and the heater temperature was  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 2.5.3. Quality control

A quality control (QC) corresponding to a pool of each sample extract, one per organ, was injected several times at the beginning of the analytical sequence to equilibrate the column, then QC injections were repeated every 7 sample injections in order to assess analytical repeatability and sensitivity of the acquisitions. The relative standard deviation (RSD) was calculated for each feature detected in the replicated QC injections. The analytical repeatability characterized by  $>70\%$  of the signals with a  $\text{RSD} < 30\%$  was considered acceptable (Want et al., 2010).

#### 2.5.4. Data processing

Data processing was identical on the reproductive apparatus and head samples. Raw data were converted into mzXML files with MSConvert freeware (ProteoWizard 3.0, Holman et al., 2014). A multi-step data processing strategy was applied, as described in Dumas et al. (2020). ESI+ and ESI- acquisitions were separately processed using the XCMS package (Smith et al., 2006) in the R environment. First, peak alignment was performed with peak grouping and retention time alignment to ensure that peaks for the same ion [ $m_i/z_i$ ] in all samples were detected at identical retention times ( $rt_i$ ). Secondly, the abundance of each feature was reflected by the peak integration, and feature abundances were compared between two groups based on a Welch t-test, showing statistically significant changes among the detected peaks. Thirdly, XCMS generate a table containing peak information and feature abundances in all samples. XCMS parameters were applied as follows for ESI- and ESI+:  $m/z$  interval was set at 0.01 and 0.002, the signal-to-noise ratio threshold was set at 10, the group bandwidth was set at 8, and the minimum fraction was set at 0.5. Raw data were visually inspected and features with a non-Gaussian chromatographic peak and with a RSD > 20% were discarded from the dataset.

#### 2.5.5. Statistical analysis

A Welch t-test was applied for the univariate statistical analysis to compare the exposed groups (0.1 and 10  $\mu\text{g/L}$  DCF) to the control group. Features with a p-value lower than 0.1 and an abundance ratio between exposed and control snails higher than 20% were selected. The rationale for choosing such a p-value threshold was based on: i) the low number of samples per group, which may lead to a low statistical power, and ii) the opportunity to reveal a biological modulation trend due to the exposure. Indeed, a trend ( $p < 0.1$ ) toward down- or up-modulation of several metabolites from the same pathway (highlighting a disruption in the biochemical cascade) may be more biologically relevant than a single marker metabolite ( $p < 0.05$ ). Even if the latter is statistically more powerful, a single metabolite is however not strong enough to accurately reveal an effect.

Multivariate statistical analyses were performed with MetaboAnalyst 5.0 online software using the MetaboAnalystR package. Datasets were log transformed and Pareto-scaled before principal component analysis (PCA) to assess clustering between samples.

#### 2.5.6. Metabolite annotation and identification

Metabolite annotation was performed based on the two confirmation levels described by Sumner et al. (2007), i.e. level 1 corresponds to annotation confirmed by injection of the analytical standard on the same analytical platform under the same conditions (validation based on both the accurate mass and retention time); while level 2 is characterized by metabolites putatively annotated on the

basis of public databases. Here metabolite annotation was performed by mass-matching with 0.002 Da precision using the online Human Metabolome Database tool (HMDB; <http://www.hmdb.ca>).

Identified and annotated metabolites were assigned to metabolic pathways according to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <http://www.kegg.jp>) and HMDB.

## 2.6. Transcriptomic

### 2.6.1. Tissue sample preparation and RNA extraction

At 17 wph, snails ( $22.5 \pm 1.5$  mm) were anaesthetized by cold and dissected. The same organs (reproductive apparatus and heads) were sampled as in the metabolomics study. Samples were frozen in 1 mL of TRIzol Reagent at  $-80$  °C. Before RNA extraction, samples were crushed and centrifuged for 15 min at  $4$  °C and  $3000$  g speed and lysates were collected. RNA extraction was performed as described by Lebreton et al. (2021).  $200$   $\mu$ L of chloroform isoamyllic acid was added to each sample, and the samples were then vortexed for 15 s and centrifuged for 15 min at  $4$  °C,  $12000$  g. Supernatants (aqueous phase) were collected in an Rnase-free tube, 96% ethanol (v/v) was added and the samples were purified on spin columns (Miniprep Kit, Quiagen) with centrifugation ( $8000$  g, 1 min,  $21$  °C). Samples were washed twice with  $450$   $\mu$ L sodium acetate 3M then once with  $320$   $\mu$ L 70% ethanol. RNA was eluted with  $30$   $\mu$ L of water and centrifuged for 2 min at  $8000$  g and treated with amplification grade DNase I (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

### 2.6.2. cDNA library preparation and Illumina sequencing

RNA-seq analysis was carried out on 3 pools of 2 reproductive apparatus and on 3 pools of 2 heads, on control,  $0.1$   $\mu$ g/L and  $10$   $\mu$ g/L exposed organisms. RNA concentration and quality were assessed using an Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and library preparation and sequencing was performed via the GeT-PlaGe GenoToul platform (INRAE, France). Before fragmentation, oligo d(T) beads were used to purify poly(A) mRNA from total RNA. RNA libraries were sequenced on the Illumina NovaSeq6000 platform on 2 lines.

### 2.6.3. RNA-seq data analyses

Data preprocessing, reference genome mapping (Coutellec et al., 2019) and transcript quantification were performed with the Nextflow v20.01.0 workflow manager (Di Tommaso et al., 2017; Lataretu and Hölzer, 2020). After log transformation and normalization of counting data with the TMM method (trimmed mean of M-values normalization method) (Robinson and Oshlack, 2010), a differential analysis was performed using a generalized linear model (GLM) (false discovery rate adjusted p-value  $< 0.05$ ; fold change  $> 2$ ), using the EdgeR package in the R environment. Differentially expressed genes (DEGs) were annotated on the Uniprot (Swiss-Prot) database, followed by a second

annotation on non-referenced proteins from the Uniprot TrEMBL database. Conserved regions of non-annotated sequences were determined using the PROSITE database (de Castro et al., 2006). Gene ontology (GO) enrichment was performed using QuickGo for GO annotation.

### 3. Results

#### 3.1. Effects of DCF exposure on life history and behavior parameters

No impacts on hatching rates of *Lymnaea stagnalis* egg masses exposed to DCF were observed (Fig. 1A). The shell size measurements during exposure revealed an impact of DCF on growth (Fig. 1B). Shell sizes were larger in all treatment groups at 7 wph ( $p < 0.001$ ), and at 10 wph (0.1  $\mu\text{g/L}$ :  $p < 0.05$ ; 2 and 10  $\mu\text{g/L}$ :  $p < 0.001$ ) compared to controls. This effect was no longer observed at 14 wph. Over the 28 day reproduction test, control snails produced an average of 3.83 egg masses/snail, 43.92 eggs/egg mass and 168.73 eggs/snail (Table 1). Hatching was evaluated, showing no differences between control and exposed egg mass (results not shown). The reproduction parameters did not significantly differ in DCF exposed organisms. No mortality was observed during the reproduction test (28 days).

Regarding the feeding test, lettuce area consumption was lower in the 2  $\mu\text{g/L}$  treatment group ( $p < 0.01$ ) at 8 wph, while no significant differences were found in the 0.1 and 10  $\mu\text{g/L}$  treatment groups, even though we did observe a downwards trend (Fig. 1C). Feeding was no longer impacted at 11 and 15 wph. During the locomotion test, the average distance travelled by control snails—normalized according to the wet weight—was 27.07 mm/mg (Table 1), and the distance travelled by exposed snails did not differ significantly from control. Locomotion in light stress conditions did not show any impact of DCF exposure (Fig.1D): regardless the treatment group, there was a reduction of activity in dark conditions, with an increase after the lightning was turned on.

Table 1 –Summary of mean diclofenac effects on mortality, locomotion and reproduction in *Lymnaea stagnalis*

DCF nominal concentration	Control	0.1 $\mu\text{g/L}$	2 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$
Mortality at 14 wph $\pm$ SD <sup>a</sup>	19.3 $\pm$ 3.0%	23.7 $\pm$ 2.5%	12.5 $\pm$ 0.5%	22.5 $\pm$ 4.8%
Reproduction test				
Egg masses/snail <sup>a</sup> (SEM)	3.83 (0.29)	3.83 (0.48)	3.57 (0.08)	3.03 (0.25)
Eggs/snail <sup>b</sup> (SEM)	168.73 (9.40)	172.67 (18.94)	149.47 (8.95)	133.00 (9.09)
Eggs/egg mass <sup>a</sup> (SEM)	43.92 (1.04)	45.53 (1.36)	41.82 (1.85)	44.26 (2.20)
Locomotion test				
Distance travelled in 2 h (mm), normalized with the snail wet weight (mg) <sup>a</sup> (SEM)	27.07 (2.85)	24.85 (2.48)	22.76 (2.86)	25.55 (3.99)

<sup>a</sup>Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$  in all treatment conditions; <sup>b</sup>ANOVA,  $p > 0.05$  in all treatment conditions, SD: standard deviation, SEM: standard error of the mean.

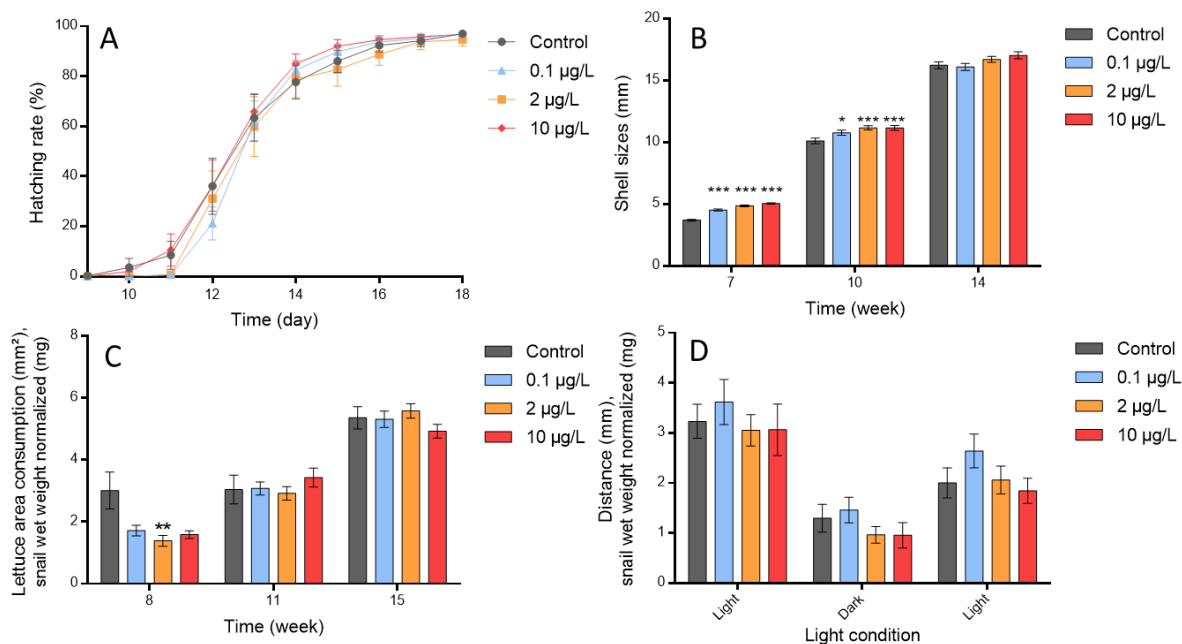


Figure 1 – Effects of diclofenac on life history and behavioral endpoints in *Lymnaea stagnalis*. Hatching rate of egg masses between days 9 and 18 (A), Snail shell sizes (mm) at 7, 10 and 14 weeks post-hatch (wph) (B), Lettuce area consumption normalized according to the wet weight of the snails (mm<sup>2</sup>/mg) at 8, 11 and 15 wph (C), Distance travelled normalized according to the wet weight of the snails (mm/mg) in response to light stress (15 min in light followed by 15 min in dark and 15 min in light) (D). Error bars represent  $\pm$  SE of the mean. Asterisks indicate significant differences between conditions (control vs treatment groups; Kruskal-Wallis). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

### 3.2. Metabolomics results

#### 3.2.1. Fingerprint overview

In both organs, more features were detected in positive (ESI+) (8643 in reproductive apparatus samples and 5218 in heads samples) than in negative (ESI-) electrospray ionization mode (4196 and 3908). Regarding the reproductive apparatus fingerprints, the percentages of ions with RSD < 30% in ESI- and ESI+ were 96% and 83%, respectively, thus confirming the analytical repeatability according to Want et al. (2010). Considering the heads fingerprints, the analytical repeatability was also acceptable with 78% of ions detected in ESI- and 69% of those detected in ESI+ with RSD QC < 30%.

Features were analytically selected based on RSD < 20%, a retention time (Rt) in the 65-1260 s range and on visual inspection of the extracted ion chromatograms. For both organs, repeatedly injected QC samples were grouped on the PCA score plot (Fig. 2A and 2B) based on selected features.



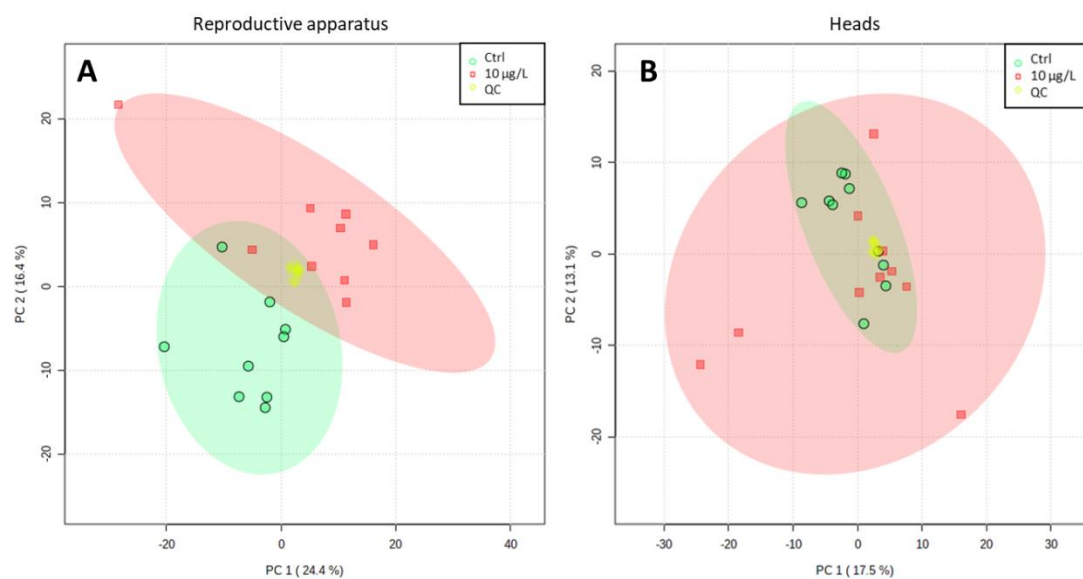


Figure 2 - PCA score plot of metabolic fingerprints from: A) reproductive apparatus and B) heads of control (green circle) and 10 µg/L DCF exposed (red square) snails; QC are represented with yellow diamonds. Data were log transformed and Pareto scaled. Ellipses are 95% confidence intervals.

### 3.2.2. *Lymnaea stagnalis* metabolome

Annotations were performed based on an internal database consisting of 282 compounds in order to acquire further information on *Lymnaea stagnalis* metabolomes, as previously explored by Tufi et al. (2015). Among these metabolites, 87 and 70 were confirmed (level 1 annotation according to Sumner et al. (2007) in reproductive apparatus and head samples, respectively. Most of the identified metabolites were derived from amino acid metabolism (37 and 30), while nucleotide (11 and 10) and carbohydrate metabolisms (18 and 12) were the other main forms represented.

28 metabolites were identified as specific to the reproductive apparatus and 11 metabolites were only identified in head samples (see Supplementary data, Table S-2.). Among the common metabolites, differences in abundance were observed between organs.

### 3.2.3. Molecular effects of DCF exposure

In both organs, as already mentioned, QC clustering on the PCA score plots revealed that the analytical variability was controlled. The biological variability of individuals appeared to be higher than the analytical variability. Metabolic fingerprints from the reproductive apparatus of control and 10 µg/L exposed snails showed a clustering pattern between control and exposed snails (Fig. 2A). Conversely, the PCA score plot obtained from head samples did not show a clear separation between control and DCF exposed snails (Fig. 2B), indicating that DCF exposure had a greater signature for the reproductive apparatus metabolome.

The univariate statistical results (Welch t-test) showed 595 modulated ions at 0.1 µg/L DCF ( $p < 0.1$ , abundance variation  $> 20\%$ ) and 1227 modulated ions at 10 µg/L DCF in the reproductive apparatus. In



head samples, univariate analysis provided 625 modulated ions at 0.1 µg/L DCF ( $p < 0.1$ , abundance variation  $> 20\%$ ) and 908 modulated ions at 10 µg/L. The number of modulated ions was higher in 10 µg/L exposed snails than in 0.1 µg/L DCF exposed snails, which seemed to show a concentration-effect relationship of DCF exposure.

#### 3.2.4. Metabolite modulation and pathway analysis

Identified and putatively annotated metabolites of interest ( $p < 0.1$ ; RSD  $< 20\%$ ; amplitude difference  $> 20\%$ ) in the reproductive apparatus and head samples are reported in Tables 2 and 3, respectively. A shift between the theoretical and observed masses of low molecular weight compounds was noticed in ESI- for reproductive apparatus injections, sometimes with a deviation of around 12 ppm (Table 2). However, this mass shift was also observed when pure analytical standards were injected. This mass shift was not observed for head samples since different analytical devices were used. This could also explain the differences in retention times observed for the same metabolite detected in both organs.

Thirteen metabolites from purine metabolism were significantly modulated by DCF exposure in reproductive apparatus or head samples. For example, adenine was observed in ESI+ and in ESI- and was up-modulated in the reproductive apparatus at 10 µg/L (+35%;  $p=0.072$  in ESI+; +36%;  $p=0.078$  in ESI-) and in head samples at 0.1 µg/L (+51%;  $p=0.004$  in ESI+; +46%;  $p=0.01$  in ESI-). Other Identified modulated metabolites were from pyrimidine metabolism (e.g. inosine, uridine), amino acid metabolism (e.g. homogentisic acid, tryptophan, serine, asparagine, proline) and other metabolisms (e.g. nicotinic acid, pyridoxal, carnitine). Modulation of prostaglandin related compounds was also demonstrated with level 2 annotations. Note that in the reproductive apparatus, the annotated prostaglandin signals did not correspond to prostaglandin  $D_2$ ,  $E_2$  or  $F_{2\alpha}$ . These compounds were identified at other retention times (and were not modulated).

# CHAPITRE III : Evaluation des effets du diclofénac à long terme et à concentrations environnementales : une étude multi-omique et multigénérationnelle

Table 2 – Metabolites modulated by all-life exposure to diclofenac (0.1 µg/L and 10 µg/L) in the *L. stagnalis* reproductive apparatus, considering metabolites with p < 0.1 (Welch)

Metabolism pathway	Metabolite	Rt (min)	Molecular ion species detected	Calculated mass	Observed mass	Mass difference (ppm)	RSD <sup>b</sup> %	Control vs 0.1 µg/L DCF		Control vs 10 µg/L		Annotation level <sup>a</sup>	
								Difference amplitude	p-value	Difference amplitude	p-value		
Purine metabolism	<i>Adenine<sup>d</sup></i>	2.96	[M+H] <sup>+</sup>	136.0618	136.0612	4	2.3	↗+27	0.19043	↗+35	0.07161	1	
		2.96	[M-H] <sup>-</sup>	134.0472	134.0460	9	2.3	↗+25	0.19724	↗+36	0.07752	1	
		<i>Hypoxanthine<sup>d</sup></i>	1.7	[M-H] <sup>-</sup>	135.0312	135.0300	9	5.0	↘-21	0.51012	↘-120	0.00652	1
		<i>Inosine<sup>d</sup></i>	1.85	[M+H] <sup>+</sup>	269.0880	269.0869	4	18.7	↗+117	0.01286	↗+417	0.00003	1
			1.85	[M-H] <sup>-</sup>	267.0735	267.0732	1	9.7	↗+50	0.01531	↗+283	0.00002	1
		<i>Xanthylic acid</i>	1.42	[M-H2O-H] <sup>-</sup>	345.0236	345.0230	2	1.4	/	0.16339	↗+28	0.01359	2
		<i>Glycineamideribotide</i>	1.89	[M-H2O-H] <sup>-</sup>	267.0382	267.0376	2	1.9	↗+804	0.12544	↗+2967	0.00106	2
		<i>5-Aminoimidazole</i>	1.17	[M+K] <sup>+</sup>	122.0115	122.0118	2	1.2	↗+38	0.02578	/	0.69402	2
		<i>Guanosine diphosphate</i>	1.87	[M+NH4] <sup>+</sup>	461.0582	461.0585	1	1.9	↗+184	0.00940	↗+594	0.00000	2
		<i>2,8-Dihydroxyadenine</i>	1.4	[M-H] <sup>-</sup>	166.0370	166.0362	5	1.4	↘-358	0.03486	↘-502	0.02672	2
Pyrimidine metabolism	<i>Uridine<sup>d</sup></i>	1.68	[M+H] <sup>+</sup>	245.0768	245.0770	1	17.4	↘-112	0.04780	↘-926	0.00182	1	
		1.68	[M-H] <sup>-</sup>	243.0622	243.0618	2	17.6	↘-65	0.04699	↘-199	0.00128	1	
		<i>dTDP</i>	1.7	[M+Na] <sup>+</sup>	425.0122	425.0139	4	8.4	↗+219	0.08565	↗+437	0.00002	2
		<i>Ureidopropionic acid<sup>d</sup></i>	1.3	[M-H] <sup>-</sup>	131.0462	131.0449	10	2.3	↘-37	0.07699	↘-36	0.10885	2
		<i>Malonate semialdehyde</i>	1.62	[M+NH4] <sup>+</sup>	106.0499	106.0493	5	12.1	↗+27	0.14667	↗+30	0.09752	2
		<i>dUDP</i>	1.57	[M+NH4] <sup>+</sup>	406.0411	406.0406	1	36.7	↗+892	0.22192	↗+2292	0.04428	2
Nicotinate and nicotinamide metabolism	<i>Fumaric acid<sup>c</sup></i>	2.09	[M-H] <sup>-</sup>	115.0037	115.0023	12	3.3	/	0.38747	↗+35	0.04793	1	
		2.5	[M+H] <sup>+</sup>	123.0553	123.0547	4	0.8	↘-64	0.10946	↘-106	0.02464	1	
		<i>Nicotinamide</i>	1.88	[M-H] <sup>-</sup>	122.0248	122.0234	11	7.3	↗+58	0.09457	↗+180	0.00023	1
		<i>Nicotinate β-D-ribose nucleotide</i>	1.68	[M+FA-H] <sup>-</sup>	380.0394	380.0408	4	6.1	↗+25	0.26771	↗+59	0.00033	2
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	<i>L-Glutamic acid<sup>cd</sup></i>	1.45	[M-H] <sup>-</sup>	146.0459	146.0446	9	3.0	/	0.33169	↗+31	0.02782	1	
		1.3	[M-H] <sup>-</sup>	131.0462	131.0449	10	2.3	↘-37	0.07699	↘-36	0.10885	2	
Tyrosine metabolism	<i>Oxoglutaric acid</i>	1.41	[M+FA-H] <sup>-</sup>	191.0197	191.0188	5	4.3	↘-88	0.02393	↘-46	0.13508	2	
		6.75	[M-H] <sup>-</sup>	167.0350	167.0338	7	2.3	↗+27	0.27351	↗+43	0.02196	1	
		6.7	[M-H] <sup>-</sup>	181.0506	181.0496	6	6.7	↗+29	0.33137	↗+46	0.04674	2	
Glycine, serine and threonine metabolism	<i>Gentisic acid</i>	8.75	[M-H] <sup>-</sup>	153.0193	153.0181	8	8.8	↘-32	0.07542	/	0.54458	2	
			<i>L-Serine<sup>d</sup></i>	1.32	[M+H] <sup>+</sup>	106.0499	106.0496	3	3.7	/	0.32445	↗+21	0.08634
Arginine biosynthesis	<i>L-Citrulline<sup>d</sup></i>	1.32	[M-H] <sup>-</sup>	104.0353	104.0341	12	2.2	/	0.46713	↗+15	0.06769	1	
		1.42	[M+H] <sup>+</sup>	176.1030	176.1022	5	4.7	/	0.76830	↗+26	0.06141	1	
Tryptophan metabolism	<i>L-Tryptophan<sup>cd</sup></i>	1.42	[M-H] <sup>-</sup>	174.0884	174.0875	5	3.8	/	0.77729	↗+27	0.06558	1	
		9.75	[M+H] <sup>+</sup>	205.0972	205.0965	3	2.2	/	0.66712	↗+49	0.04903	1	
		9.75	[M-H] <sup>-</sup>	203.0826	203.0819	3	2.4	/	0.55885	↗+73	0.03970	1	
Pentose phosphate pathway	<i>Serotonin</i>	9.01	[M+H] <sup>+</sup>	177.1022	177.1016	3	1.8	↘-30	0.07720	/	0.94585	1	
			<i>Gluconic acid<sup>d</sup></i>	1.11	[M-H] <sup>-</sup>	195.0510	195.0501	5	3.1	↗+26	0.19525	↗+52	0.00091
Vitamin B6 metabolism	<i>Pyridoxal</i>	3.71	[M+H] <sup>+</sup>	168.0655	168.0647	5	8.1	/	0.72666	↗+31	0.04869	1	
		3.71	[M-H] <sup>-</sup>	166.0499	166.0499	0	7.4	/	0.79280	↗+50	0.02824	1	
osmoprotective compound	<i>Proline betaine</i>	1.64	[M+H] <sup>+</sup>	144.1019	144.1012	5	7.4	↘-34	0.04894	↘-23	0.07403	1	
β-oxidation of very long chain fatty acids	<i>L-Acetylcarnitine</i>	6.14	[M+H] <sup>+</sup>	204.1230	204.1223	3	3.0	↘-55	0.02844	↗+18	0.68700	1	
		6.14	[M+FA-H] <sup>-</sup>	248.1140	248.1136	2	5.2	↘-58	0.05417	↗+28	0.62174	1	
		2.63	[M+FA-H] <sup>-</sup>	206.1034	206.1027	3	2.9	↘-35	0.01147	/	0.72889	1	
Biosynthesis of ophthalmic acid	<i>L-α-Aminobutyric acid</i>	1.67	[M+H] <sup>+</sup>	104.0706	104.0703	3	1.0	↘-59	0.00671	↘-158	0.00010	1	
Glycerophospholipid metabolism	<i>Glycerophosphorylcholine</i>	1.1	[M+H] <sup>+</sup>	258.1101	258.1090	4	1.7	↘-25	0.12672	↗+32	0.06284	1	
Amino sugar and nucleotide sugar	<i>N-Acetyl-D-glucosamine<sup>d</sup></i>	1.1	[M+Cl] <sup>-</sup>	256.0593	256.0591	1	7.4	/	0.67266	↗+23	0.09529	1	
Arachidonic acid metabolism	<i>PGF<sub>3α</sub> or PGH<sub>2</sub> or PGI<sub>2</sub> or TX A<sub>2</sub></i>	11.82	[M-H] <sup>-</sup>	351.2177	351.2176	0	4.8	↘-49	0.09289	↘-38	0.13354	2	
		11.40	[M-H] <sup>-</sup>	351.2177	351.2176	0	6.9	↘-26	0.03135	/	0.86811	2	
		12.50	[M-H] <sup>-</sup>	351.2177	351.2177	0	5.9	↘-42	0.01339	↘-40	0.00262	2	
		<i>PGD<sub>1</sub> or PGE<sub>1</sub> or PGF<sub>2α</sub> or PGH<sub>1</sub></i>	11.73	[M-H] <sup>-</sup>	353.2333	353.2334	0	1.1	↘-30	0.08544	/	0.87493	2
		<i>PGA<sub>2</sub> or PGB<sub>2</sub> or PGJ<sub>2</sub> or PGC<sub>2</sub></i>	12.66	[M-H] <sup>-</sup>	333.2071	333.2072	0	5.7	↘-34	0.09132	/	0.75044	2

Metabolites shown in italics had a p-value between 0.05 and 0.1 or were analytically less restrictive (RSD >20%) and may represent biologically relevant metabolites. PG: prostaglandin, TX: thromboxane <sup>a</sup>Based on the work of Sumner et al. (2007); <sup>b</sup> RSD : Relative standard deviation calculated for each feature detected in the quality control sample injected throughout the analytical sequence (analytical variability); <sup>c</sup> Belongs to several metabolic pathways; <sup>d</sup> Also modulated in head samples 3

# CHAPITRE III : Evaluation des effets du diclofénac à long terme et à concentrations environnementales : une étude multi-omique et multigénérationnelle

Table 3 - Metabolites modulated by all-life exposure to diclofenac (0.1 µg/L and 10 µg/L) in *L. stagnalis* head samples, considering metabolites with p < 0.1 (Welch)

Metabolism pathway	Metabolite	Rt (min)	Molecular ion species detected	Calculated mass	Observed mass	Mass difference (ppm)	RSD <sup>b</sup> %	Control vs 0.1 µg/L		Control vs 10 µg/L		Annotation level <sup>a</sup>
								Difference amplitude %	p-value	Difference amplitude %	p-value	
Purine metabolism	Adenine <sup>d</sup>	3.19	[M+H] <sup>+</sup>	136.06180	136.0617	1	7.6	↗+51	0.00372	/	0.38727	1
		3.19	[M-H] <sup>-</sup>	134.04720	134.0472	0	5.3	↗+46	0.01005	/	0.39161	1
	Adenosine	3.51	[M+H] <sup>+</sup>	268.10400	268.1039	0	7.5	↗+24	0.0162	↗+21	0.22691	1
		3.51	[M+FA-H] <sup>-</sup>	312.09500	312.0949	0	4.5	↗+29	0.00843	↗+23	0.24314	1
	Guanosine	2.12	[M+H] <sup>+</sup>	284.0989	284.0987	1	3.2	↗+37	0.00034	↗+21	0.08812	1
	Hypoxanthine <sup>d</sup>	1.95	[M+H] <sup>+</sup>	137.0458	137.0457	0	7.7	↗+45	0.00736	/	0.33596	1
	Inosine <sup>d</sup>	1.95	[M-H] <sup>-</sup>	267.0735	267.0736	0	3.4	↗+50	0.00588	↗+31	0.03136	1
	Xanthine	1.94	[M+H] <sup>+</sup>	153.0407	153.0406	1	11	↘-88	0.06298	↘-99	0.03721	1
		1.94	[M-H] <sup>-</sup>	151.0261	151.0261	0	4.2	↘-51	0.06557	↘-42	0.07069	1
		1.73	[M-H] <sup>-</sup>	166.0370	166.0369	1	6.1	↘-163	0.06958	↘-167	0.06381	2
Pyrimidine metabolism	Xanthosine	2.28	[M-H] <sup>-</sup>	283.0684	283.0686	1	8.4	↘-142	0.01039	↘-24	0.46168	2
	Uridine <sup>d</sup>	1.95	[M-H] <sup>-</sup>	243.0623	243.0622	0	5.1	↗+25	0.00494	/	0.37070	1
	Cytidine	2.91	[M+H] <sup>+</sup>	244.0928	244.0927	0	4.3	↗+41	0.01819	↘-30	0.12257	1
		2.91	[M-H] <sup>-</sup>	242.0782	242.0781	0	4.3	↗+49	0.04395	↘-38	0.14024	1
	Ureidopropionic acid <sup>d</sup>	1.46	[M-H] <sup>-</sup>	131.0462	131.0462	0	12.9	↘-46	0.05965	/	0.35690	2
Nicotinate and nicotinamide metabolism	Nicotinic acid <sup>d</sup>	2.01	[M+H] <sup>+</sup>	124.0393	124.0393	0	3.3	↗+52	0.00337	↗+42	0.00133	1
		2.01	[M-H] <sup>-</sup>	122.0248	122.0248	0	7.2	↗+46	0.00653	↗+40	0.00107	1
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	L-Glutamic acid <sup>cd</sup>	1.6	[M-H] <sup>-</sup>	146.0459	146.0458	1	1.5	↗+21	0.02930	/	0.27777	1
Tyrosine metabolism	Homogentisic acid	4.56	[M-H] <sup>-</sup>	167.0350	167.0349	0	5.4	↗+34	0.06904	↗+23	0.09372	1
	Gentisate aldehyde	9.65	[M-H] <sup>-</sup>	137.0244	137.0244	0	3.4	↗+27	0.01961	/	0.35400	2
		9.65	[M+FA-H] <sup>-</sup>	183.0299	183.0299	0	10.4	↗+30	0.02526	/	0.32830	2
	Gentisic acid	10.3	[M-H] <sup>-</sup>	153.0193	153.0193	0	1.9	/	0.36408	↘-41	0.00796	2
	Vanillylmandelic acid or 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)lactic acid or 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde	12.43	[M-H] <sup>-</sup>	197.0455	197.0454	1	2.7	/	0.48055	↘-26	0.08766	2
	Norepinephrine sulfate	8.65	[M+FA-H] <sup>-</sup>	294.0289	294.0299	3	6.5	↘-34	0.00243	↘-24	0.01711	2
Glycine, serine and threonine metabolism	L-Serine <sup>cd</sup>	1.47	[M-H] <sup>-</sup>	104.0353	104.0354	1	2.1	↗+22	0.00548	/	0.01387	1
	Glyceric acid	1.32	[M-H] <sup>-</sup>	105.0193	105.0194	0	5.9	/	0.00006	↗+28	0.00003	1
Tryptophan metabolism	L-Tryptophan <sup>cd</sup>	11.88	[M+H] <sup>+</sup>	205.0972	205.0973	0	4.7	↗+25	0.02574	↗+28	0.00190	1
		11.88	[M-H] <sup>-</sup>	203.0826	203.0826	0	4.9	↗+24	0.05390	↗+32	0.00160	1
Histidine metabolism	L-Histidine	2.4	[M+H] <sup>+</sup>	156.0768	156.0767	1	24.3	↗+47	0.01210	↗+20	0.15527	1
		2.4	[M-H] <sup>-</sup>	154.0622	154.0621	1	26.2	↗+48	0.02397	/	0.24212	1
Arginine and proline metabolism	L-Proline	1.62	[M+H] <sup>+</sup>	116.0706	116.0705	1	5.1	↗+21	0.04707	/	0.03020	1
	4-Hydroxyproline	1.38	[M+H] <sup>+</sup>	132.0655	132.0654	1	4.2	↗+35	0.07762	/	0.4035	1
		1.38	[M-H] <sup>-</sup>	130.051	130.0509	1	2.5	↗+37	0.05626	/	0.90283	1
Arginine biosynthesis	L-citrulline <sup>d</sup>	1.6	[M+H] <sup>+</sup>	176.1030	176.1028	1	5.8	↗+37	0.09130	↗+30	0.06979	1
		1.6	[M-H] <sup>-</sup>	174.0884	174.0884	0	11.3	↗+23	0.13837	↗+25	0.01563	1
Phenylalanine metabolism	L-Phenylalanine <sup>c</sup>	8.7	[M+H] <sup>+</sup>	166.0863	166.0862	1	3.6	↗+31	0.00680	↗+24	0.01869	1
Pentose phosphate pathway	Gluconic acid <sup>d</sup>	1.24	[M-H] <sup>-</sup>	195.0510	195.0511	0	2.7	↗+56	0.00216	↗+42	0.04436	1
Glutathione metabolism	Cysteinylglutathione disulfide	1.62	[M-H] <sup>-</sup>	425.0806	425.0806	0	9	↘-33	0.08854	↘-37	0.05260	1
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	N-Acetylmannosamine or N-acetyl-D-Glucosamine <sup>de</sup>	1.3	[M+FA-H] <sup>-</sup>	266.0881	266.0882	0	2.1	↗+40	0.00132	/	0.06104	1
Metabolite of GABA (lactam cyclization)	Pyrrrolidin-2-one	2.04	[M+H] <sup>+</sup>	86.0600	86.0599	2	15.6	↗+36	0.01932	↗+48	0.00135	1
Arachidonic acid metabolism	PGD <sub>2</sub> /PGE <sub>2</sub> <sup>f</sup>	13.3	[M-H] <sup>-</sup>	351.2177	351.2177	0	9.4	/	0.26705	↘-22	0.09678	1
	PGF <sub>3α</sub> or PGH <sub>2</sub> or PGI <sub>2</sub> or TX A <sub>2</sub> <sup>d</sup>	14.95	[M-H] <sup>-</sup>	351.2177	351.2177	0	25.7	↘-50	0.03245	↘-21	0.23267	2
	PGG <sub>2</sub>	14.68	[M-H] <sup>-</sup>	367.2126	367.2128	0	27.6	↗+61	0.05890	↗+52	0.08206	2

Metabolites shown in italics had a p-value between 0.05 and 0.1 and may represent biologically relevant metabolites. PG: prostaglandin, TX: thromboxane <sup>a</sup> Based on the study of Sumner et al. (2007); <sup>b</sup> RSD: relative standard deviation calculated for each feature detected in the quality control sample injected throughout the analytical sequence (analytical variability); <sup>c</sup> Belongs to several metabolic pathways; <sup>d</sup> Also modulated in the reproductive apparatus; <sup>e</sup> Compounds could not be separated in liquid chromatography;

### 3.3. Transcriptomic results

The RNA-seq analyses generated 150 bp paired-end reads, for a total of 1,893,106,342 reads. Differential analyses between the control and treated snails revealed 78 and 227 DEGs in reproductive apparatus and head samples, respectively (FDR-adjusted  $p < 0.05$ ;  $FC > 2$ ). Amongst all DEGs (293), 168 (57.3%) were successfully annotated on referenced proteins, 55 (18.8%) were annotated as unreviewed proteins and 70 (23.9%) remained unknown or uncharacterized. Within the unreviewed and unknown sequences, 28 presented conserved domains. Exhaustive lists of DEGs with their relative fold changes, p-values and corresponding annotations are reported in the Supplementary data, Table S-4 and S-5 for the reproductive apparatus and head samples, respectively. Conserved domains of unreviewed and unknown DEGs are reported in the Supplementary data, Table S-6. In the reproductive apparatus samples, the number of DEGs at 0.1  $\mu\text{g/L}$  (52 DEGs) and 10  $\mu\text{g/L}$  (44 DEGs) of DCF was nearly the same, with 18 DEGs common to both conditions. In the head samples, our analysis revealed more than 200 DEGs at 10  $\mu\text{g/L}$  of DCF and 64 DEGs at 0.1  $\mu\text{g/L}$ , with 47 DEGs common to both conditions (Fig. 3). Twelve DEGs (4% of the total DEGs) were common to the reproductive apparatus and head samples. Among these DEGs, 11 were successfully annotated. They coded for nitric oxide synthase (NOS), protein sneaky (SNKY), dynein heavy chain 1 (DNAH1), dorsal-ventral patterning tolloid-like protein 1 (TLL1), angiotensin-converting enzyme (ACE), thyrostimulin alpha-2 subunit, an Ig-like domain-containing protein, a calponin-homology (CH) domain-containing protein, barrier-to-autointegration factor (BAF), ubiquitin-60S ribosomal protein L40 and peroxisomal biogenesis factor 3 (Table S-4 and S-5).

The main biological functions of the DEGs were controlling development, the immune response, reproduction, oxidative stress and neurogenesis (Table 4). All DEGs and their functions are reported in the Supplementary data, Table S-7. Some were involved in many functions as ACE, which is associated with the immune response and reproduction in invertebrates (Salzet et al., 2001).

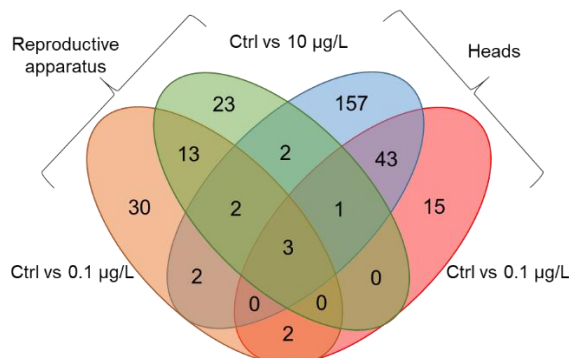


Figure 3- Venn diagram reporting the number of differentially expressed genes (GLM,  $FDR < 0.05$ ) for reproductive apparatus and head samples with comparisons among control and exposed groups.

Table 4 – Main functions impacted by DCF exposure according to the observed DEGs (over-expressed (↗) and under-expressed (↘)). Single DEGs could be involved in various functions.

Function	Number of DEGs (percentage of total DEGs)	Reproductive apparatus		Heads	
		Ctrl vs 0.1 µg/L	Ctrl vs 10 µg/L	Ctrl vs 0.1 µg/L	Ctrl vs 10 µg/L
Control of development	6 (2.0%)	2↗ 1↘	1↗	2↗ 2↘	3↗ 1↘
Immune response	17 (5.8%)	0	1↗	2↗ 2↘	10↗ 6↘
Reproduction	13 (4.4%)	4↗	5↗	3↗	7↗ 3↘
Oxidative stress	5 (1.7%)	0	1↗ 1↘	1↘	3↘
Neurogenesis	7 (2.4%)	0	0	1↗ 3↘	1↗ 6↘

## 4. Discussion

### 4.1. DCF effects on *L. stagnalis*: life history and behavior endpoints

Phenotypic effects of DCF were observed mostly on juvenile snails, with an increase in shell size and a decrease in feeding rate in exposed animals. To our knowledge, this is the first time that a growth increase has been noted after DCF exposure. An opposite trend has been reported, with a decrease in growth rate in amphibian larvae at DCF concentrations from 125 to 2000 µg/L, and in marine organisms as mussel and shrimp at 1 and 900 µg/L DCF, respectively (Ericson et al., 2010; González-Ortegón et al., 2013; Peltzer et al., 2019). The growth increase could be due to hormesis, where low concentrations of a contaminant could lead to a compensatory response in individuals, while high concentrations could inhibit processes and cause detrimental effects (Calabrese, 2008). Indeed, the reduction in growth reported in other species was generally observed at higher exposure concentrations, which seems consistent with a hormetic effect. Therefore, a study conducted on *Daphnia magna* exposed to the NSAID ibuprofen at low concentrations (4 µg/L) showed faster growth rates on the sixth generation exposed (Grzesiuk et al., 2020). This could indicate that a greater share of energy was allocated to growth in exposed organisms than in control. The altered feeding behavior observed in this study was similar to that observed in medaka fish after exposure to 1.0 mg/L DCF (Nassef et al., 2010) with an increased eating time. Unfortunately, transcriptomics and metabolomics studies were not conducted on the juvenile life stage, and molecular information obtained at the adult stage may not explain these observed impacts.

### 4.2. DCF effects on *L. stagnalis*: molecular endpoints

#### 4.2.1. *Lymnaea stagnalis* metabolome

The metabolome of *L. stagnalis* was little explored in the past. Tufi et al. (2015a, 2015b) reported information on albumen gland, central nervous system (CNS) and digestive gland metabolic profiles in *L. stagnalis*. 35 metabolites common to those reported by Tufi and 58 metabolites not

reported so far were identified in this study (Table S-2). Interestingly, pyruvate which was previously observed only in the albumen gland, was specifically highlighted in the reproductive apparatus in this study. In mammals, pyruvate was shown to be produced by follicular cells and have a role in oocyte maturation and aging inhibition (Donahue and Stern, 1968; Liu et al., 2009; Rieger and Loskutoff, 1994). This compound thus might be involved in *L. stagnalis* reproductive functions. Other differences in observed metabolites could be explained by differences in methodological protocols and organs explored.

#### 4.2.2. Hypotheses on biological effects of DCF

Among the metabolite alterations observed in this study, similarities with the findings of previous studies conducted on NSAIDs were observed. Serine and asparagine modulation was noted in *D. magna* exposed to ibuprofen (Kovacevic et al., 2016) and the tyrosin pathway was impacted in this study, as already demonstrated in mussels (Bonnefille et al., 2018). However, tryptophan metabolism seemed to be less altered in this study than in previous studies in mussels (Bonnefille et al., 2018). Osmoregulation was hypothesized to be an impaired function in mussels after DCF exposure (Bonnefille et al., 2018). Osmoregulation in freshwater mollusks is an important process with regard to their survival, as the salinity level in their body is higher than in the external medium (Oglesby, 1981). The free amino acid content was shown to be involved in osmoregulation in freshwater organisms (Hanson and Dietz, 2011; Matsushima et al., 1989). Here, amino acid levels were increased overall (tryptophan, serine, histidine, proline, phenylalanine, glutamic acid), which could have been the result of pressure modifications. In addition, proline betaine, i.e. a metabolite involved in the osmotic balance in marine organisms (Pierce and Rowland, 1988; Shinagawa et al., 1992), was decreased in the *L. stagnalis* reproductive apparatus in this study. Other compounds such as prostaglandin E and serotonin (also modulated in this study) were demonstrated to be involved in osmoregulation in freshwater bivalves (Evans, 2008; Ruggeri and Thoroughgood, 1985). To our knowledge, no studies on the osmoregulatory function of these compounds have been conducted on freshwater gastropods. Eades and Waring (2010) reported that environmental DCF concentrations (10 and 100 ng/L) have impacts on the hemolymph osmolality and osmolarity capacity in *Carcinus maenas* crabs. All of this information lead us to formulate the hypothesis of an alteration of osmoregulatory processes in *L. stagnalis* following DCF exposure.

Regarding the potential mode of action of DCF in great pond snails, the arachidonic acid pathway—with modulation of prostaglandin related signals—was found to be disturbed in the present study. Prostaglandin levels were already found to be down-modulated in marine invertebrates after DCF exposure (Courant et al., 2018; Fu et al., 2021), suggesting that DCF inhibits prostaglandin synthesis as its mode of action in humans. Indeed, in humans, the mechanism of action of DCF is the

inhibition of prostaglandin production *via* the inhibition of cyclooxygenase (COX) (Gan, 2010). Prostaglandins have been recognized as being involved in egg production in freshwater snails (Kunigelis and Saleuddin, 1986) and in reproduction in invertebrates (Stanley-Samuels, 1994; Wongprasert et al., 2006). Interestingly, the impact of DCF on prostaglandin-related metabolites was higher at the lowest concentration in the reproductive apparatus. In addition, *prostaglandin reductase 1* was shown to be specifically upregulated in this organ at the lowest concentration. This enzyme is responsible for the biological inactivation of prostaglandins, and contributes to ovarian development in giant tiger prawns, which are marine invertebrates (Prasertlux et al., 2011). Moreover, serotonin was down modulated in this specific organ at 0.1 µg/L concentration. The serotonergic system is involved in oviposition and the transmission of non-genetic information from mother to progeny in *Lymnaea stagnalis* (Ivashkin et al., 2015). It is also involved in egg laying in *Biomphalaria glabrata* freshwater snails (Muschamp and Fong, 2001). Prostaglandin and serotonin modulation could therefore have possibly resulted in reproduction impairment in our model. Several genes coding for proteins involved in reproduction were also differentially expressed, e.g. serine protease inhibitor, signal transducers, transcription activator, DNAH1, ACE, fibrous sheath interacting protein, ovulation prohormone taking part in various processes such as oogenesis, sperm motility and spermatogenesis. These genes involved in reproduction were identified in both organs, which is not surprising regarding the neuronal control of reproduction behavior. However, no effects of DCF on egg laying were demonstrated in this study. These molecular modulations may not be substantial enough to induce physiological effects. Sperm counting and motility were not assessed but could represent an interesting endpoint for further assessment of the detected negative effects of DCF on semen quality in mammals and marine invertebrates (Banihani, 2021; Mohd Zanuri et al., 2017). DCF has a similar mode of action (MoA) in mollusks and in humans regarding its impact on prostaglandin levels, including alteration of COX activation, while prostaglandin production is the main MoA for NSAIDs. However, another hypothetic pathway in humans that could explain the analgesic effects of DCF is activation of the L-arginine–nitric oxide–cGMP pathway (Gan, 2010). In our study, nitric oxide synthase (NOS) upregulation (all concentrations and organs) was observed. NOS is an enzyme that catalyzes nitric oxide (NO) production from L-arginine. NO levels were not measured, but L-citrulline—another product of this reaction—was found to be upmodulated in both organs. *NOS* overexpression and enhanced citrulline levels suggest that NO levels could also be increased by DCF exposure, and that DCF may activate a pathway in *L. stagnalis* that is similar to the L-arginine–NO–cGMP pathway in humans. In mollusks, it has been demonstrated that the NO-cGMP pathway has a function in mediating chemosensory activation of feeding (Elphick et al., 1995) and could have been involved in the altered feeding behavior of young snails in this study.



NOS and NO are also related to immunity processes in mollusks (Ottaviani, 2006). Sixteen DEGs involved in the immune system response were detected in this study, particularly with regard to innate immune responses (Table 4). *L. stagnalis* has a quasi-specific innate-like immune system, with circulating immunocompetent cells called hemocytes (Rowley and Powell, 2007). Boisseaux et al. (2017) reported that DCF has an impact on the hemocyte immunocapacity and efficiency in *L. stagnalis* after a 3 days exposure, which is characteristic of an inflammatory response. Inflammation was shown to be a conservative mechanism in mollusks and involved in the innate immune response (Barcia and Ramos-Martínez, 2008; Ottaviani et al., 1995; Rosani et al., 2015). In addition, DEGs coding for uncharacterized proteins were found to present conservative domains with an immunity function, like ankyrin repeat region profiles (GSLYST00003453001) (Picone et al., 2015), C-type lectin domain signature and profile (GSLYST00005882001) (Gorbushin and Borisova, 2015) and TNF family signature and profile (GSLYST00007116001) (Zhang et al., 2008). Our metabolomics results were in line with published results on inflammation since nicotinate and nicotinamide metabolism were disrupted. These compounds have been recognized to have anti-inflammatory properties in mammals (Godin et al., 2012). Furthermore, pyridoxal—the precursor of the pyridoxal 5'-phosphate (active form of vitamin B6)—is upmodulated after DCF exposure. This metabolite is also involved in inflammatory processes (Bird, 2018). Modifications in metabolites that have a function in inflammation lead us to hypothesize a modulation of the inflammatory balance in *L. stagnalis* after DCF exposure. The immune response is a high energy-demanding process and long-term impacts can lead to major trade-offs (Coyne, 2011). In addition, under stress conditions, the energy metabolism demand can be enhanced to ensure maintenance of the organism and other functions such as reproduction, growth or locomotion (Sokolova et al., 2012). Decreased carnitine and acetylcarnitine levels were observed in this study. They are known to be involved in fatty acid transport through the mitochondrial membrane and to play a key role in fatty acid  $\beta$ -oxidation, which in turn leads to ATP production. The carnitine shuttle pathway was also affected by DCF exposure in *H. azteca*, a freshwater crustacean, suggesting that DCF alters fatty acid  $\beta$ -oxidation in various species (Fu et al., 2021). Besides, levels of adenine and adenosine were increased and they may subsequently be used for ATP production. Those results suggest overactivation of energy metabolism to meet the energy demand. Faster juvenile snail growth could be an impact of this imbalance of energy modulation. Furthermore, we observed 6 DEGs involved in the control of development, including organ development and dorsal and ventral pattern formation. However, transcriptomic and metabolomics studies were conducted at the adult stage and a study focused on the juvenile stage could enhance our understanding of the molecular mechanisms modulated at this specific life stage.

Purine and pyrimidine metabolisms were particularly impacted here, i.e. mainly the modulation of nucleic base (adenine, hypoxanthine and xanthine) and nucleoside (adenosine,



guanosine, inosine, uridine and cytidine) levels. Although adenine and adenosine can be used to produce ATP, nucleic bases and nucleosides first and foremost support DNA synthesis, and modulations in the levels of these compounds could impact RNA and DNA repair and turnover. These purine and pyrimidine modulations have already been found in non-target species exposed to xenobiotics (Dumas et al., 2020; Sotto et al., 2017; Tufi et al., 2015b). In the present study, we noted that guanosine was specifically upmodulated in head samples, which suggested another potential function of this compound. Guanosine has been shown to be neuroprotective against excitotoxicity induced by glutamate, with the promotion of astrocyte glutamate uptake (Dal-Cim et al., 2019; dos Santos Frizzo et al., 2003). Indeed, glutamate has neurotoxic properties in vertebrates, mediated by overactivation of glutamatergic receptors (Granzotto et al., 2020). Glutamate was upmodulated in our study and the increased guanosine levels in head samples could be a response to glutamate toxicity in the CNS. To our knowledge, this is the first time that this effect has been reported in gastropoda. Moreover, 7 DEGs involved in neurogenesis were specifically identified in head samples, mainly with underexpression of those genes (Table 4). Neurogenesis disturbed processes could also be a consequence of the potential neurotoxic effect induced by DCF exposure.

We previously assumed that glutamic acid may have neurotoxic effects. Moreover, glutamic acid up-modulation may also be a response against oxidative stress, as already observed by Salyha and Salyha (2018) in rats. Regarding DEGs, five of them code for enzymes involved in oxidative stress and antioxidant responses, i.e. superoxide dismutase (SOD), peroxidase (PXD), dual oxidase 2 (DUOX2) and chorion peroxidase. The genes encoding these enzymes were mostly underexpressed in our study, and levels of cysteineglutathione disulfide, which is produced from glutathione (Bellomo et al., 1987), were decreased in head samples. These changes in enzyme, cysteineglutathione disulfide and glutamic acid levels in *L. stagnalis* after long-term DCF exposure suggest that this exposure cause a redox imbalance. Interestingly, Gonzalez-Rey and Bebianno (2014) documented enhancement of SOD and catalase activity in mussels after 3 days of exposure, followed by decreased activity after 15 days of exposure. Since we conducted a long-term study, the underexpression of genes encoding antioxidant enzymes that we noted was in line with published results. The redox imbalance may be caused by an antioxidant response activated to counteract enhanced ROS levels. This oxidative stress caused by DCF exposure was previously highlighted in several non-target species (fish, mussels) exposed to low DCF concentrations and it seems to be a common response to NSAIDs exposure (Ajima et al., 2021; Gonzalez-Rey and Bebianno, 2014; Trombini et al., 2019).

## Conclusion

*L. stagnalis* snails exposed to environmentally relevant DCF concentrations were affected during growth, with an increase in shell size in exposed snails and a decrease in feeding rate. No evidence of an impact was observed on other life history and behavioral parameters (hatching, locomotion, response to stress, reproduction). DCF seems to have similar molecular targets in mollusks and humans, with prostaglandins level modifications. Other molecular results suggest that DCF induces neurotoxicity and an oxidative stress response, along with energy metabolism modulation. Although no effects were observed on reproduction parameters explored in this study, we noted an impact on this function at the molecular level. Moreover, functions like osmoregulation and immunity could be impaired by DCF exposure, and further studies are needed to clarify this issue.

## Acknowledgement

This study was funded by a grant from Région Occitanie (Toulouse, France) (70%) and from Jean-François Champollion University Institute (Albi, France) (30%).

The authors thank the Platform Of Non-Target Environmental Metabolomics (PONTEM) platform of the Montpellier Alliance for Metabolomics and Metabolism Analysis (MAMMA) consortium facilities. We are grateful to Marie-Agnès Coutellec (INRAE, Rennes) for access to the *Lymnaea stagnalis* genome. We thank also Christophe Klopp of the GeT-PlaGe platform (GenoToul, Toulouse, France) for bioinformatics advice regarding the RNA-seq analysis.

## References

- Ajima, M.N.O., Kumar, K., Poojary, N., Pandey, P.K., 2021. Sublethal diclofenac induced oxidative stress, neurotoxicity, molecular responses and alters energy metabolism proteins in *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus*. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13899-2>
- 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. *Science of The Total Environment* 669, 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>
- Banihani, S.A., 2021. Effect of diclofenac on semen quality: A review. *Andrologia* 53, e14021. <https://doi.org/10.1111/and.14021>
- Barcia, R., Ramos-Martínez, J., 2008. Effects of interleukin-2 on nitric oxide production in molluscan innate immunity. *Invertebrate Survival Journal* 5.
- Bellomo, G., Mirabelli, F., DiMonte, D., Richelmi, P., Thor, H., Orrenius, C., Orrenius, S., 1987. Formation and reduction of glutathione-protein mixed disulfides during oxidative stress: A study with isolated hepatocytes and menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone). *Biochemical Pharmacology* 36, 1313–1320. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90087-6)
- Bird, R.P., 2018. The Emerging Role of Vitamin B6 in Inflammation and Carcinogenesis. *Adv Food Nutr Res* 83, 151–194. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.11.004>
- 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. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 4, 213–222. <https://doi.org/10.1080/01651269.1981.10553430>

- Boisseaux, P., Noury, P., Thomas, H., Garric, J., 2017. Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea stagnalis* under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: Diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.003>
- Bonnefille, B., Gomez, E., Alali, M., Rosain, D., Fenet, H., Courant, F., 2018. Metabolomics assessment of the effects of diclofenac exposure on *Mytilus galloprovincialis*: Potential effects on osmoregulation and reproduction. *Science of The Total Environment* 613–614, 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.146>
- Calabrese, E.J., 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1451–1474. <https://doi.org/10.1897/07-541.1>
- Courant, F., Arpin-Pont, L., Bonnefille, B., Vacher, S., Picot-Groz, M., Gomez, E., Fenet, H., 2018. Exposure of marine mussels to diclofenac: modulation of prostaglandin biosynthesis. *Environ Sci Pollut Res* 25, 6087–6094. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9228-6>
- Coutellec MA, et al. Reference genome of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*, a multidisciplinary invertebrate model: overall rationale of the STAGING project. In: Pearls of wisdom: synergising leadership and expertise in molluscan genomics, a Theo Murphy international scientific meeting by the Royal Society. Newport Pagnell: The Royal Society, Chicheley Hall; 2019 <https://royalsociety.org/science-events-and-lectures/2019/09/pearls-of-wisdom/>, n.d.
- Coyne, V.E., 2011. The importance of ATP in the immune system of molluscs. *ISJ-INVERT SURVIV J* 8, 48–55.
- Dal-Cim, T., Poluceno, G.G., Lanznaster, D., de Oliveira, K.A., Nedel, C.B., Tasca, C.I., 2019. Guanosine prevents oxidative damage and glutamate uptake impairment induced by oxygen/glucose deprivation in cortical astrocyte cultures: involvement of A1 and A2A adenosine receptors and PI3K, MEK, and PKC pathways. *Purinergic Signalling* 15, 465–476. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09679-w>
- de Castro, E., Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N., 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research* 34, W362–W365. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl124>
- De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M., Lüring, M., 2009. Changes in Ventilation and Locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in Response to Low Concentrations of Pharmaceuticals. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 111–120. <https://doi.org/10.1080/10807030802615584>
- Di Tommaso, P., Chatzou, M., Floden, E.W., Barja, P.P., Palumbo, E., Notredame, C., 2017. Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nature Biotechnology* 35, 316–319. <https://doi.org/10.1038/nbt.3820>
- Donahue, R.P., Stern, S., 1968. Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate in vitro. *Reproduction* 17, 395–398. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170395>
- dos Santos Frizzo, M.E., Antunes Soares, F.A., Dall'Onder, L.P., Lara, D.R., Swanson, R.A., Souza, D.O., 2003. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Research* 972, 84–89. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02506-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02506-X)
- Dumas, T., Bonnefille, B., Gomez, E., Boccard, J., Castro, N.A., Fenet, H., Courant, F., 2020. Metabolomics approach reveals disruption of metabolic pathways in the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposed to a WWTP effluent extract. *Science of The Total Environment* 712, 136551. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136551>
- Eades, C., Waring, C.P., 2010. The effects of diclofenac on the physiology of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research, PRIMO* 15 69, S46–S48. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.11.001>
- Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants* 3, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>
- 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.
- Ericson, H., Thorsén, G., Kumblad, L., 2010. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology* 99, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.017>
- European Commission, 2015. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2015) 1756) Text with EEA relevance, OJ L.

- Evans, D.H., 2008. Osmotic and Ionic Regulation: Cells and Animals. CRC Press.
- Fontes, M.K., Gusso-Choueri, P.K., Maranhão, L.A., Abessa, D.M. de S., Mazur, W.A., de Campos, B.G., Guimarães, L.L., de Toledo, M.S., Lebre, D., Marques, J.R., Felício, A.A., Cesar, A., Almeida, E.A., Pereira, C.D.S., 2018. A tiered approach to assess effects of diclofenac on the brown mussel *Perna perna*: A contribution to characterize the hazard. *Water Research* 132, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.077>
- Fu, Q., Scheidegger, A., Laczko, E., Hollender, J., 2021. Metabolomic Profiling and Toxicokinetics Modeling to Assess the Effects of the Pharmaceutical Diclofenac in the Aquatic Invertebrate *Hyalella azteca*. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07887>
- Gan, T.J., 2010. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion* 26, 1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>
- Godin, A.M., Ferreira, W.C., Rocha, L.T.S., Ferreira, R.G., Paiva, A.L.L., Merlo, L.A., Nascimento, E.B., Bastos, L.F.S., Coelho, M.M., 2012. Nicotinic acid induces antinociceptive and anti-inflammatory effects in different experimental models. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 101, 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.02.012>
- González-Ortegón, E., Blasco, J., Le Vay, L., Giménez, L., 2013. A multiple stressor approach to study the toxicity and sub-lethal effects of pharmaceutical compounds on the larval development of a marine invertebrate. *Journal of Hazardous Materials* 263, 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.041>
- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., 2014. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 148, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.011>
- Gorbushin, A.M., Borisova, E.A., 2015. Lectin-like molecules in transcriptome of *Littorina littorea* hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 48, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.007>
- Granzotto, A., Canzoniero, L.M.T., Sensi, S.L., 2020. A Neurotoxic Ménage-à-trois: Glutamate, Calcium, and Zinc in the Excitotoxic Cascade. *Front Mol Neurosci* 13, 600089. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.600089>
- Grzesiuk, M., Pijanowska, J., Markowska, M., Bednarska, A., 2020. Morphological deformation of *Daphnia magna* embryos caused by prolonged exposure to ibuprofen. *Environmental Pollution* 261, 114135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114135>
- Guiloski, I.C., Stein Piancini, L.D., Dagostim, A.C., de Moraes Calado, S.L., Fávaro, L.F., Boschen, S.L., Cestari, M.M., da Cunha, C., Silva de Assis, H.C., 2017. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.053>
- Hanson, J.A., Dietz, T.H., 2011. The role of free amino acids in cellular osmoregulation in the freshwater bivalve *Ligumia subrostrata* (Say). *Canadian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1139/z76-223>
- Hoefnagel, K.N., Verberk, W.C.E.P., 2017. Long-term and acute effects of temperature and oxygen on metabolism, food intake, growth and heat tolerance in a freshwater gastropod. *Journal of Thermal Biology, Si:Ectotherms: Performance* 68, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.11.017>
- Holman, J.D., Tabb, D.L., Mallick, P., 2014. Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass Spectrometry Data. *Current Protocols in Bioinformatics* 46, 13.24.1–13.24.9. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1324s46>
- Ivashkin, E., Khabarova, M.Yu., Melnikova, V., Nezhlin, L.P., Kharchenko, O., Voronezhskaya, E.E., Adameyko, I., 2015. Serotonin Mediates Maternal Effects and Directs Developmental and Behavioral Changes in the Progeny of Snails. *Cell Reports* 12, 1144–1158. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.022>
- Kovacevic, V., Simpson, A.J., Simpson, M.J., 2016. 1H NMR-based metabolomics of *Daphnia magna* responses after sub-lethal exposure to triclosan, carbamazepine and ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 19, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.01.004>
- Kunigelis, S.C., Saleuddin, A.S.M., 1986. Reproduction in the freshwater gastropod, *Helisoma*: involvement of prostaglandin in egg production. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 10, 159–167. <https://doi.org/10.1080/01688170.1986.10510239>
- Lataretu, M., Hölzer, M., 2020. RNAflow: An Effective and Simple RNA-Seq Differential Gene Expression Pipeline Using Nextflow. *Genes* 11, 1487. <https://doi.org/10.3390/genes11121487>
- Lebreton, M., Sire, S., Carayon, J.-L., Malgouyres, J.-M., Vignet, C., Gélet, F., Bonnafé, E., 2021. Low concentrations of oxazepam induce feeding and molecular changes in *Radix balthica* juveniles. *Aquatic Toxicology* 230, 105694. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105694>
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P., Choi, K., 2011. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1216–1225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.014>

- Liu, N., Wu, Y.-G., Lan, G.-C., Sui, H.-S., Ge, L., Wang, J.-Z., Liu, Y., Qiao, T.-W., Tan, J.-H., 2009. Pyruvate prevents aging of mouse oocytes. *REPRODUCTION* 138, 223–234. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0122>
- Liu, Y., Wang, L., Pan, B., Wang, C., Bao, S., Nie, X., 2017. Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 183, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.020>
- Matsushima, O., Khan, H.R., Saleudin, A.S.M., 1989. Changes in free amino acid concentrations in tissues of the freshwater pulmonate, *Helisoma duryi*, during hypertonic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 94, 653–657. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90611-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90611-7)
- McGettigan, P., Henry, D., 2013. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries. *PLoS Med* 10, e1001388. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001388>
- Mohd Zanuri, N.B., Bentley, M.G., Caldwell, G.S., 2017. Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate (Viagra®) on the fertilisation biology of broadcast spawning marine invertebrates. *Marine Environmental Research* 127, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.005>
- Mouthon, J., 1982. Les mollusques dulcicoles - Données biologiques et écologiques - Clés de détermination des principaux genres de bivalves et de gastéropodes de France. *Bull. Fr. Piscic.* 1–27. <https://doi.org/10.1051/kmae:1982001>
- Munari, M., Chemello, G., Finos, L., Ingrosso, G., Giani, M., Marin, M.G., 2016. Coping with seawater acidification and the emerging contaminant diclofenac at the larval stage: A tale from the clam *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere* 160, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.095>
- Muschamp, J.W., Fong, P.P., 2001. Effects of the serotonin receptor ligand methiothepin on reproductive behavior of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: Reduction of egg laying and induction of penile erection. *Journal of Experimental Zoology* 289, 202–207. [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20010215\)289:3<202::AID-JEZ7>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20010215)289:3<202::AID-JEZ7>3.0.CO;2-B)
- Nassef, M., Matsumoto, S., Seki, M., Khalil, F., Kang, I.J., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., 2010. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 80, 1095–1100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.073>
- Niyogi, S., Brix, K.V., Grosell, M., 2014. Effects of chronic waterborne nickel exposure on growth, ion homeostasis, acid-base balance, and nickel uptake in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology* 150, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.012>
- OECD, 2016. Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test.
- Oglesby, L.C., 1981. Volume regulation in aquatic invertebrates. *Journal of Experimental Zoology* 215, 289–301. <https://doi.org/10.1002/jez.1402150307>
- Ottaviani, E., 2006. Molluscan immunorecognition. *ISJ-INVERT SURVIV J* 3, 50–63.
- Ottaviani, E., Franchini, A., Cassanelli, S., Genedani, S., 1995. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biology of the Cell* 85, 87–91. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(96\)89130-1](https://doi.org/10.1016/0248-4900(96)89130-1)
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C., Provini, A., 2009. An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology in Vitro* 23, 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.04.014>
- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011. Assessment of the Potential Cyto–Genotoxicity of the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID) Diclofenac on the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water Air Soil Pollut* 217, 589–601. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0612-9>
- Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Martinuzzi, C., Attademo, A.M., Curi, L.M., Sandoval, M.T., 2019. Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: Assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of The Total Environment* 683, 624–637. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.275>
- Picone, B., Rhode, C., Roodt-Wilding, R., 2015. Domain repeats related to innate immunity in the South African abalone, *Haliotis midae*. *Marine Genomics* 23, 41–43. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2015.04.007>
- Pierce, S.K., Rowland, L.M., 1988. Proline Betaine and Amino Acid Accumulation in Sea Slugs (*Elysia chlorotica*) Exposed to Extreme Hyperosmotic Conditions. *Physiological Zoology* 61, 205–212. <https://doi.org/10.1086/physzool.61.3.30161233>
- Prasertlux, S., Sittikankaew, K., Chumtong, P., Khamnamtong, B., Klinbunga, S., 2011. Molecular characterization and expression of the Prostaglandin reductase 1 gene and protein during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 322–323, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.037>



- Rieger, D., Loskutoff, N.M., 1994. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *Reproduction* 100, 257–262. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1000257>
- Robinson, M.D., Oshlack, A., 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology* 11, R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>
- Rosani, U., Varotto, L., Gerdol, M., Pallavicini, A., Venier, P., 2015. IL-17 signaling components in bivalves: Comparative sequence analysis and involvement in the immune responses. *Developmental & Comparative Immunology* 52, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.001>
- Rowley, A.F., Powell, A., 2007. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *J Immunol* 179, 7209–7214. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7209>
- Ruggeri, B., Thoroughgood, C., 1985. Prostaglandins in aquatic fauna: a comprehensive review. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23, 301–306. <https://doi.org/10.3354/meps023301>
- Salyha, N., Salyha, Y., 2018. Protective role of l-glutamic acid and l-cysteine in mitigation the chlorpyrifos-induced oxidative stress in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 64, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.10.010>
- Salzet, M., Deloffre, L., Breton, C., Vieau, D., Schoofs, L., 2001. The angiotensin system elements in invertebrates. *Brain Research Reviews* 36, 35–45. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00063-7)
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175, 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
- Sathishkumar, P., Meena, R.A.A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., Gu, F.L., 2020. Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review. *Science of The Total Environment* 698, 134057. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134057>
- Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., Quinn, B., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus spp.*) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1389–1395. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.043>
- Schmidt, W., Rainville, L.-C., McEneff, G., Sheehan, D., Quinn, B., 2014. A proteomic evaluation of the effects of the pharmaceuticals diclofenac and gemfibrozil on marine mussels (*Mytilus spp.*): evidence for chronic sublethal effects on stress-response proteins. *Drug Testing and Analysis* 6, 210–219. <https://doi.org/10.1002/dta.1463>
- Shinagawa, A., Suzuki, T., Konosu, S., 1992. The Role of Free Amino Acids and Betaines in Intracellular Osmoregulation of Marine Sponges. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1717–1722. <https://doi.org/10.2331/suisan.58.1717>
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78, 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Sotto, R.B.D., Medriano, C.D., Cho, Y., Kim, H., Chung, I.-Y., Seok, K.-S., Song, K.G., Hong, S.W., Park, Y., Kim, S., 2017. Sub-lethal pharmaceutical hazard tracking in adult zebrafish using untargeted LC-MS environmental metabolomics. *Journal of Hazardous Materials* 339, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.06.009>
- Stanley-Samuelson, D.W., 1994. The Biological Significance of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates. *American Zoologist* 34, 589–598. <https://doi.org/10.1093/icb/34.6.589>
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reily, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Świacka, K., Michnowska, A., Maculewicz, J., Caban, M., Smolarz, K., 2020. Toxic effects of NSAIDs in non-target species: a review from the perspective of the aquatic environment. *Environmental Pollution* 115891. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115891>
- Trombini, C., Hampel, M., Blasco, J., 2019. Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: An integrative and multibiomarker approach. *Aquatic Toxicology* 208, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.004>

- Tufi, S., Lamoree, M.H., De Boer, J., Leonards, P.E.G., 2015a. Cross-platform metabolic profiling: application to the aquatic model organism *Lymnaea stagnalis*. *Anal Bioanal Chem* 407, 1901–1912. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8431-2>
- Tufi, S., Stel, J.M., de Boer, J., Lamoree, M.H., Leonards, P.E.G., 2015b. Metabolomics to Explore Imidacloprid-Induced Toxicity in the Central Nervous System of the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14529–14536. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03282>
- Want, E.J., Wilson, I.D., Gika, H., Theodoridis, G., Plumb, R.S., Shockcor, J., Holmes, E., Nicholson, J.K., 2010. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC–MS. *Nat Protoc* 5, 1005–1018. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.50>
- Wongprasert, K., Asuvapongpatana, S., Poltana, P., Tiensuwan, M., Withyachumnarnkul, B., 2006. Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 261, 1447–1454. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.044>
- Zhang, X., Luan, W., Jin, S., Xiang, J., 2008. A novel tumor necrosis factor ligand superfamily member (CsTL) from *Ciona savignyi*: Molecular identification and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology* 32, 1362–1373. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.05.009>
- Zhang, Y., Geißen, S.-U., Carmen Gal, 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>

#### IV. Article 3

### Multigenerational responses in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis* exposed to diclofenac at environmental concentrations

Lucie Bouly<sup>a,b</sup>, Caroline Vignet<sup>a</sup>, Jean-Luc Carayon<sup>a</sup>, Jean-Michel Malgouyres<sup>a</sup>, Hélène Fenet<sup>b</sup> and Florence Gélet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Albi, France

<sup>b</sup>HydroSciences Montpellier, University of Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France

\* Corresponding author at: Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Albi, France. E-mail address: [florence.geret@univ-jfc.fr](mailto:florence.geret@univ-jfc.fr) (F. Gélet)

*In preparation*

**Abstract:** Over the last decade, there has been an increase of concern about the diclofenac (DCF) occurrence in aquatic ecosystem. This “pseudo-persistent” pharmaceutical has the potential to expose living organisms for more than one generation. In this multigenerational study, we assessed diclofenac impact at environmentally relevant concentrations on the life history and behavioral parameters of two offspring generations, F1 and F2, of the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. Snail growth was affected by DCF in the F1 generation, with increased shell sizes of juveniles exposed to 0.1 µg.L<sup>-1</sup> and a decreased shell size at 2 and 10 µg.L<sup>-1</sup>. DCF also lowered food intake, enhanced locomotion activity and reduced the number of eggs per egg mass in the F1 generation. For the F2 generation, shorter time to hatch, faster growth, increased food intake and production of more egg masses per snail were induced by DCF exposure at 10 µg.L<sup>-1</sup>. Over time, DCF exposure led to maximization of reproductive function in *L. stagnalis*. These results show that multigenerational studies are crucial to reveal adaptive responses to chronic contaminant exposure, which are not observable after short term exposure.

**Keywords:** NSAID, pharmaceutical, mollusk, sublethal effects, behavior, life history, all-life study



## 1. Introduction

Over the last decades, presence of pharmaceuticals in the environment became an important issue in ecotoxicology. Moreover, this problem is likely to worsen over time, the rising and aging population leading to an increased drug consumption (Pereira et al., 2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) represent one of the most frequently detected pharmaceutical class in the environment (Fekadu et al., 2019). Among them, diclofenac (DCF) was included in the previous Watch list published under the EU Water Framework Directive 2000/60/EC (European Commission, 2015) and showed acute toxicity potential on aquatic organisms (Cleuvers, 2003; Haap et al., 2008; Lee et al., 2011). Its chronic impact was then assessed on aquatic species at low concentrations, showing reproduction disruption and teratogenic properties on fish at concentrations from 0.6 to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Yokota et al., 2018, 2017; Zhang et al., 2020). Few studies have been conducted on mollusks reproductive function at environmental concentrations ( $< 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), while the mechanism of action of DCF in humans leads to the decreased prostaglandin levels (Gan, 2010), which are involved in reproduction in invertebrates (Kunigelis and Saleuddin, 1986; Osada and Nomura, 1990; Stanley-Samuelson, 1994). Furthermore, prostaglandin levels appeared to decrease as well in aquatic invertebrates after DCF exposure (Bouly et al., 2021; Courant et al., 2018; Fu et al., 2021). A study performed on marine invertebrates (starfish, sea urchin and polychaete worm) demonstrated an impact of DCF on sperm quality at concentrations below 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Mohd Zanuri et al., 2017). Regarding teratogenic impact, Munari et al. (2016) showed induction of abnormal development of *R. philippinarum* larvae by DCF itself at 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  or combined with water acidification. Considering behavior, locomotion was impaired in the freshwater crustacean *Bryocamptus pygmaeus* after 72 h exposure to 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  DCF concentration, with a reduced swimming speed, swimming activity, exploration ability and thigmotaxis, and increased swimming path tortuosity (Di Cicco et al., 2021). Feeding behavior was shown to be impacted in *D. magna* with decreased ingestion rates after exposure to 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  DCF concentration (Nkoom et al., 2019). Other effects reported in the  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  range on aquatic invertebrates were cyto- and genotoxicity, metabolism disorders, and induction of inflammatory response (Boisseaux et al., 2017; Bouly et al., 2021; Liu et al., 2017; Nunes et al., 2020; Parolini et al., 2011, 2009). With regard to the previous studies, there is a severe lack of information on the DCF effects at environmental concentrations on the aquatic organism behavior (feeding, locomotion, response to light stress), although they are crucial for the species survival.

DCF is a “pseudo-persistent” contaminant in the aquatic environment, regarding its continuous release (Acuña et al., 2015). If acute and chronic exposure provide information on contaminant effect on organisms, they are more likely exposed for more than one generation in freshwater environments. Therefore, life cycle and multigenerational studies are essential to more accurately assess the risk pose by xenobiotic in aquatic habitats. Organisms could develop tolerance or sensitivity in subsequent

generations, depending on mechanisms involved in the exposure response (Kim et al., 2012; Pinto et al., 2021). The multigenerational effects of DCF were assessed in daphnids, showing a delay in the age at the first reproduction in the F0 and F2 generations and an increase in neonate body length in F1 and F5 generation after exposure to  $0.36 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Dietrich et al., 2010). However, *D. magna* seems less sensitive than other species to pharmaceutical pollutants (Batucan et al., 2021). The insensitivity of this model was already reported for other contaminants, as neonicotinoid insecticides, leading to an underestimation of the environmental risk posed by those substances (Sánchez-Bayo et al., 2016). Therefore, it appears necessary to vary the model species in order to get a relevant overview of the situation.

Invertebrates represent 95% of existing species, and play a crucial role in the functioning and the health of aquatic ecosystems (Segner et al., 2003). The mollusk *Lymnaea stagnalis* is a freshwater gastropod which was recently suggested as a powerful model in ecotoxicology (Amorim et al., 2019). This benthic organism is widely distributed in the northern hemisphere and, as other freshwater gastropods, play a crucial role in some aquatic ecosystem balance (Covich et al., 1999). In addition, this snail provides a broad behavioral repertoire that could facilitate ecological risk assessment (Aonuma et al., 2020; Dobranskyte et al., 2006; Niyogi et al., 2014; Svigruha et al., 2021). An OECD guideline used *L. stagnalis* as model organism for reproductive assessment in ecotoxicology (OECD, 2016), making it the first aquatic non-arthropod invertebrate model organism to be recognised in environmental risk assessments. This snail is a simultaneous hermaphrodite producing transparent egg masses, which allows to follow embryo development in the eggs. Furthermore, its short three-month life cycle in laboratory enables multigenerational studies (Amorim et al., 2019).

In a previous study, this model was successfully used to investigate DCF impact at adult life stage after all-life exposure, combining physiological, behavioral and molecular observations (Bouly et al., 2021). While organisms appeared to be impacted at the molecular level, life-history traits and behavior of the parental generation were little affected. Based on the molecular impacts on the parental generation, we hypothesized that DCF may induce growth, feeding, locomotion and reproductive disorders on further generations. The aim of this study was to assess DCF effects at environmental concentrations ( $0.1, 2$  and  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on life history traits and behaviour of the subsequent generations F1 and F2. For that, we measured hatching success of the egg masses, juvenile growth and eggs production of the adults. Behavioral endpoints (locomotion, feeding rate, response to light stress) were monitored on the adult stage to assess consequences of all-life xenobiotic exposure on adult population.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Test organisms

*Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) were from Biochemistry and Toxicology of Bioactive Substances (BTSB, EA 7417, Albi) laboratory cultures, started in 2019 with organisms obtained from the IRSTEA Lyon laboratory (France). They were maintained in a controlled-temperature chamber ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) with a simulated natural photoperiod (16 h L/8 h D) and fed fresh organic lettuce 3 times/week. They were held in mineral water (calcium  $45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , magnesium  $4.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sodium  $7.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , potassium  $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , sulfate  $9.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , chloride  $4.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , nitrate  $<1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , bicarbonate  $151.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), with a weekly renewal.

### 2.2. Chemicals

Diclofenac (DCF, purity  $\geq 98\%$ , CAS number 15307-79-6) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Stock solutions of DCF were prepared at  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in water and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in opaque glass bottles. The concentrations of the stock solutions were then measured as described in section 2.4. Ultrapure water was generated by a Purelab Classic system from Elga LabWater (Lane End, UK) with a specific resistance of  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  at  $25^{\circ}\text{C}$ . Analytical grade solvent hydrochloric acid (37%) was obtained from PanReac (Barcelona, Spain), HPLC grade trifluoro acetic acid were from VWR Chemicals (Leuven, Belgium) and hyper-grade acetonitrile for LC/MS were from Merk (Molsheim, France).

### 2.3. Exposure conditions

Exposure was conducted at three nominal DCF concentrations: 0.1 (low), 2 (medium) and 10 (high)  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , prepared and changed weekly in containers by diluting the stock solution in mineral water. Exposure and tests conditions of the parental generation (F0) were detailed in Bouly et al. (2021). Materials and methods described here concern only the offspring generations F1 and F2 (Fig. 1). F1 and F2 were started by collecting egg masses from the previous generations during a maximum of seven days period. Egg masses were exposed in glass beakers in a volume of 300 mL (3 replicates of 5 egg masses/condition). After hatching, young snails were randomly divided in 5 glass beakers of 40 snails (200 snails/condition), in a volume of 300 mL exposure medium weekly renewed. At 8 weeks post-hatch (wph), individuals were randomly distributed in three 20L-aquaria of 40 snails (120 snails/condition) in a volume of 5L exposure medium. In F1 generation, due to technical issues, the tests were split between the low treatment and the medium and high treatments. Therefore, there was two controls ( $\text{Ctrl}_{\text{Low}}$  and  $\text{Ctrl}_{\text{Medium, High}}$ ) in this generation at the juvenile and adult stages, and in the hatching test for the F2 generation. After hatching, control offspring was randomly mixed to obtain

a single control in the F2 generation tests (Fig. 1). Snails were fed fresh organic lettuce three times/week. Dead snails were removed every week and a final survival rate was assessed at 16 wph.

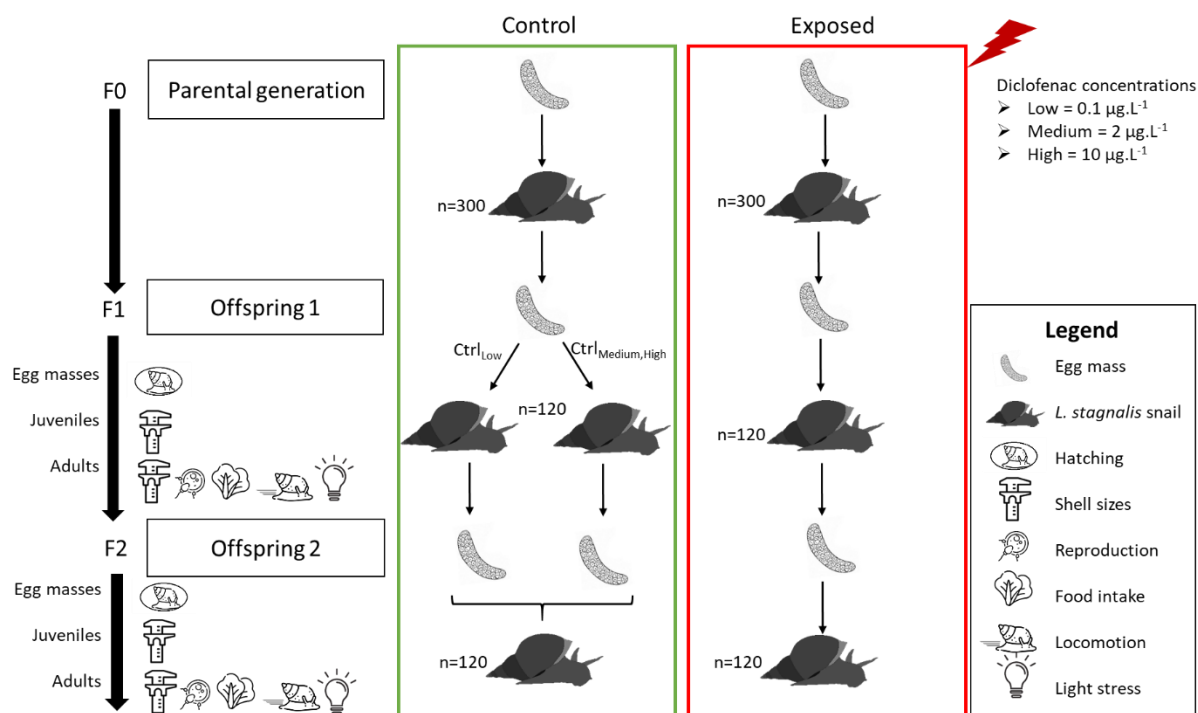


Figure 1 - Diclofenac exposure of *L. stagnalis* for 3 generations and tests performed at each life stage. Tests conducted on F0 generation were detailed in previous publication. Juvenile parameters were monitored between 7 and 8 weeks post-hatch (wph), adult parameters were determined between 15 and 20 wph, depending on the parameter assessed.

#### 2.4. DCF analysis in water

Water chemical analysis was the same as described in Bouly et al. (2021). For each treatment concentration, six water samples were randomly taken after water renewal (T0) and six were taken at day 7, just before water renewal (T7). The samples were stored at -20°C until analysis. For each sample, 200 mL HCl 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 with HCl (pH 2) and dried for 4 h in a laboratory oven at 45°C. Components were eluted with 4 mL acetonitrile. The extracts were then dried under a nitrogen stream and reconstituted with 200 µL acetonitrile. HPLC 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 × 250 mm) capillary column (Agela Technologies, Torrance, USA). The solvents were: A) water + 0.05% trifluoroacetic acid (TFA), and B) ACN + 0.05 % TFA. The elution gradient was as follows (t in min): t0, B = 30 %; t11, B = 100 %; t13, B = 100 %, t13.5, B = 30 %, t18, B = 30 %. The column oven temperature was set at 40°C, with a 20 µL injection volume and 1 mL/min flow rate. The working UV wavelength was 275 nm. Data analyses were performed using ChromQuest 5.0. For DCF concentration

quantification, 2 calibration curves were plotted in triplicate, with DCF dissolved in acetonitrile (external standard method). The first one was a 4 point-calibration curve spanning the 0.1-1 mg.L<sup>-1</sup> range, and the second one was a 5 point-calibration curve spanning the 1-10 mg.L<sup>-1</sup> range. Measurements were obtained in 100X concentrated extracts, and the concentrations in water samples were then calculated, while taking the extraction recoveries into account. Stock solution DCF concentrations were measured using the same analytical method. The limit of quantification (LOQ) was 0.1 mg.L<sup>-1</sup> and the limit of detection (LOD) was 0.03 mg.L<sup>-1</sup>. Instrumental stability was checked regularly in triplicate by injecting a concentration corresponding to one point on the calibration curve.

### **2.5. Life history traits**

F1 and F2 egg masses were collected from aquaria and placed in glass petri dishes (50 mm dia.) in 20 mL of water. Egg masses hatching was monitored daily between days 8 and 18 after egg laying, with 16 egg masses/condition. Egg masses with undeveloped embryos were discarded. Hatching success (%) and time to hatch were determined for each egg mass.

Shell sizes were determined for the entire population using a caliper to measure the distance between the shell aperture and apex at 8 (juvenile stage) (n=200) and 16 wph (adult stage) (n=120).

Reproduction test was adapted from OECD reproduction test (OECD, 2016). It was performed at 16 wph on 6 replicates of 5 individuals in 1 L beakers with 800 mL of exposure medium (30 snails/condition). The organisms, chosen with shell sizes of  $24.5 \pm 3.5$  mm, were allowed to acclimate for 3 days. This test was conducted over a 28 days period. Water was renewed weekly and egg masses were removed and counted daily. Shell sizes were measured at the beginning and at the end of the test. Endpoints were the number of egg masses/snails and the number of eggs/egg mass.

During the exposure, control life-history levels differed in controls between generations. These differences were highlighted in the supplementary data, Fig. S-1, 2 and 3. To better highlight the impact of DCF exposure between generations, we chose to plot the growth test results and the reproductive parameters normalized by mean value of the control.

### **2.6. Behavior endpoints**

Snails from F1 and F2 generations selected for behavioral tests were chosen with a shell sizes of  $24 \pm 3$  mm. Similar to the life-history parameters, behaviors differences between controls were showed in the Fig. S-4. Feeding and locomotion endpoints were then normalized with mean control level on the plot, to facilitate comparison between generations.

#### 2.6.1. Feeding test

Feeding tests were conducted on snails placed in individual exposure systems at 16 wph (32 snails/condition) with standardized lettuce disks (300 mm dia., 28.26 cm<sup>2</sup> area). After 6 hours, pictures were taken of the remaining lettuce (Mi 9 SE, Xiaomi) on the top of the aquaria, while respecting same distance between the aquaria and the camera lens at each shot. The images were processed with Photoshop CS6 software according to the method described by Lebreton et al. (2021) and analyzed using ImajeJ software (National Institute of Health, version 1.52a). The consumed lettuce area after 6 h of feeding normalized with snail shell size was calculated.

#### 2.6.2. Locomotion test

Locomotion behavior was monitored at 17 wph as described in Bouly et al. (2021). Twenty-four snails/condition were monitored for 2 h in petri dishes (140 mm dia.) containing 150 mL of exposure medium using EthoVision XT behavior software (Noldus, Wageningen, Netherlands) with a camera (Basler, acA 1300-60 gm, lens Kowa LMVZ4411). The average distance moved (in mm) in 2 h was normalized with snail shell size.

#### 2.6.3. Light stress test

The stress response test was performed on the same individuals and under the same conditions as used in the locomotion tests. 24 animals per condition were filmed for 15 min with the light on, followed by 15 min in the dark, and 15 min with the light on. The average distance moved (mm) in each light condition (15 min), normalized by the snail wet weight (mg) was calculated.

### 2.7. Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism (Version 6.01 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA) and R Studio Version 1.3.1056 with R Version 4.1.0. In all experiment, assumptions for parametric tests (normality and homoscedasticity) were assessed and not met. Consequently, shell sizes, feeding rate, distance moved, number of egg masses/snails, number of eggs/egg mass and hatching success were analyzed using a multiple comparison test after a non-parametric Kruskal-Wallis test (pgirmess R package) or using a Mann-Whitney test. Time to hatch was analyzed - after rounding the hatching percentage to the decimal point – via a log-rank survival analysis followed by a pairwise Mann-Whitney test.

### 3. Results

#### 3.1. Exposure conditions and survival

In the F1 and F2 generation, survival rates ranged between 67.1 and 74.9% in controls, and 59.8 and 73.5% in treatments (Table S-1). This was considered acceptable regarding the long duration of exposure. Indeed, Reátegui-Zirena et al. (2017) reported an 80% survival rate in *L. stagnalis* control snails after a 56-days experiment, half as long as the present study. DCF concentrations at day 0 were confirmed to be within a reasonable range of nominal (Table S-2). After 7 days, DCF concentrations were stable for the 0.1 µg.L<sup>-1</sup> (low group) and the 10 µg.L<sup>-1</sup> (high group) concentrations and decreased by more than 30% for the 2 µg.L<sup>-1</sup> concentration (medium group).

#### 3.2. Life history traits

##### 3.2.1. Hatching success and time-to-hatch

In F1 and F2 generations, hatching success was not affected by DCF exposure (Kruskal-Wallis test,  $p > 0.05$ ). Considering time to hatch, there were no differences between control and exposed egg masses for the F1 generation, however, there were statistically significant differences for the F2 generation (Fig. 2). Egg masses becoming the F2 generation exposed to 10 µg.L<sup>-1</sup> (high group) took shorter to hatch compared to control (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ).

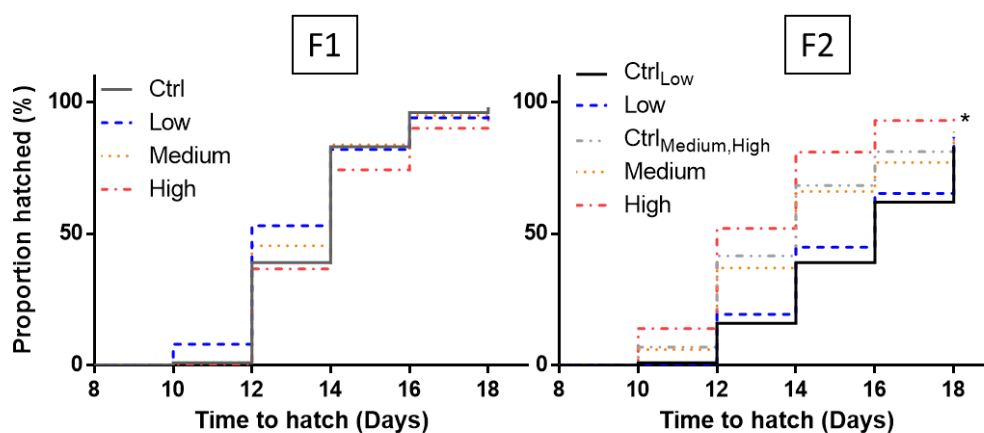


Figure 2 - Time to hatch of eggs from control or DCF exposed snails, becoming F1 (left) and F2 (right) generations. \* $p < 0.05$ .

##### 3.2.2. Growth

The DCF exposure affected the shell sizes of juvenile snails in both offspring generations (Fig. 3A). The Figure 3 represents shell sizes of the exposed groups normalized to the mean control value, in order to highlight sizes modulations relative to the control in each generation. Juvenile snails from the low group had a longer shell size in both generations F1 (Mann-Whitney test,  $p < 0.001$ ) and F2 (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.001$ ). The medium and high groups from the F1 generation had shorter shells at juvenile stage (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.001$ ) and those from the F2 generation had longer shells

compared to the control (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.001$ ). At the adult stage, there were no longer differences in shell sizes of exposed snails compared to control for both generations (Fig. 3B).

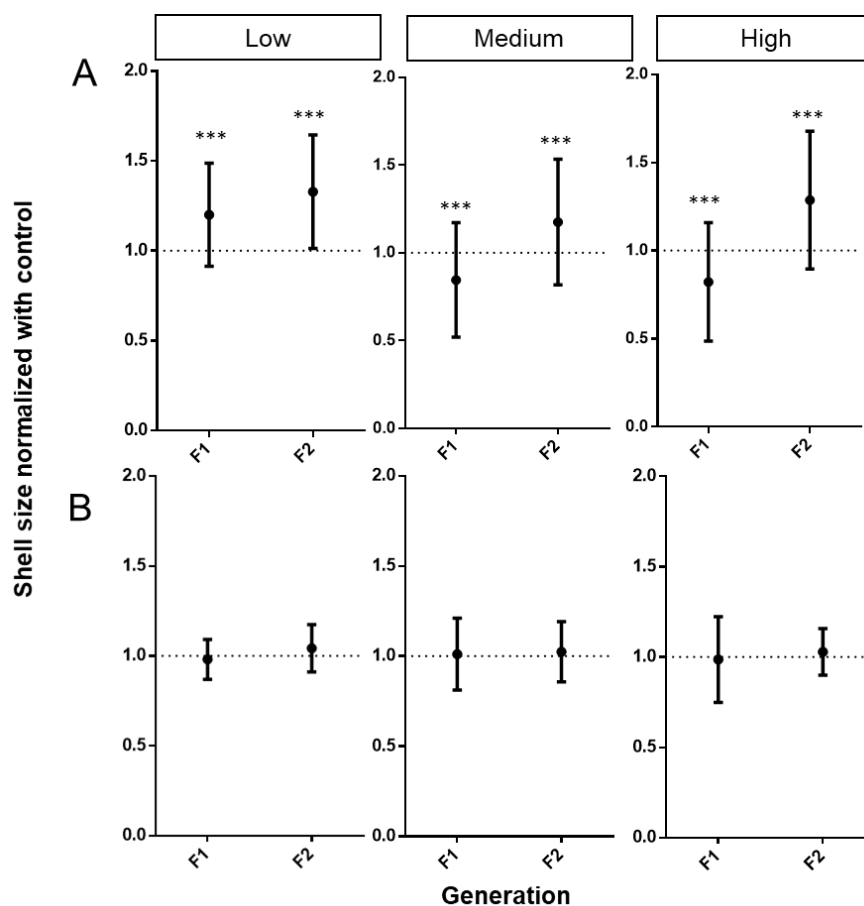


Figure 3 - Shell size (mm) of A) juveniles (8 wph) and B) adults snails (16 wph) exposed to DCF normalized with control mean shell size for F1 and F2 generations. Bars represent standard deviation. The dotted lines at 1 represent control level.

\*\*\* $p < 0.001$  compared to control.

### 3.2.3. 28-days reproductive test

Reproductive endpoints were impacted by DCF exposure in both F1 and F2 generations. On the F1 generation, DCF caused a significant decrease in the number of eggs per egg mass in the medium group (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ), and a decreasing trend in the high group (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.1$ ) (Fig. 4A). The number of egg masses per snail was impacted by DCF exposure with a significant increase in the high group (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.01$ ) in the F2 generation (Fig. 4B). Even if there were not statistical differences in shell sizes at the beginning of the test (Kruskal-Wallis test,  $p > 0.05$ ), at the end of the 28-days reproductive test, shell sizes in F1 low treatment and in F2 low and high treatment were statistically smaller than control (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ , data not shown).



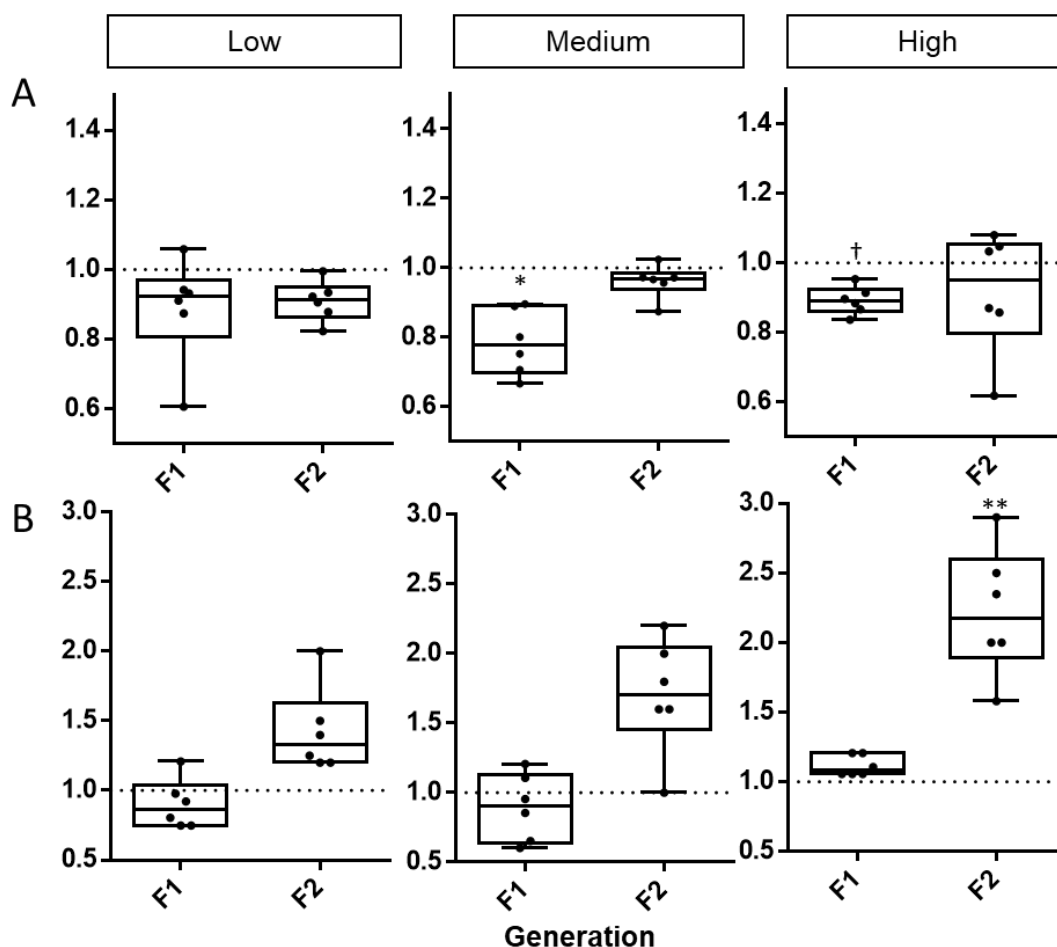


Figure 4 – Reproductive parameters in the low, medium and high DCF exposure groups, F1 and F2 generations. A) Number of egg per egg mass normalized with control mean egg per egg mass and B) number of egg masses per snail exposed to DCF normalized with control mean egg masses per snail. The dotted lines at 1 represent control level. \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ; † $< 0.1$  compared to control.

### 3.3. Behavioral endpoints

Feeding behavior was impacted by DCF exposure in opposite ways depending on the generation observed. In the F1 generation, there was a significant decrease in lettuce area consumption in F1 snails in the low (Mann-Whitney test,  $p < 0.01$ ) and medium (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ) groups compared to the control (Fig. 5A). In the F2 generation, there was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in lettuce area consumption in the high group. Regarding the locomotion behaviour, DCF affected the distance moved in two hours in the medium (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ) and high (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.01$ ) groups in the F1 generation, with a higher distance moved compared to the control (Fig. 5B). DCF exposure did not alter response to light stress in all observed generations (Fig. S-5).

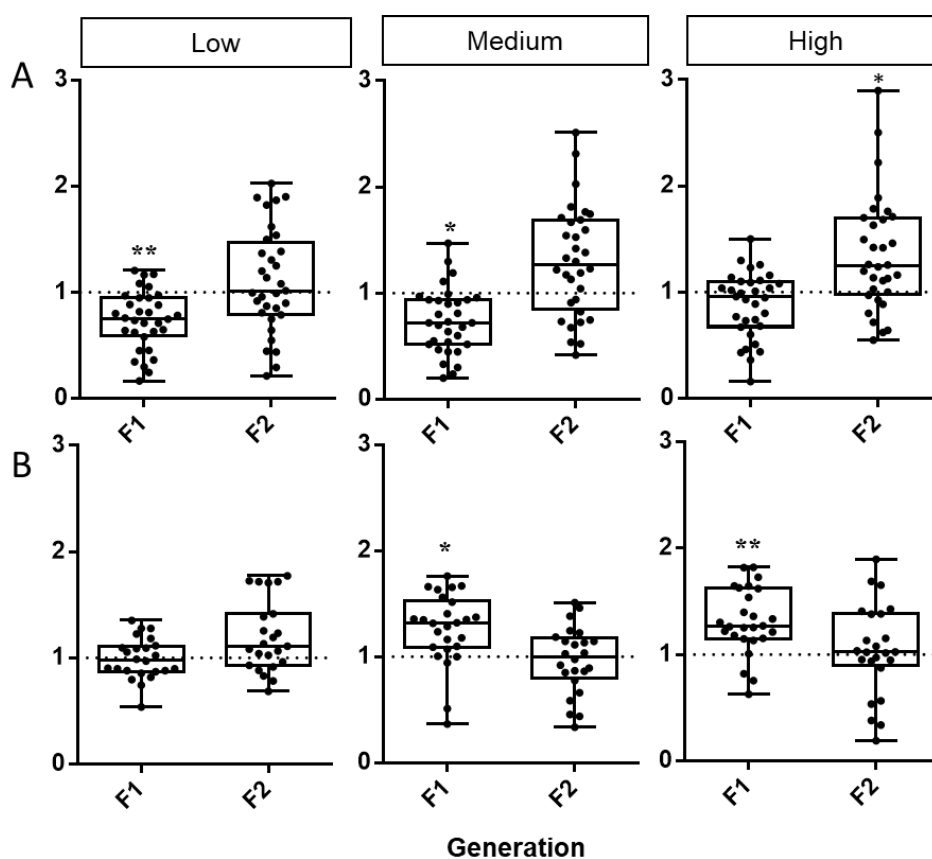


Figure 5 – Feeding and locomotion endpoints in the low, medium and high DCF exposure groups for F1 and F2 generations. A) Lettuce area consumption in 6 hours normalized with shell sizes of the snail and with control mean lettuce area consumption. B) Distance moved in 2 hours normalized with shell sizes of the snail and with control mean level. The dotted lines at 1 represent control level. \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$  compared to control.

#### 4. Discussion

Standard ecotoxicity tests usually focus on acute or short-term exposure to contaminants, with few full-life cycle or multigenerational studies (Fent et al., 2006; Philippe et al., 2017). Pharmaceuticals are released continuously in the aquatic environment and represent chronic toxicity drivers for living organisms (Fent et al., 2006; Gworek et al., 2019). DCF itself was described as a “pseudo-persistent” compound, which is more likely to expose freshwater species with short or medium life cycle for more than one generation (Acuña et al., 2015). To assess the DCF impact on the aquatic environment, we operated in more realistic conditions by conducting a multigenerational study on a freshwater gastropod at environmental exposure concentrations. Regarding the exposed parental generation, the only DCF impact on life-history traits was faster growth of juvenile snails (Bouly et al., 2021). A stronger incidence of DCF was highlighted on subsequent generations, showing an increase in the snail sensitivity to DCF.

#### 4.1. DCF impact on life-history traits

The primary impact of DCF exposure on life-history traits was growth impairment. The highest shell length in juveniles of the F1 generation exposed to  $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , and those of the F2 generation exposed to 0.1, 2 and  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  could indicate faster growth, before reaching a steady state at the adult stage. Therefore, growth was slower in the F1 generation exposed to 2 and  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . An impact on shell growth was also highlighted in the parental generation exposed to DCF, with a higher shell size in exposed juvenile snails compared to control (Bouly et al., 2021). This faster growth suggested an hormetic response, characterized by stimulation of functions at low concentration of a toxicant and inhibitory response at high concentration (Calabrese, 2008). Hormesis is due to an adaptive response of the organism to low concentrations of environmental stressors (Nassour et al., 2021). Hormetic effect on growth was already shown in response to xenobiotic exposure in the gastropod *Physella acuta*, with enhancing growth after exposure to low concentrations ( $0.5$  to  $1.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) of the antibacterial agent triclosan, and retarding growth at  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  and above (Brown et al., 2012). Regarding multigenerational NSAIDs exposure, two studies performed on daphnids showed a stimulatory effect of NSAIDs on growth. Larger sizes were demonstrated in F1 and F5 generation exposed to DCF at  $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Dietrich et al., 2010) and higher growth rates in the F5 generation exposed to the NSAID ibuprofen at  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  concentration (Grzesiuk et al., 2020). In the study of Grzesiuk et al., (2020), those increased growth rates were coupled with reproductive impairment, may be due to reinvestment of resources from reproduction to growth. This was not highlighted in the present study where, on the opposite, growth seemed positively correlated with reproductive function. In the F1 generation, the number of eggs per egg mass was decreased in the  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  exposed snails compared to the control, where at the same exposure concentration growth was significantly slower. However, the number of egg masses laid per snail was not impacted in this condition. Reduced number of eggs per egg masses was already observed in *Radix balthica* freshwater gastropod exposed to low concentration ( $0.8 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) of a pharmaceutical, the oxazepam (Lebreton et al., 2021a) and in *L. stagnalis* exposed to cadmium ( $25$  to  $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Reátegui-Zirena et al., 2017). The benzodiazepine oxazepam was suggested to impact neuroendocrine regulation of egg-laying via the GABA system. In *L. stagnalis*, neuroendocrine regulation of reproduction could be impacted as well, as the ovulation prohormone was down-expressed in *L. stagnalis* heads after all-life exposure to  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  DCF concentration (Bouly et al., 2021). Indeed, ovulation prohormone is then cleaved in various substances, including cerebral neurosecretory caudodorsal peptides (CDCP) and the ovulation hormone (CDCH). Those neuropeptides were well-known to have a function in the regulation of *L. stagnalis* female sexual behavior (Hermann et al., 1997).

The second reported impact on reproductive endpoints in this study was an increase in the number of egg masses per snail in the F2 generation exposed to 2 and  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  compared to the control.

Similarly, in daphnids exposed to  $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$  DCF, there were more neonates in the F1 exposed generation than in control (Dietrich et al., 2010). An increase of the number of egg masses laid per snail under stress condition seemed to be classically observed in freshwater gastropods (Reátegui-Zirena et al., 2017; Sánchez-Argüello et al., 2009; Suski et al., 2012). This situation may indicate fecundity compensation, where, to counteract impending survival effects, animals compensate by reaching reproductive maturity sooner and increasing offspring production (Suski et al., 2012; Żbikowska et al., 2006).

#### 4.2. DCF impact on behavior

DCF exposure affected snails feeding behaviour with an opposite impact between the F1 and F2 generations. Indeed, at  $0.1$  and  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  exposure concentrations, food intake was decreased in the F1 generation. On the contrary, enhanced food intake was observed in F2 generation exposed to  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  concentration. These results are in agreement with previous study, where feeding activity has been shown to be impaired in *D. magna* exposed 5 h to DCF at  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Nkoom et al., 2019) and time to eat were increased after 5 to 9 days exposure to  $1.0 \text{mg.L}^{-1}$  DCF in medaka fish (Nassef et al., 2010). Impairment of feeding activity following long-term exposure to DCF may impact other important functions of the organism and could decrease population in the natural environment.

The snail locomotion behavior was impacted by DCF exposure in the F1 generation, with an increase of activity after exposure to  $2$  and  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  DCF. A biphasic impact of NSAIDs exposure on locomotion and ventilation was highlighted in *Gammarus pulex* exposed to ibuprofen (De Lange et al., 2009, 2006). An increased ventilation linked with a decreased locomotion was observed at low concentrations ( $1$ - $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). On the contrary, ventilation was lower and the locomotion was higher in control and in gammarids exposed to high pharmaceuticals concentrations ( $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  to  $1 \text{mg.L}^{-1}$ ) (De Lange et al., 2009). The need for increased ventilation in freshwater gastropod has different consequences than in gammarids because they are able to breathe air at the surface. Ventilation of *L. stagnalis* after DCF exposure was not assessed here, but in *Radix balthica* freshwater gastropod, at concentrations higher than  $0.9 \mu\text{g.L}^{-1}$  the animals switched to aquatic respiration to breathing air in order to regulate their metabolic needs (Morozov et al., 2021). In *L. stagnalis* snails, a coordination between respiration and locomotion was reported, which could be due to stimulation of similar neuronal mechanisms (Vorontsov et al., 2003). The DCF exposure may increase energy requirements for normal metabolism of *L. stagnalis*, leading to an increasing respiration and then an increased locomotion.

#### 4.3. Potential mechanisms

The observed impact on the physiology of the snails might be due to molecular disruption. The DCF influence on the F0 generation was assessed at molecular level, using metabolomics and transcriptomic approaches (Bouly et al., 2021). A modulation of serotonin levels was found in reproductive apparatus of snails exposed to 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  DCF in the parental generation (Bouly et al., 2021). Serotonin is involved in the transmission of information to progeny and can modulate juvenile growth, feeding and locomotion behaviors in the great pond snail offspring (Ivashkin et al., 2015). In addition, modulation was found in glutamate levels and in gene expression of nitric oxide synthase, which are both involved in the control of *L. stagnalis* feeding behavior (Brierley et al., 1997; Kobayashi et al., 2000). If this disruption at the molecular level occurs as well in subsequent generations, it could lead to altered life-history traits and behaviors. Similarly, in the parental generation, molecular impacts of DCF demonstrated on reproductive function were not translated into an impact on snail egg-laying, which was found to be disturbed in the F1 and F2 generations (Bouly et al., 2021). For example, down-expression of ovulation prohormone in heads at 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  exposure concentration in the parental generation could be a precocious biomarker of the disturbed reproductive parameters the F1 and F2 generations. In addition, the gene coding for the FMRamide receptor was over-expressed in heads of 0.1 and 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  exposed snails (Bouly et al., 2021). In *L. stagnalis*, the FMRamide is involved in male reproductive behavior (De Boer et al., 1996) and in motoneurons activity (Kyriakides and McCrohan, 1989). All those observations could indicate that molecular tools are efficient in revealing premature xenobiotics effects, which are only expressed at the physiological level after multigenerational exposure.

#### 4.4. Multigenerational response

The multigenerational response to toxic compound generally leads to resistance mechanisms or enhanced toxicity (Dietrich et al., 2010; Salice et al., 2009; Schür et al., 2020; Silva et al., 2017). The response to a toxicant in freshwater invertebrates, like vertebrates, could differ between species and with the specific mode of action of the substances (Alonso et al., 2009; Hickey, 1989; van Wezel et al., 1995). In the present study, DCF impact on snails oscillated between stimulation and inhibition of processes, with increased effects observed in subsequent generations. Indeed, on the parental generation exposed to DCF, juvenile growth was faster but other life-history traits (hatching, reproduction) and behavioral responses (feeding, locomotion and response to light stress) in adults snails remained unchanged (Bouly et al., 2021). Greater impact of NSAID on the offspring was also highlighted in *D. magna* exposed to ibuprofen with an enhancement of embryo deformation in the F5 generation (Grzesiuk et al., 2020). In the present study, the disrupted processes (growth, egg-laying, feeding, locomotion) may be stimulation leading to resistance or expression of toxic impact of DCF on

the organisms. Trade-offs can be altered to induce resistance, conducting to inhibition of specific functions. Little is known in *L. stagnalis* but such adaptive responses over successive generations was demonstrated in the *Biomphalaria glabrata* gastropod with a genetic adaptation in offspring to increase cadmium tolerance in snails whose progenitors were exposed (Salice et al., 2010). Irregularity in organisms responses between generations were also shown in daphnids exposed to environmental concentrations of propranolol (Jeon et al., 2013).

By focusing on the high treatment of the F2 generation, we mostly highlighted stimulation, with shorter time-to-hatch, faster growth, increased food intake and production of more egg masses per snail. These reactions supported the hypothesis of the fecundity compensation formulated in previous paragraph. Indeed, body size is related to fecundity in *L. stagnalis*, and faster growth could lead to earlier and increased reproduction (Montagne-Wajer et al., 2007). Shorter time-to-hatch and increased feeding are necessary processes to reach reproductive body size sooner. For the reproductive assessment, snails were chosen with homogenate shell sizes at the beginning of the test. But interestingly, mean shell sizes of 0.1 and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  exposed snails were lower than control at the end the 28-days test, meaning that the growth rate of the treated animals was slower than control during this period. In *L. stagnalis*, a trade-off between growth, female and male functions has been demonstrated (Koene and Maat, 2006). Exposure to stress in the great pond snail for several generations could lead to reaching reproductive size earlier and then reallocating resources to reproduction from the growth and maintenance budget. This strategy is known in snails in response to parasite infection and could be followed by early host death (Żbikowska et al., 2006).

## Conclusion

A greater impact of DCF exposure was demonstrated on subsequent generations (F1 and F2) compared to parental generation, with oscillation between stimulation and inhibition of processes. This could indicate hormesis with disruption of trade-offs between functions over time. In the F1 generation, growth was affected with an opposite impact according to the exposure concentration. In addition, food intake was lowered, locomotion activity was enhanced and the egg masses produced by the snails contained fewer eggs. In the F2 generation, a stimulation was demonstrated on snails exposed to 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  concentration with shorter time to hatch, faster growth, increased food intake and production of more egg masses per snail. This could be a reaction to contaminant-induced stress aimed at maximizing reproductive function. DCF exposure did not impact the light stress response of the snails over both generations. Those results highlighted a potential impact of DCF on freshwater gastropods populations after a long-term exposure, as disrupted functions of the organism (growth, egg-laying, feeding, locomotion) are crucial for species survival. The increased sensitivity of *L. stagnalis*

to the contaminant observed in the offspring shows the interest of studies conducted over several generations.

### Acknowledgement

Funding for this work was provided by a grant from the Region Occitanie (Toulouse, France), and from Jean-François Champollion University Institute (Albi, France).

### References

- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barceló, D., 2015. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International* 85, 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.023>
- Alonso, Á., De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M., 2009. Contrasting sensitivities to toxicants of the freshwater amphipods *Gammarus pulex* and *G. fossarum*. *Ecotoxicology* 19, 133. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0398-y>
- 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. *Science of The Total Environment* 669, 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>
- Aonuma, H., Mezheritskiy, M., Boldyshev, B., Totani, Y., Vorontsov, D., Zakharov, I., Ito, E., Dyakonova, V., 2020. The Role of Serotonin in the Influence of Intense Locomotion on the Behavior Under Uncertainty in the Mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Frontiers in Physiology* 11, 221. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00221>
- Batucan, N.S.P., Tremblay, L.A., Northcott, G.L., Matthaei, C.D., 2021. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environmental Advances* 100164. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100164>
- Boisseaux, P., Noury, P., Thomas, H., Garric, J., 2017. Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea stagnalis* under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: Diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.003>
- Bouly, L., Courant, F., Bonnafé, E., Carayon, J.-L., Malgouyres, J.-M., Vignet, C., Gomez, E., Gélet, F., Fenet, H., 2021. Long-term exposure to environmental diclofenac concentrations impairs growth and induces molecular changes in *Lymnaea stagnalis* freshwater snails. *Chemosphere* 133065. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133065>
- Brierley, M.J., Staras, K., Benjamin, P.R., 1997. Behavioral Function of Glutamatergic Interneurons in the Feeding System of *Lymnaea*: Plateauing Properties and Synaptic Connections with Motor Neurons. *Journal of Neurophysiology* 78, 3386–3395. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.6.3386>
- Brown, J., Bernot, M.J., Bernot, R.J., 2012. The influence of TCS on the growth and behavior of the freshwater snail, *Physa acuta*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 47, 1626–1630. <https://doi.org/10.1080/10934529.2012.687171>
- Calabrese, E.J., 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1451–1474. <https://doi.org/10.1897/07-541.1>
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters, Hot Spot Pollutants: Pharmaceuticals in the Environment* 142, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- Courant, F., Arpin-Pont, L., Bonnefille, B., Vacher, S., Picot-Groz, M., Gomez, E., Fenet, H., 2018. Exposure of marine mussels to diclofenac: modulation of prostaglandin biosynthesis. *Environ Sci Pollut Res* 25, 6087–6094. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9228-6>
- Covich, A.P., Palmer, M.A., Crowl, T.A., 1999. The Role of Benthic Invertebrate Species in Freshwater Ecosystems: Zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *BioScience* 49, 119–127. <https://doi.org/10.2307/1313537>
- De Boer, P., Jansen, R.F., Maat, A.T., 1996. Copulation in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*: a review. *Invertebrate Reproduction & Development* 30, 167–176. <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672542>



- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M., 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.002>
- De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M., Lürling, M., 2009. Changes in Ventilation and Locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in Response to Low Concentrations of Pharmaceuticals. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 111–120. <https://doi.org/10.1080/10807030802615584>
- Di Cicco, M., Di Lorenzo, T., Fiasca, B., Ruggieri, F., Cimini, A., Panella, G., Benedetti, E., Galassi, D.M.P., 2021. Effects of diclofenac on the swimming behavior and antioxidant enzyme activities of the freshwater interstitial crustacean *Bryocamptus pygmaeus* (Crustacea, Harpacticoida). *Science of The Total Environment* 149461. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149461>
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., Laforsch, C., 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*--a multigenerational study. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.069>
- Dobranskyte, A., Jugdaohsingh, R., McCrohan, C.R., Stuchlik, E., Powell, J.J., White, K.N., 2006. Effect of humic acid on water chemistry, bioavailability and toxicity of aluminium in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*, at neutral pH. *Environmental Pollution* 140, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.030>
- European Commission, 2015. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2015) 1756) Text with EEA relevance, OJ L.
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., Van der Bruggen, B., 2019. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of The Total Environment* 654, 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Fu, Q., Scheidegger, A., Laczko, E., Hollender, J., 2021. Metabolomic Profiling and Toxicokinetics Modeling to Assess the Effects of the Pharmaceutical Diclofenac in the Aquatic Invertebrate *Hyalella azteca*. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07887>
- Gan, T.J., 2010. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion* 26, 1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>
- Grzesiuk, M., Pijanowska, J., Markowska, M., Bednarska, A., 2020. Morphological deformation of *Daphnia magna* embryos caused by prolonged exposure to ibuprofen. *Environmental Pollution* 261, 114135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114135>
- Gworek, B., Kijeńska, M., Zaborowska, M., Wrzosek, J., Tokarz, L., Chmielewski, J., 2019. Pharmaceuticals in aquatic environment. Fate and behaviour, ecotoxicology and risk assessment – A review. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 76, 397–407. <https://doi.org/10.32383/appdr/103368>
- Haap, T., Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere* 73, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.062>
- 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*. *Journal of Neurophysiology* 78, 2859–2869. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.6.2859>
- Hickey, C.W., 1989. Sensitivity of four New Zealand cladoceran species and *Daphnia magna* to aquatic toxicants. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 23, 131–137. <https://doi.org/10.1080/00288330.1989.9516348>
- Ivashkin, E., Khabarova, M.Yu., Melnikova, V., Nezlin, L.P., Kharchenko, O., Voronezhskaya, E.E., Adameyko, I., 2015. Serotonin Mediates Maternal Effects and Directs Developmental and Behavioral Changes in the Progeny of Snails. *Cell Reports* 12, 1144–1158. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.022>
- Jeon, J., Kurth, D., Hollender, J., 2013. Biotransformation Pathways of Biocides and Pharmaceuticals in Freshwater Crustaceans Based on Structure Elucidation of Metabolites Using High Resolution Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 313–324. <https://doi.org/10.1021/tx300457f>
- Kim, H.Y., Lee, M.J., Yu, S.H., Kim, S.D., 2012. The individual and population effects of tetracycline on *Daphnia magna* in multigenerational exposure. *Ecotoxicology* 21, 993–1002. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0853-z>



- Kobayashi, S., Sadamoto, H., Ogawa, H., Kitamura, Y., Oka, K., Tanishita, K., Ito, E., 2000. Nitric oxide generation around buccal ganglia accompanying feeding behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience Research* 38, 27–34. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00136-X)
- Koene, J.M., Maat, A.T., 2006. Energy budgets in the simultaneously hermaphroditic pond snail, *Lymnaea stagnalis*: A trade-off between growth and reproduction during development. *Belg. J. Zool.* 134, 41–45.
- Kunigelis, S.C., Saleuddin, A.S.M., 1986. Reproduction in the freshwater gastropod, *Helisoma*: involvement of prostaglandin in egg production. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 10, 159–167. <https://doi.org/10.1080/01688170.1986.10510239>
- Kyriakides, M.A., McCrohan, C.R., 1989. Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurobiology* 20, 635–650. <https://doi.org/10.1002/neu.480200704>
- Lebreton, M., Malgouyres, J.-M., Carayon, J.-L., Bonnafé, E., Géret, F., 2021a. Effects of the anxiolytic benzodiazepine oxazepam on freshwater gastropod reproduction: a prospective study. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02453-y>
- Lebreton, M., Sire, S., Carayon, J.-L., Malgouyres, J.-M., Vignet, C., Géret, F., Bonnafé, E., 2021b. Low concentrations of oxazepam induce feeding and molecular changes in *Radix balthica* juveniles. *Aquatic Toxicology* 230, 105694. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105694>
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P., Choi, K., 2011. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1216–1225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.014>
- Liu, Y., Wang, L., Pan, B., Wang, C., Bao, S., Nie, X., 2017. Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 183, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.020>
- Mohd Zanuri, N.B., Bentley, M.G., Caldwell, G.S., 2017. Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate (Viagra®) on the fertilisation biology of broadcast spawning marine invertebrates. *Marine Environmental Research* 127, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.005>
- Montagne-Wajer, K., Koene, J., Maat, A.T., 2007. Aspects of body size and mate choice in the simultaneously hermaphroditic pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Animal Biology* 57, 247–259. <https://doi.org/10.1163/157075607780377983>
- Morozov, A.A., Berezina, N.A., Sladkova, S.V., Chernova, E.N., Yurchenko, V.V., 2021. Biochemical and respiratory parameters in a gastropod *Radix balthica* exposed to diclofenac. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 109240. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109240>
- Munari, M., Chemello, G., Finos, L., Ingrosso, G., Giani, M., Marin, M.G., 2016. Coping with seawater acidification and the emerging contaminant diclofenac at the larval stage: A tale from the clam *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere* 160, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.095>
- Nassef, M., Matsumoto, S., Seki, M., Khalil, F., Kang, I.J., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., 2010. Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 80, 1095–1100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.073>
- Nassour, C., Nabhani-Gebara, S., Barton, S.J., Barker, J., 2021. Aquatic ecotoxicology of anticancer drugs: A systematic review. *Science of The Total Environment* 800, 149598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149598>
- Niyogi, S., Brix, K.V., Grosell, M., 2014. Effects of chronic waterborne nickel exposure on growth, ion homeostasis, acid-base balance, and nickel uptake in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology* 150, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.012>
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Dong, H., Yang, H., 2019. Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res* 26, 5704–5712. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-04072-3>
- Nunes, B., Daniel, D., Canelas, G.G., Barros, J., Correia, A.T., 2020. Toxic effects of environmentally realistic concentrations of diclofenac in organisms from two distinct trophic levels, *Hediste diversicolor* and *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 231, 108722. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108722>
- OECD, 2016. Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test.
- Osada, M., Nomura, T., 1990. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Prostaglandins* 40, 229–239. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(90\)90011-J](https://doi.org/10.1016/0090-6980(90)90011-J)
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C., Provini, A., 2009. An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology in Vitro* 23, 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.04.014>

- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011. Assessment of the Potential Cyto–Genotoxicity of the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID) Diclofenac on the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water Air Soil Pollut* 217, 589–601. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0612-9>
- Pereira, A., Silva, L., Laranjeiro, C., Lino, C., Pena, A., 2020. Selected Pharmaceuticals in Different Aquatic Compartments: Part I—Source, Fate and Occurrence. *Molecules* 25, 1026. <https://doi.org/10.3390/molecules25051026>
- Philippe, C., Grégoir, A.F., Janssens, L., Pincheel, T., De Boeck, G., Brendonck, L., 2017. Acute and chronic sensitivity to copper of a promising ecotoxicological model species, the annual killifish *Nothobranchius furzeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 144, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.047>
- Pinto, T.J. da S., Rocha, G.S., Moreira, R.A., Silva, L.C.M. da, Yoshii, M.P.C., Goulart, B.V., Montagner, C.C., Daam, M.A., Espindola, E.L.G., 2021. Multi-generational exposure to fipronil, 2,4-D, and their mixtures in *Chironomus sanctiparoli*: Biochemical, individual, and population endpoints. *Environmental Pollution* 283, 117384. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117384>
- Reátegui-Zirena, E.G., Fidler, B.N., Olson, A.D., Dawson, D.E., Bilbo, T.R., Salice, C.J., 2017. Transgenerational endpoints provide increased sensitivity and insight into multigenerational responses of *Lymnaea stagnalis* exposed to cadmium. *Environmental Pollution* 224, 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.040>
- Salice, C.J., Anderson, T.A., Roesijadi, G., 2010. Adaptive responses and latent costs of multigeneration cadmium exposure in parasite resistant and susceptible strains of a freshwater snail. *Ecotoxicology* 19, 1466–1475. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0532-x>
- Salice, C.J., Miller, T.J., Roesijadi, G., 2009. Demographic Responses to Multigeneration Cadmium Exposure in Two Strains of the Freshwater Gastropod, *Biomphalaria glabrata*. *Arch Environ Contam Toxicol* 56, 785–795. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9203-9>
- 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. *Science of The Total Environment* 407, 1937–1946. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.004>
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., Hayasaka, D., 2016. Contamination of the Aquatic Environment with Neonicotinoids and its Implication for Ecosystems. *Frontiers in Environmental Science* 4, 71. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00071>
- Schür, C., Zipp, S., Thalau, T., Wagner, M., 2020. Microplastics but not natural particles induce multigenerational effects in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 260, 113904. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113904>
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 302–314. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00039-8](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00039-8)
- Silva, A.R.R., Cardoso, D.N., Cruz, A., Pestana, J.L.T., Mendo, S., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2017. Multigenerational effects of carbendazim in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 383–394. <https://doi.org/10.1002/etc.3541>
- Stanley-Samuelson, D.W., 1994. The Biological Significance of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates 12. *American Zoologist* 34, 589–598. <https://doi.org/10.1093/icb/34.6.589>
- Suski, J.G., Salice, C.J., Patiño, R., 2012. Species-specific and transgenerational responses to increasing salinity in sympatric freshwater gastropods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2517–2524. <https://doi.org/10.1002/etc.1972>
- Svgruha, R., Fodor, I., Padisak, J., Pirger, Z., 2021. Progesterone-induced alterations and their ecological relevance in different embryonic and adult behaviours of an invertebrate model species, the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*). *Environ Sci Pollut Res* 28, 59391–59402. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12094-z>
- van Wezel, A.P., Sijm, D.T.H.M., Seinen, W., Opperhuizen, A., 1995. Use of lethal body burdens to indicate species differences in susceptibility to narcotic toxicants. *Chemosphere* 31, 3201–3209. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00181-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00181-7)
- Vorontsov, D.D., Tsyganov, V.V., Sakharov, D.A., 2003. Central Mechanisms that Control Respiration in the Pulmonate Snail *Lymnaea stagnalis*: Phasic Coupling of Lung Ventilation to Cyclic Locomotion. *Doklady Biological Sciences* 391, 303–305. <https://doi.org/10.1023/A:1025134130009>
- Yokota, H., Higashi, K., Hanada, E., Matsuzaki, E., Tsuruda, Y., Suzuki, T., Nakano, E., Eguchi, S., 2017. Recovery from reproductive and morphological abnormalities in medaka (*Oryzias latipes*) following a 14-day

- exposure to diclofenac. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 3277–3283. <https://doi.org/10.1002/etc.3899>
- Yokota, H., Taguchi, Y., Tanaka, Y., Uchiyama, M., Kondo, M., Tsuruda, Y., Suzuki, T., Eguchi, S., 2018. Chronic exposure to diclofenac induces delayed mandibular defects in medaka (*Oryzias latipes*) in a sex-dependent manner. *Chemosphere* 210, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.016>
- Żbikowska, E., Kobak, J., Żbikowski, J., Kąkolewski, J., 2006. Infestation of *Lymnaea stagnalis* by digenean flukes in the Jeziorak Lake. *Parasitol Res* 99, 434–439. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0178-z>
- Zhang, K., Yuan, G., Werdich, A.A., Zhao, Y., 2020. Ibuprofen and diclofenac impair the cardiovascular development of zebrafish (*Danio rerio*) at low concentrations. *Environmental Pollution* 258, 113613. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113613>

---

---

**CHAPITRE IV : Discussion générale**

---

---



## I. Application des méthodes omiques chez *Lymnaea stagnalis*

L'objectif principal de cette thèse était la caractérisation des effets du DCF à long terme chez le gastéropode dulcicole *L. stagnalis*. Afin de répondre à cet objectif, nous avons mis en œuvre plusieurs approches omiques. A l'échelle moléculaire, bien que les organes étudiés aient été sélectionnés sur la base d'un impact potentiel sur la reproduction et le système nerveux (Bonafille et al. 2018 ; Świacka et al., 2021), les approches transcriptomique et métabolomique choisies ont permis une étude sans a priori des effets moléculaires, conduisant à la formulation d'hypothèses sur l'impact du DCF après interprétation biologique des résultats obtenus.

### A. Métabolomique

L'approche métabolomique a permis l'identification de métabolites appartenant à diverses catégories (acides aminés, carbohydrates, nucléotides), dans les deux organes étudiés (appareils reproducteurs et têtes). La méthode analytique utilisée (LC-HRMS) semble donc appropriée pour l'étude du métabolome de *L. stagnalis*. Cependant, nous nous sommes intéressés ici uniquement à la fraction polaire du métabolisme. La fraction apolaire aurait également pu apporter des éléments de réponse pertinents, surtout au regard des niveaux sous-modulés de carnitine et d'acétylcarnitine, qui sont impliquées dans le transport des acides gras (Longo et al., 2016). Si nous avions choisi d'explorer la fraction apolaire, la plateforme GC-MS aurait été plus efficace que la LC-MS pour la détection des composés hydrophobes, ce qui a été corroboré par Tufi et al. (2015a) dans le cadre d'une étude multiplateforme de profilage métabolique de plusieurs organes de *Lymnaea stagnalis*.

Les techniques MS présentent l'avantage d'être sensibles (Robertson, 2005), ce qui a été confirmé ici avec la détection de milliers de signaux dans les deux modes d'ionisation (ESI- et ESI+). Cependant, l'identification des signaux générés constitue une étape limitante en métabolomique. Dans cette étude, malgré l'utilisation d'une banque interne de plus de 280 métabolites, seuls 87 métabolites ont pu être confirmés avec certitude dans l'appareil reproducteur, et 70 dans les têtes. Cette identification, même si elle a été complétée avec une annotation putative des signaux basée sur la masse des ions détectés, reste imparfaite. L'utilisation d'outils de construction de réseaux de similarité spectrale tels que GNPS et Cytoscape par exemple (Shannon et al., 2003; Wang et al., 2016), pourrait être une piste d'amélioration. Une annotation des signaux enrichie avec des métabolites et des voies métaboliques spécifiques du gastéropode nous permettrait également d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats.

Une difficulté associée au protocole utilisé est la petite taille des organes de *L. stagnalis*, qui a nécessité de pooler les échantillons et n'a pas permis une étude à l'échelle individuelle. De plus, le système nerveux central n'a pas été prélevé spécifiquement et l'étude a été réalisée sur les têtes afin

d'assurer une quantité suffisante de tissus. Une alternative à la normalisation des prises d'essai par la pesée est la normalisation par la quantité de protéines telle qu'utilisée par Tufi et al. (2015b). Cette méthode a permis une étude d'impact de l'imidaclopride sur le système nerveux central de la limnée, en travaillant sur l'organe entier non lyophilisé. Cependant, dans notre étude, malgré les faibles quantités de prises d'essais et les pools réalisés, l'approche métabolomique a permis d'identifier un certain nombre de métabolites modulés et de formuler des hypothèses d'impact du DCF chez la limnée. Cela confirme l'intérêt de la métabolomique dans l'évaluation des effets d'un xénobiotique chez les organismes non-cibles.

## B. Transcriptomique

La méthode RNA-Seq a permis d'identifier les gènes différentiellement exprimés sans a priori. La difficulté de cette étude a été l'annotation des transcrits identifiés, qui a été faite sur la base d'autres espèces, de même que l'annotation fonctionnelle. En effet, seules 50 protéines de *L. stagnalis* ont été listées sur la base de donnée Swiss-Prot (UniProt Knowledge Base), contenant les protéines pour lesquelles des informations de la littérature sont disponibles. Parmi celles-ci, seuls les gènes codant pour l'oxyde nitrique synthase (NOS) (ID : O61309), la prohormone d'ovulation (ID : P06308) et l'épidermal growth factor (EGF) (ID : Q9GU69) ont été identifiés comme différentiellement exprimés chez les limnées exposées au DCF comparé aux contrôles. Cependant, plus de 50% des gènes identifiés comme différentiellement exprimés ont pu être annotés en se basant sur les protéines référencées chez d'autres espèces et près de 20% ont pu être annotées en se basant sur des protéines non référencées. Une analyse des domaines fonctionnels des protéines a pu être réalisée pour les séquences non annotées ou non référencées.

L'interprétation biologique reste un problème complexe, bien que les analyses d'enrichissement à partir de listes de gènes aient été développées ces dernières années. Le système de classification de Gene Ontology ([geneontology.org](http://geneontology.org)) permet de regrouper les gènes appartenant à la même localisation cellulaire, fonction moléculaire ou processus biologique (Fig. IV-1). Dans le cas de notre étude, cette analyse a montré des résultats similaires quel que soit l'organe étudié. On peut toutefois noter quelques différences, avec des gènes impliqués dans la croissance, le comportement ou la destruction des cellules, qui sont différentiellement exprimés plutôt dans les têtes. Cependant ces analyses mettent souvent en avant les mêmes catégories (Lee et al., 2015; Liao et al., 2016; Zhang et al., 2020). En effet, dans ces 3 études comme dans la nôtre, le *binding* et l'activité catalytique sont des fonctions moléculaires fortement représentées ; et les composés cellulaires les plus impactés sont la cellule, l'organelle et la membrane. Les processus biologiques identifiés sont plus variables mais les processus métaboliques et cellulaires sont bien souvent majoritaires.

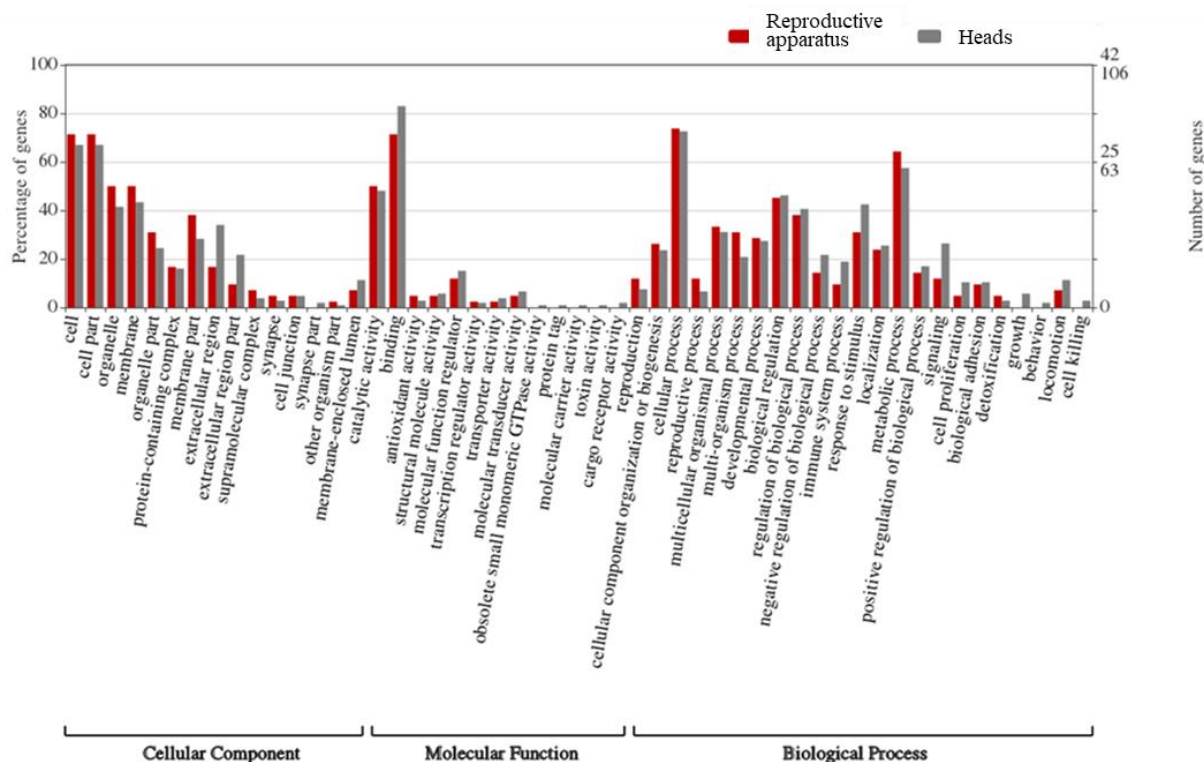


Figure IV-1 – Graphique représentant les GO terms des gènes différemment exprimés dans les appareils reproducteurs (en rouge) et les têtes (en gris) des limnées exposées au diclofénac lors de l'étude présentée dans le chapitre III. Le graphique a été tracé avec WEGO (Web Gene Ontology Annotation Plotting) (Ye et al., 2018).

Cette surreprésentation de certaines catégories peut conduire à passer à côté de processus impactés impliquant moins de gènes mais avec un sens biologique plus important (Oomen and Hutchings, 2017). D'autres approches sont possibles, telles que la construction d'un réseau de coexpression des gènes, qui permet de mettre en avant des groupes de gènes interconnectés ayant une forte probabilité de participer à des processus biologiques communs (Fu et al., 2014). Cependant, l'abondance d'un ARNm n'est pas forcément corrélée à l'abondance des protéines, rendant l'interprétation plus complexe encore. Dans cette étude, l'interprétation des résultats transcriptomiques a été guidée par les résultats métabolomiques, appuyant l'intérêt des études réalisées à plusieurs échelles biologiques.

### C. Intégration des données métabolomiques et transcriptomiques

L'intégration des données de métabolomique et de transcriptomique est complexe car il n'existe pas de lien direct entre métabolite et transcrit, comme cela peut exister entre les transcrits et les protéines par exemple (Cavill et al., 2016). Cette intégration des données est facilitée dans le cas où les deux méthodes omiques ont été conduites sur les mêmes individus ou les mêmes organes. Dans la présente étude, les faibles quantités de tissus disponibles au regard des besoins pour la méthode métabolomique ont été limitantes et n'ont pas permis de diviser les organes entre la transcriptomique et la métabolomique, bien que les deux approches aient été appliquées aux têtes et aux appareils



reproducteurs. Il existe plusieurs stratégies pour l'intégration des données qui ont été suggérées par Ebbels and Cavill (2009) : conceptuelle, statistique ou basée sur un modèle. L'intégration conceptuelle consiste à traiter indépendamment les résultats transcriptomique et métabolomique puis de les mettre en correspondance sans réaliser une analyse statistique de l'ensemble des données. L'intégration statistique se concentre sur les relations statistiques entre les données omiques, tandis que l'intégration basée sur un modèle superpose les données omiques à des modèles prédéfinis, dans le but de comprendre l'organisation et la fonction moléculaires (Santiago-Rodriguez and Hollister, 2021). L'intégration statistique peut conduire à des résultats complexes à interpréter, surtout lorsque des études de corrélation sont réalisées car les métabolites et transcrits d'enzymes impliquées dans les réactions biochimiques peuvent avoir des relations de corrélation inverses (Cavill et al., 2016). Les intégrations basées sur un modèle ne sont pas évidentes car les systèmes ne sont pas toujours complets et la représentation de systèmes complexes est limitée. Ces deux dernières approches n'ont par conséquent pas été appliquées ici.

Une intégration conceptuelle a été expérimentée avec nos résultats, en utilisant l'outil iPath3 (Darzi et al., 2018). Les voies métaboliques modulées dans cette étude, en intégrant les données métabolomique et transcriptomique, ont été mises en lumière par cette analyse. Les résultats de cette approche, présentés en Annexe IV, se sont révélés peu informatifs et ne mettent pas en évidence de voies métaboliques modulées simultanément au niveau des transcrits et des métabolites. En effet, l'assignation aux gènes différentiellement exprimés (DEG) d'un identifiant pouvant être représenté au niveau des voies métaboliques a été complexe, au regard des annotations provenant d'espèces diverses. Tous les métabolites modulés ainsi que les DEGs n'ont par conséquent pas pu être représentés sur la carte, ne mettant pas en évidence de recouvrement. De plus, le fait que les études aient été conduites sur des organes provenant d'individus différents rend l'intégration des données moins pertinente. Dans la discussion de l'article n°2, nous avons par conséquent interprété les données métabolomiques et transcriptomiques en nous intéressant au sens biologique global, ce qui nous a permis de proposer des hypothèses. Par exemple, il a été supposé que le DCF pouvait avoir un effet neurotoxique, à la fois au regard des métabolites modulés (glutamate et guanosine) et de la sous-expression de gènes impliqués dans la neurogenèse dans les têtes des limnées exposées. Ces résultats appuient la pertinence de cette étude, de même que le fait que des métabolites et des transcrits d'enzyme impliqués dans la même réaction aient été identifiés comme modulés par l'exposition au DCF, bien que nous soyons chez des individus différents.

## II. Effets du DCF chez *L. stagnalis*

### A. Toxicité liée aux voies de biotransformation du diclofénac

Le métabolisme du DCF chez la limnée a pu être exploré avec la méthode présentée lors du chapitre II. Cette étude a permis d'identifier deux voies de métabolisation principales des produits organiques chez la limnée, l'hydroxylation (Phase I) et la glucosidation (Phase II). Cependant, la concentration d'exposition, supérieure aux concentrations environnementales (300 µg/L), pourrait privilégier des voies métaboliques spécifiquement activées à concentrations élevées. Cette concentration a été choisie de manière à s'assurer des concentrations de métabolites formés détectables dans le cadre d'une étude non ciblée. Une perspective de ce travail serait donc d'explorer les métabolites formés à concentration plus faible, en ciblant ceux qui ont été détectés lors de cette étude, afin d'observer les potentielles différences.

Cependant, il s'agit d'une première étape importante dans l'évaluation des effets du DCF chez la limnée car plusieurs études ont montré que la toxicité cellulaire du DCF était liée à son métabolisme, plus particulièrement le métabolisme accompli par les cytochromes P450 (CYP) (Bort et al., 1999; van Leeuwen et al., 2011). Chez la limnée, les métabolites de Phase I identifiés dans notre étude sont similaires à ceux formés dans des cultures d'hépatocytes humains (Castell et al., 1997) qui sont les 4'- et 5-hydroxydiclofénac (4' et 5OH-DCF), le DCF lactame, le 4'OH-DCF lactame, et le N,5-dihydroxydiclofénac (N,5-diOH-DCF). Parmi ces métabolites, Bort et al. (1999) ont observé que la toxicité du DCF sur les hépatocytes humains était corrélée à la présence du N,5-diOH-DCF, putativement identifié chez la limnée. Le N,5-diOH-DCF est issu de l'oxydation du 5OH-DCF. Lors de l'incubation de microsomes de foie de rat avec du NADPH, il a été montré que le N,5-diOH-DCF peut reformer le 5OH-DCF en consommant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) jusqu'à l'atteinte d'un équilibre entre le 5'OH-DCF et le N,5-diOH-DCF. Ces réactions vont entraîner une déplétion en NADPH dans la cellule, et suggèrent la présence d'une enzyme hydroxylamine réductase entraînant la consommation de NADPH. Les flavin reductases pourraient être impliquées dans ces réactions de réduction des hydroxylamines (Wittich et al., 2008), et nous avons observé de manière intéressante une surexpression du transcrite de la NADPH-dépendante diflavin oxydoréductase 1 (NDOR1) dans les appareils reproducteurs des limnées adultes exposées toute leur vie à 0,1 µg/L de DCF (Annexe II). De même, le gène codant pour l'oxyde nitrique synthase (NOS), qui est également une diflavin oxydoréductase, est surexprimé dans les têtes et les appareils reproducteurs de limnées exposées toute leur vie au DCF. Il a été suggéré que la NDOR1 et la NOS puissent avoir un rôle dans l'activation d'un promédicament, le PR-104, via une réaction de nitroréduction, cependant leur rôle potentiel dans le métabolisme des médicaments est encore peu compris (Guise et al., 2012).

Le 5'OH-DCF et le N,5-diOH-DCF vont pouvoir donner naissance à des p-benzoquinone imines - également détectées dans notre étude chez la limnée - capables de se lier de façon covalente aux protéines et d'y exercer un effet toxique (Shen et al., 1999). Cette liaison covalente est inhibée par la présence de glutathion sous forme réduite (GSH) et de NADPH. La déplétion de NADPH induite par le métabolisme pourrait par conséquent diminuer l'inhibition des liaisons covalentes entre les p-benzoquinone imines et les protéines et favoriser un effet toxique. De plus, le NADPH est consommé pour la régénération des cytochromes P450 (CYP) impliqués dans les réactions d'hydroxylation (Aglédal et al., 2010), qui semblent être une voie de détoxification majeure chez *L. stagnalis* au vu des métabolites identifiés dans le chapitre II (Hallett et al., 2016; Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000).

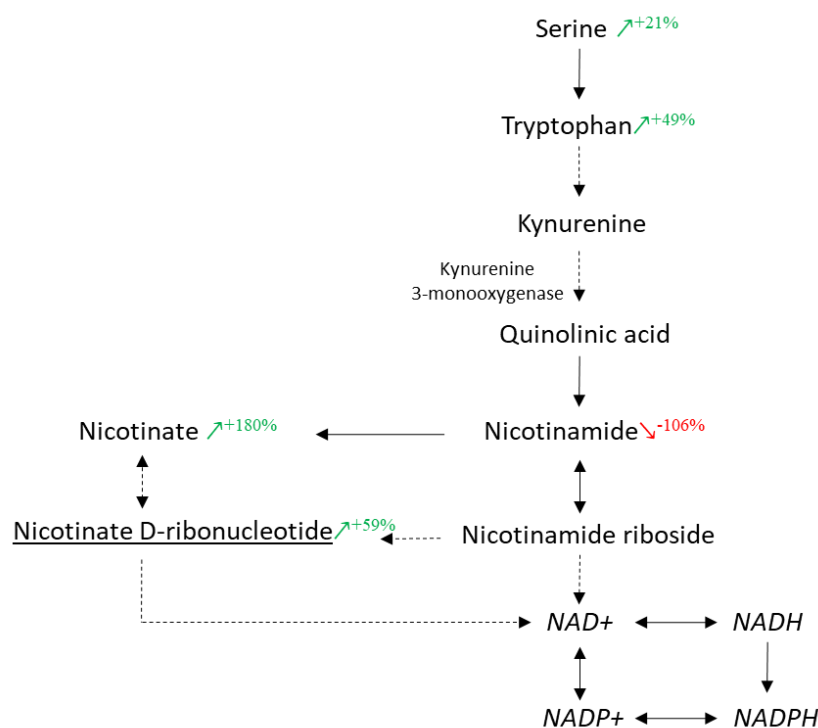


Figure IV-2 – Métabolites de la voie de formation de novo du NAD<sup>+</sup> sur modulés (↗) et sous modulés (↘) dans l'appareil reproducteur de limnées exposées 16 semaines au DCF (10 µg/L). Le métabolite souligné a été identifié avec un niveau d'annotation de 2 (Sumner et al., 2007), les métabolites en italique n'ont pas été identifiés. ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

La voie de synthèse *de novo* du NAD<sup>+</sup> est modulée par le DCF après une exposition chronique à 10 µg/L (Fig. IV-2). En plus des métabolites modulés, le gène codant pour la kynurenine 3-monooxygénase, enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide quinolinique à partir de la kynurénine, a été observé comme surexprimé dans les têtes des limnées exposées toute leur vie à 0,1 et 10 µg/L de DCF (Smith et al., 2016). Le NAD<sup>+</sup> peut ensuite être converti par la NAD<sup>+</sup> kinase en NADP<sup>+</sup>, qui est le précurseur du NADPH (Ying, 2008). La combinaison de ces études pourrait montrer une probable perturbation par le DCF des réactions d'oxydoréduction nécessaires au fonctionnement normal de l'organisme, qui peut être la conséquence de l'induction des voies métaboliques de détoxification (Fig. IV-3).

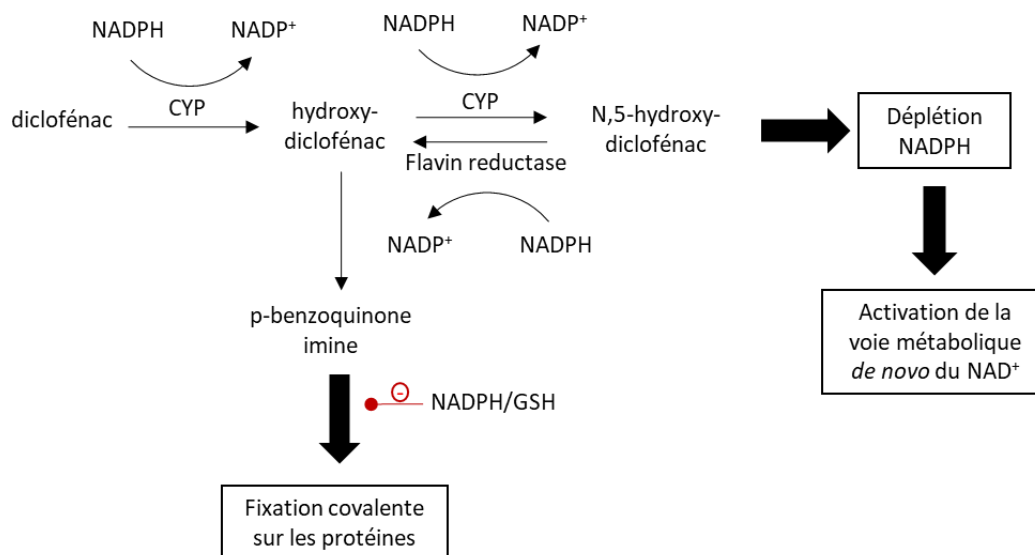


Figure IV-3 – Hypothèses des conséquences du métabolisme du DCF chez la limnée.

## B. Effets chroniques du DCF chez *L. stagnalis*

Les effets du DCF chez la limnée ont été évalués après une exposition à 0,1, 2 et 10 µg/L pendant toute la durée du cycle de vie et sur plusieurs générations. Nous avons pu mettre en évidence un faible impact du DCF sur la physiologie et le comportement des organismes de la génération parentale, qui s'est accru sur la descendance. Les approches moléculaires ont été conduites sur la génération parentale uniquement, au stade adulte, sur les têtes et les appareils reproducteurs de limnées exposées toute leur vie à 0,1 et 10 µg/L. Le métabolisme de l'acide arachidonique a été modulé par le DCF dans cette étude, avec des modifications des niveaux de prostaglandines associées à une surexpression du gène codant pour la prostaglandine réductase 1. Le mécanisme d'action du DCF, qui conduit à une diminution de synthèse des prostaglandines via une inhibition de la COX, pourrait donc être similaire chez l'homme et chez la limnée.

### 1. Effets moléculaires et hypothèses

A l'échelle moléculaire, les approches métabolomiques et transcriptomiques ont mis en évidence des différences dans les niveaux de métabolites et d'expression des gènes entre les organismes exposés et contrôles de la génération parentale, nous conduisant à formuler des hypothèses (Fig. IV-4).

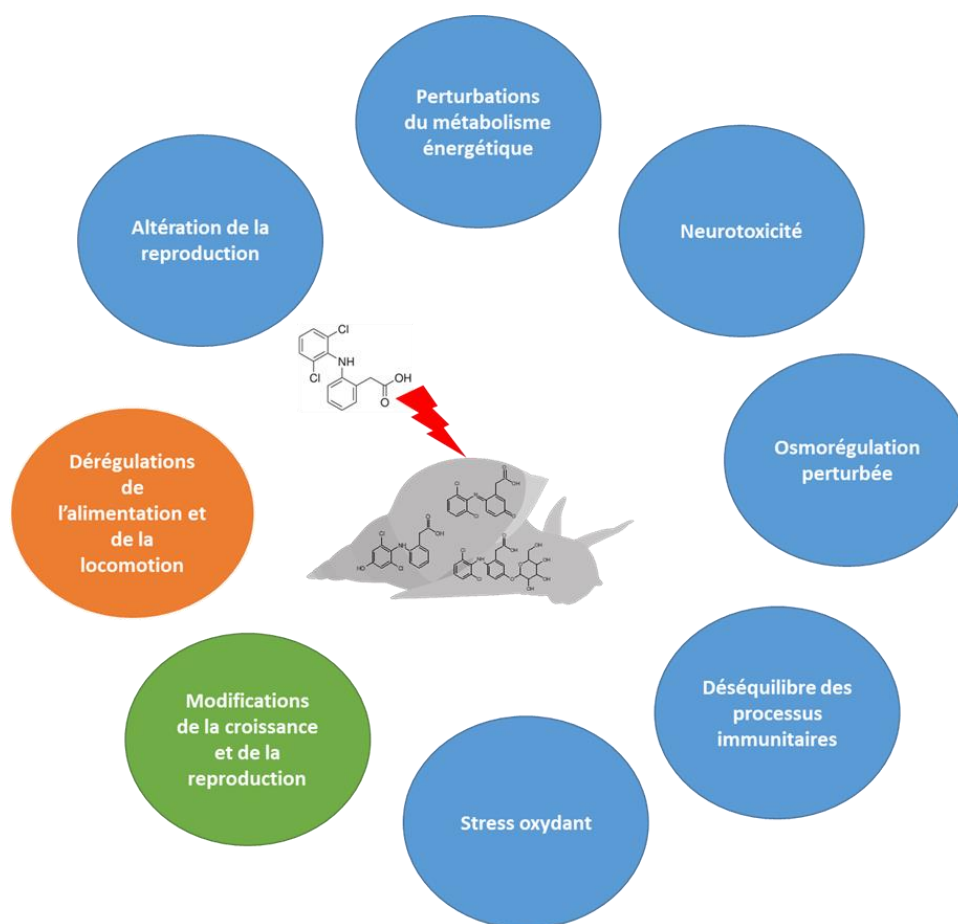


Figure IV-4 – Fonctions perturbées chez *L. stagnalis* suite à une exposition chronique au DCF. En bleu sont représentés les effets supposés du DCF au vu des modifications observées à l'échelle moléculaire ; en vert les paramètres d'histoire de vie et en orange les paramètres comportementaux.

Les modifications des niveaux de NAD(P)H suggérées dans le précédent paragraphe peuvent expliquer certaines des modifications observées à l'échelle moléculaire dans cette étude chronique. En effet, nous avons observé des modifications du métabolisme énergétique, avec des diminutions des niveaux de carnitine et d'acétylcarnitine, qui sont impliquées dans le transport des acides gras à travers la membrane mitochondriale. Ces transporteurs jouent un rôle majeur dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras, conduisant à la formation d'ATP. De plus, les niveaux d'adénine et d'adénosine, à la base de la production d'ATP, sont augmentés. Nous avons émis l'hypothèse dans l'article n°2 que ces modifications pouvaient être liées à une augmentation des besoins en ATP, cependant ces nouvelles considérations laissent plutôt penser que les besoins en NADPH pour le métabolisme entraînent une déplétion en NADH, composé nécessaire dans la phosphorylation oxydative permettant la libération des molécules d'ATP. Les niveaux d'adénine et d'adénosine augmentés seraient donc une conséquence d'une diminution de synthèse d'ATP, qui conduirait à leur accumulation. Il a par ailleurs été montré que le DCF induit une inhibition de la synthèse de l'ATP sur des mitochondries de foie de rat (Syed et al., 2016).

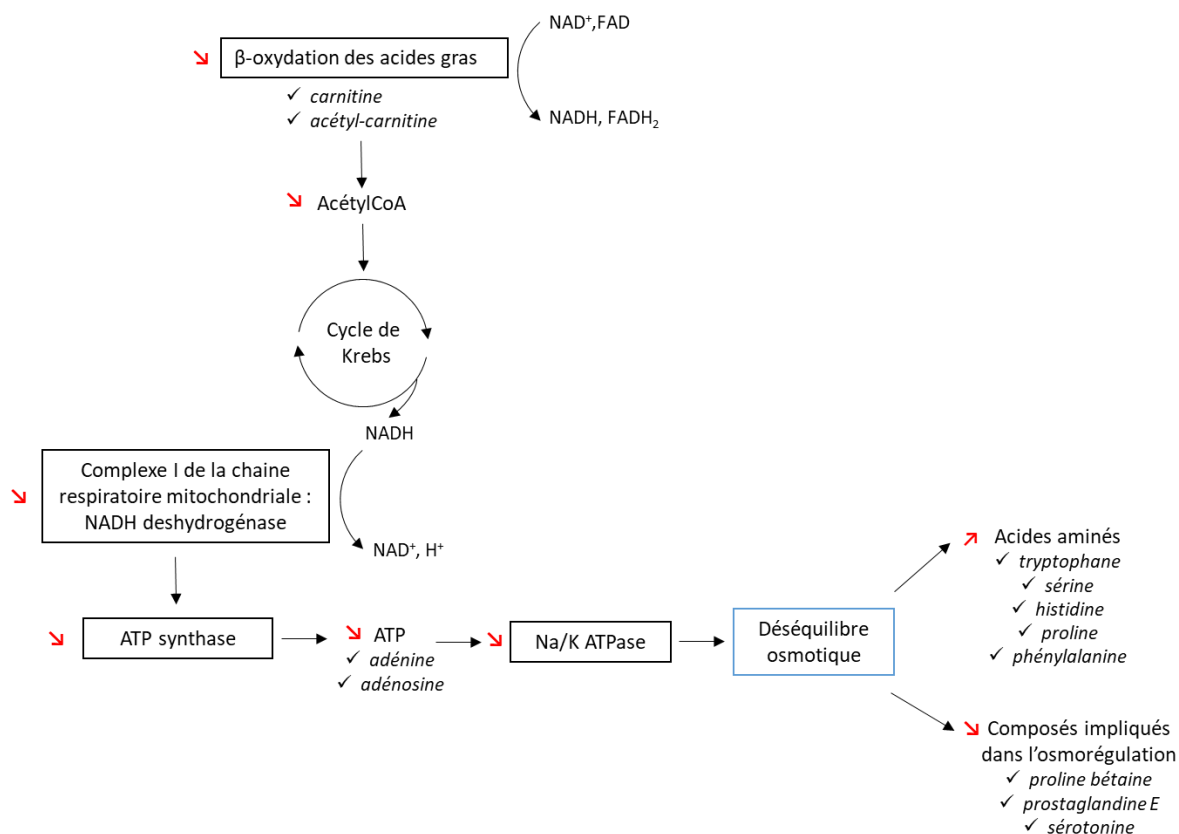


Figure IV-5 – Hypothèses de l'impact d'une exposition au DCF sur le métabolisme énergétique de la limnée et conséquences sur l'osmorégulation. Les métabolites inscrits en italique ont été observés comme modulés chez les limnées exposées au DCF pendant tout leur cycle de vie, à 0,1 ou 10  $\mu\text{g/L}$ , les flèches rouges représentent l'impact supposé du DCF.

L'osmorégulation pourrait être une fonction impactée par le DCF au vu de l'augmentation des niveaux d'acides aminés chez l'organisme, cependant nous n'avons pas développé de méthode pour explorer cette piste dans cette étude. L'activité osmorégulatrice a déjà été montrée comme étant une fonction ciblée par le DCF chez le crabe *C. maenas* après une exposition à 10 et 100  $\text{ng/L}$  pendant 7 jours (Eades and Waring, 2010). Cet effet du DCF pourrait être lié à son impact sur l'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (aussi appelée pompe sodium potassium) qui a été démontré chez le poisson (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*) (Ajima et al., 2021; Pandey et al., 2017; Saravanan et al., 2011). Cette activité a été évaluée en mesurant les quantités de phosphore inorganique formé dans les tissus de poisson en présence d'ATP, test que nous n'avons pas mis au point dans notre étude. Cependant, la diminution hypothétique des niveaux d'ATP produits pourrait impacter le fonctionnement de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Fig. IV-5). L'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase régit l'équilibre osmotique des cellules en permettant l'entrée de  $\text{K}^+$  dans la cellule et la sortie de  $\text{Na}^+$  dans le milieu extracellulaire. La circulation des substances au travers de la membrane cellulaire pourrait alors être altérée et par conséquent l'activité osmorégulatrice serait affectée (Castilho et al., 2001; Tipsmark and Madsen, 2001).

De même, le déséquilibre de la balance antioxydante peut être fortement corrélé aux niveaux de NADPH (Fig. IV-6). En effet, le NADPH est un cofacteur nécessaire dans le maintien et la régénération

des systèmes antioxydants, comme la régénération du GSH à partir du GSSG (Agledal et al., 2010). Nous avons pu voir une diminution des niveaux de disulfure de cystéine et glutathion (CySSG) dans les têtes des limnées exposées à 0,1 et 10 µg/L, composé formé à partir du glutathion sous forme oxydée (GSSG) (Goralski et Ram., 2022). Cette sous-modulation pourrait être liée à un déséquilibre de la balance GSH/GSSG en faveur du GSH. Nous avons également observé dans l'appareil reproducteur des limnées exposées à 10 µg/L une surexpression du gène codant la proenzyme de la glutathion hydrolase 1 (GGT1). Cette enzyme catalyse la réaction de dégradation du GSH en glutamate et cystéinyl-glycine (Wickam et al., 2011). L'accumulation hypothétique de GSH pourrait donc activer sa voie de dégradation. De plus, nous avons mis en évidence des une augmentation des niveaux de glutamate dans les têtes de limnées. Nous avons observé des changements d'expression des systèmes antioxydants au niveaux des transcrits, avec par exemple une forte sous-expression du gène codant pour la superoxyde dismutase (SOD) dans les têtes de limnées. De plus, les activités dual oxydases (DUOX), isoformes de la NAD(P)H oxydase (Guichard et al., 2006), nécessitent également du NAD(P)H dans leur fonctionnement, qui vise à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le gène codant pour la DUOX2 a été identifié comme sous-exprimé dans les appareils reproducteurs des limnées exposées à 10 µg/L, ce qui pourrait être un rétrocontrôle afin de limiter la consommation de NADPH. Les effets décrits précédemment dans ce paragraphe ont été observés chez les limnées exposées à 10 µg/L, seul le gène codant pour la SOD est également sous-exprimé chez les organismes exposés à 0,1 µg/L, mettant en évidence une relation concentration-réponse.

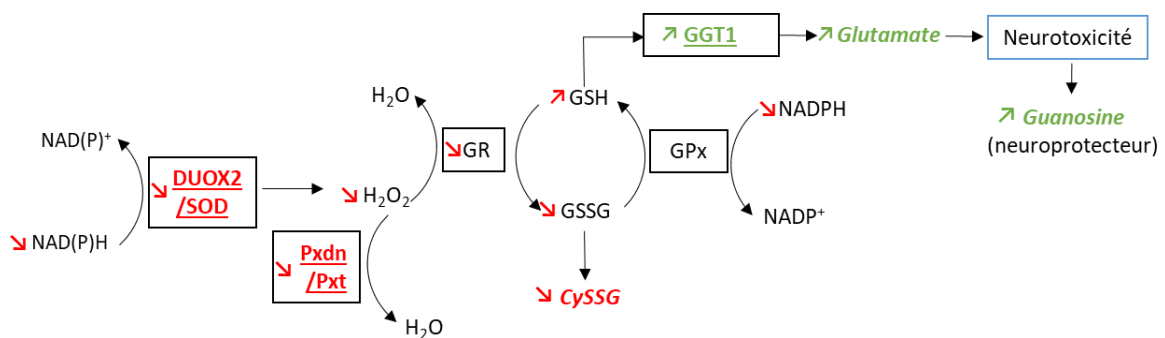


Figure IV-6 – Hypothèses des effets du DCF sur les réactions d'oxydoréduction. Les flèches représentent le sens des modulations hypothétiques ; les composés en rouge ont été identifiés comme sous-modulés ou sous-exprimés, les composés en vert comme sur-modulés ou sur-exprimés chez les limnées exposées toute leur vie à 10 µg/L de DCF. En italique sont représentés les métabolites, en souligné sont représentés les DEGs. CySSG : Disulfure de cystéine et glutathion ; DUOX2 : Dual oxydase 2 ; GGT1 : Glutathion hydrolase 1 ; GPx : Glutathion peroxydase ; GR : Glutathion réductase ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; Pxdn : Peroxydasine ; Pxt : Chorion peroxydase ; SOD : Superoxyde dismutase.

Les ERO sont impliquées dans la défense de l'hôte et produits par les phagocytes en réponse à des stimuli microbiens ou inflammatoires (Leavy, 2014). Boisseaux et al. (2017) ont identifié une réponse inflammatoire du DCF chez *L. stagnalis* après une exposition de 3 jours. Etant donné les temps d'exposition supérieurs dans notre étude, nous n'avons pas de certitude sur l'induction d'une réponse

inflammatoire à long terme. Cependant, nous avons bien observé des modulations de la balance immunitaire, au niveau des gènes (Annexe II), ainsi qu'au niveau des métabolites, avec notamment une surmodulation du pyridoxal, un métabolite impliqué dans l'inflammation.

Un impact neurotoxique a été suggéré par les modifications observées à l'échelle moléculaire. La métabolomique a mis en évidence une augmentation des niveaux de guanosine dans les têtes, connue pour être neuroprotective contre la neurotoxicité induite par le glutamate, surmodulé également (Fig. IV-6). De plus, nous avons observé une sous-expression de gènes impliqués dans la neurogenèse, qui semble confirmer cet effet neurotoxique. Cependant, cela n'a pas été traduit par un effet sur le comportement des organismes à l'échelle macroscopique.

## 2. Paramètres physiologiques

Au niveau des paramètres physiologiques étudiés, l'éclosion des pontes a été touchée par le DCF dans la génération F2 uniquement, avec une éclosion plus rapide des œufs exposés à 10 µg/L. L'impact du DCF sur la croissance a été démontré à chaque génération exposée de manière variable et pourrait être lié à une réponse hormétique de l'organisme. Nous avons cependant observé une réponse biphasique uniquement dans la génération F1, avec une croissance plus rapide à 0,1 µg/L et une croissance ralentie à 2 et 10 µg/L. Dans le cas des générations F0 et F2, les individus exposés ont montré une croissance globale plus rapide, quelle que soit la concentration d'exposition. Nous n'avons pas réalisé d'étude omique aux stades embryonnaires et juvéniles, et par conséquent nous n'avons pas d'informations sur les mécanismes moléculaires sous-jacents.

La fonction reproductrice, quant à elle, est altérée à l'échelle moléculaire dans la génération parentale, bien que la production de pontes par l'organisme ne soit pas modifiée par l'exposition au DCF. Cependant, dans les générations F1 et F2, une diminution du nombre d'œufs par ponte produite par la F1 et une augmentation du nombre de pontes produites par individu dans la génération F2 ont été observées. Les approches métaboliques et transcriptomiques n'ont pas été conduites sur les générations F1 et F2, cependant nous pourrions supposer que les modifications moléculaires vues chez les parents et la descendance seraient similaires, et pourraient expliquer certains effets macroscopiques mis en évidence sur la descendance. Ces résultats confirmeraient la pertinence des marqueurs moléculaires pour identifier les effets précoces d'un contaminant sur un organisme. En effet, une sous-expression du gène codant pour la prohormone d'ovulation a été observée dans les têtes de *L. stagnalis* dans la génération parentale. Cette prohormone est le précurseur de l'hormone d'ovulation (CDCH), connue pour être impliquée dans la régulation du comportement sexuel femelle (Hermann et al., 1997). La production de pontes n'est pas l'unique paramètre qui aurait pu être exploré afin d'évaluer les effets du DCF sur la reproduction. Les spermatozoïdes ont par exemple été altérés



par une exposition au DCF chez plusieurs espèces d'invertébrés aquatiques (Mohd Zanuri et al., 2017). Le comportement joue également un rôle important dans la reproduction. Le comportement mâle, particulièrement, est fortement lié aux conditions extérieures, ce qui le rend sensible aux modifications de son environnement (Dewsbury, 1982; Koene and Ter Maat, 2007). De plus, une surexpression du gène codant pour le récepteur du FMRFamide, neuropeptide impliqué dans le comportement reproducteur mâle a également été identifiée dans les têtes (De Boer et al., 1996).

### 3. Paramètres comportementaux

Le comportement alimentaire a été impacté chez la génération parentale exposée à une concentration de 2 µg/L de DCF avec une consommation de salade plus faible, au stade juvénile uniquement. La prise alimentaire a été diminuée dans la génération F1 exposée à 0,1 et 2 µg/L puis accrue dans la génération F2 exposée à 10 µg/L. Les modifications touchant la fonction alimentaire sont liées aux mécanismes moléculaires, qui apparaissent modulés dans la génération parentale. L'expression du gène codant pour la NOS est augmentée par l'exposition au DCF dans les têtes et les appareils reproducteurs des limnées, cette enzyme générant des oxydes nitriques impliqués dans le contrôle du comportement alimentaire (Elphick et al., 1995; Kobayashi et al., 2000). La surexpression du gène codant pour le récepteur du FMRFamide peut également être le marqueur précoce d'un impact sur l'alimentation car le FMRFamide est un neuropeptide contrôlant négativement l'activité des motoneurons impliqués dans l'alimentation (Kyriakides and McCrohan, 1989).

Le FMRFamide est un neuropeptide impliqué à la fois dans le comportement alimentaire et le comportement sexuel mâle. La diminution de la prise alimentaire dans la génération F1 exposée à 2 µg/L est corrélée à une diminution du nombre d'œufs par ponte. Dans la génération F2 exposée à 10 µg/L, la prise alimentaire augmentée est associée à une augmentation du nombre de ponte par individu. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que ces modifications sont liées à une modification dans les niveaux de ce neuropeptide ou du récepteur associé, qui peuvent donc être des marqueurs précoces d'un impact sur l'alimentation et sur la reproduction.

L'activité locomotrice de la limnée a été modulée uniquement dans la génération F1, avec une augmentation de la distance parcourue chez les limnées exposées à 2 et 10 µg/L. Chez la limnée, les mécanismes impliqués dans la locomotion sont reliés à ceux impliqués dans la respiration (Vorontsov et al., 2003). En réponse à l'exposition au DCF, la ventilation pulmonaire à la surface de l'eau a été favorisée chez *Radix balthica*, indiquant probablement une augmentation des besoins métaboliques en oxygène (Morozov et al., 2021). Le DCF pourrait donc induire une réponse globale de l'organisme conduisant à une augmentation de la ventilation ainsi que de la locomotion.

La réponse au stress lumineux a été le seul paramètre étudié n'ayant pas mis en évidence de réponse différente chez les limnées exposées au DCF par rapport aux contrôles. *L. stagnalis* est décrit comme un organisme se déplaçant par phototaxie (Vakolyuk and Zhukov, 2000). Cela a été confirmé par les tests de réponse au stress lumineux réalisés dans le chapitre III, qui montrent une diminution de l'activité locomotrice dans l'obscurité, puis une reprise à la lumière. Cependant, le DCF n'a pas impacté ce paramètre, bien que des indices de neurotoxicité aient été identifiés au niveau moléculaire chez la génération parentale. Les tests de réponse au stress lumineux avec des transitions « lumière-obscurité » sont utilisés chez les poissons, chez lesquels l'obscurité va préférentiellement provoquer une augmentation de la locomotion par instinct de survie, dans le but d'échapper aux prédateurs (Tegelenbosch et al., 2012). Des xénobiotiques ont déjà montré leur impact sur ce paramètre chez les vertébrés, suggérant une augmentation de l'anxiété par exemple (Velki et al., 2017; Vignet et al., 2014). L'induction d'un stress chez un gastéropode va plutôt conduire à la rétraction du pied dans la coquille afin d'échapper aux prédateurs. Etant donné la réponse opposée de l'arrêt de la lumière sur la locomotion de la limnée, il serait intéressant de tester des molécules ayant montré un impact chez le poisson, comme le diazinon ou le valproate (Ogungbemi et al., 2019), afin de discuter de la pertinence d'inclure ce test réalisé chez *L. stagnalis* dans l'évaluation des effets d'un contaminant sur les organismes non-cibles.

#### 4. Impact spécifique sur la génération F2

La réponse des organismes de la génération F2 exposés à 10 µg/L de DCF indique une réponse globale stimulante. En effet, une éclosion précoce des pontes a été observée, de même qu'une croissance plus rapide, une prise alimentaire augmentée et la production de plus de pontes par individu. Une hypothèse de l'objectif de stimulation de ces processus est une réponse de « compensation de fécondité » par l'organisme, qui vise à atteindre le stade de maturité sexuelle plus tôt afin de maximiser la fonction reproductrice. Cette stratégie a été observée chez les gastéropodes en réponse à une infection parasitaire et peut être suivie par la mort précoce de l'hôte (Žbikowska et al., 2006), ce qui n'a pas été mesuré lors de notre étude, étant donné la longue durée de vie de l'organisme.

#### 5. Conclusion

L'étude d'impact d'un polluant sur un organisme aquatique pendant plusieurs générations a permis de mettre en évidence des dérégulations accrues au cours des générations au niveau des paramètres physiologiques et comportementaux. Ceci confirme l'intérêt des études multigénérationnelles dans l'évaluation du risque liée à un contaminant persistant ou pseudo

persistant dans les eaux. La combinaison d'études réalisées à l'échelle moléculaire sur la génération parentale et multigénérationnelle sur les paramètres physiques et comportementaux a confirmé la pertinence des marqueurs moléculaires comme marqueurs précoces d'impact d'un polluant sur la physiologie de l'organisme. Les effets multigénérationnels observés ont oscillé entre la stimulation et l'inhibition de fonctions, et peuvent résulter de mécanismes adaptatifs causant un déséquilibre dans l'énergie allouée aux différentes fonctions.

Cependant, des améliorations de cette étude auraient pu être réalisées, au regard des recommandations listées par Harris et al. (2014) pour la qualité des études réalisées en écotoxicologie et Batucan et al. (2021), qui ont analysés les publications sorties ces dernières années sur la carbamazépine, le diclofénac et l'ibuprofène dans le domaine de l'écotoxicologie. En effet, il a été identifié que peu d'études d'impact chronique des médicaments en mésocosmes étaient menées. Ces études présentent pourtant une pertinence écologique plus importante. De plus, nous avons pris ici uniquement en compte la voie d'exposition du DCF par la respiration ou le contact direct avec la peau, alors que la voie d'alimentation, par exemple, peut également être une voie d'exposition à explorer. Une autre recommandation de Batucan et al. (2021) est la conduite d'études prenant en compte la combinaison de la pollution médicamenteuse avec des facteurs de stress environnemental connus, comme par exemple le changement climatique, et la pollution azotée et phosphorée. Cela permettrait d'améliorer notre compréhension de l'impact que peuvent avoir les micropolluants sur des écosystèmes déjà soumis à des stress environnementaux majeurs.

---

---

**Conclusion générale et perspectives**

---

---



Le diclofénac (DCF) étant un médicament fortement prescrit et retrouvé dans l'environnement aquatique, il est apparu nécessaire de caractériser le risque posé par sa présence chez les espèces aquatiques non cibles. Ces dernières années, cette molécule a été étudiée sur un large panel d'espèces, vertébrées et invertébrées. Cependant, de nombreuses études ont été réalisées à des concentrations supérieures aux concentrations environnementales et sur des temps d'exposition courts. De plus, peu d'informations sur les mécanismes d'action moléculaires impliqués dans les effets observés à l'échelle de l'individu étaient disponibles. Nous avons donc souhaité contribuer à améliorer les connaissances de l'impact chronique du DCF à concentrations environnementales (0,1 ; 2 et 10 µg/L) sur une espèce benthique, *Lymnaea stagnalis*, en réalisant une étude multigénérationnelle, pendant toute la durée du cycle de vie (3-4 mois) de 3 générations, recouvrant plusieurs échelles d'investigation. Notre premier objectif a été de caractériser le métabolisme du DCF chez la limnée, chez laquelle les voies de détoxification des contaminants organiques étaient peu connues. Notre second objectif a été d'étudier l'impact multigénérationnel du DCF chez la limnée, en étudiant des paramètres physiologiques et comportementaux. Notre troisième objectif a été la compréhension des effets moléculaires induits par une exposition au DCF à l'aide d'approches transcriptomique et métabolomique conduites sur la génération parentale au stade adulte.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence un métabolisme de Phase I majeur chez la limnée, certainement lié à l'activité de cytochromes P450. La présence d'un métabolisme de Phase II a également été observée, avec une importance moins marquée. Chez la génération parentale (F0), la croissance des juvéniles est accélérée par le DCF (0,1 ; 2 et 10 µg/L) et la prise alimentaire est diminuée chez les limnées juvéniles (2 µg/L). Les études transcriptomique et métabolomique réalisées chez les adultes de la génération parentale exposés toute leur vie suggèrent un effet neurotoxique du DCF ainsi que des perturbations du métabolisme énergétique, de l'osmorégulation, des processus immunitaires et une diminution des réponses antioxydantes. Les paramètres reproductifs ainsi que les comportements locomoteur et de prise alimentaire sont modifiés par le DCF après une exposition pendant plusieurs générations. La croissance est systématiquement modulée par une exposition au DCF, quelle que soit la génération observée. A la concentration de 0,1 µg/L, proche des concentrations environnementales, les organismes ont montré une croissance plus rapide dans les générations F0, F1 et F2, ainsi qu'une prise alimentaire diminuée dans la génération F1. Au terme de 3 générations exposées, le DCF semble notamment avoir un effet stimulant sur la reproduction à une concentration de 10 µg/L. Ce constat suggère que les populations benthiques peuvent être impactées par la présence de DCF dans les cours d'eau après une exposition à long terme.

Cependant certains paramètres auraient mérité une investigation plus poussée dans cette étude. Par exemple, l'impact du DCF sur l'osmorégulation de la limnée reste une hypothèse que nous n'avons pas confirmée par une mesure de l'osmolalité de l'hémolymphe ainsi que du milieu. De même,

une étude approfondie des hémocytes aurait pu fournir plus d'informations sur les processus immunitaires perturbés. L'évaluation de l'impact du DCF sur la reproduction aurait pu recouvrir d'autres paramètres, tels que la quantité et la qualité des spermatozoïdes, le comportement reproducteur ou la taille des organes sexuels. Une étude de bioaccumulation du DCF et des métabolites formés chez *L. stagnalis* après exposition à concentration environnementale aurait également pu être réalisée, afin de confirmer ou d'infirmer la présence des métabolites observés ici dans un contexte plus réaliste.

L'approche métabolomique, si elle a permis une analyse du métabolome, aurait pu être menée sur un nombre plus important d'individus, afin d'avoir une meilleure puissance statistique, et ainsi d'identifier avec plus de certitudes les voies métaboliques modulées. Une optimisation de la sensibilité de l'approche aurait permis de travailler sur des organes plus petits et ainsi d'observer spécifiquement le métabolome du système nerveux central pour identifier plus précisément les processus neuronaux modulés. L'approche transcriptomique a été grandement facilitée par la disponibilité du génome de la limnée, mais a été plus complexe dans son interprétation étant donné le manque d'annotation de ce génome. L'annotation fonctionnelle a été réalisée à partir d'autres espèces, pouvant parfois donner lieu à une mauvaise interprétation des processus modulés. Il aurait été cependant intéressant d'appliquer ces approches moléculaires à la fois au stade juvénile, afin d'identifier les voies pouvant conduire à une modification de la croissance, mais aussi chez la descendance (F1 et F2) afin d'identifier si les marqueurs modulés chez la descendance sont identiques à ceux modulés dans la génération parentale. De plus, une mesure des activités des enzymes différenciellement exprimées permettrait de confirmer certaines hypothèses.

Dans cette étude, nous avons développé un test de réponse au stress lumineux avec alternance de phases « lumière/obscurité », qui n'avait jamais été réalisé chez un gastéropode aquatique à notre connaissance. Lors de la phase d'obscurité, les individus ont réagi en diminuant fortement leur locomotion, montrant qu'ils sont sensibles à la présence de lumière. Ce paramètre n'a pas été modulé par l'exposition au diclofénac, cependant il pourrait être intéressant de réaliser ce test avec d'autres types de contaminants qui sont susceptibles d'agir sur cette fonction.

En conclusion, cette étude a permis une évaluation de l'impact multigénérationnel d'une exposition au DCF chez un mollusque aquatique. La compréhension des mécanismes de toxicité du DCF chez *L. stagnalis* a été améliorée, à la fois en caractérisant le métabolisme de détoxification de cette molécule, et en explorant la réponse de l'organisme au niveau du métabolome et du transcriptome. Des effets du DCF ont été mis en évidence sur la physiologie et le comportement des organismes de manière accrue au cours des générations successives, confirmant l'intérêt des études multigénérationnelles. Cependant, le réalisme écologique de cette étude aurait pu être amélioré en prenant en compte d'autres voies d'exposition que le contact cutané comme par exemple la voie

trophique avec l'utilisation de nourriture contaminée, ou en réalisant une étude en mésocosme par exemple. Les impacts répertoriés à long terme chez la limnée dans cette étude confirment le besoin de déterminer une norme de qualité environnementale, telle que suggérée récemment par la Commission européenne, afin de limiter l'impact de cette molécule sur les écosystèmes aquatiques.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, M., Kuroda, R., 2019. The development of CRISPR for a mollusc establishes the formin *Lsdia1* as the long-sought gene for snail dextral/sinistral coiling. *Development* 146, dev175976. <https://doi.org/10.1242/dev.175976>
- Acuña, V., Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barceló, D., 2015. Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environment International* 85, 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.023>
- Agledal, L., Niere, M., Ziegler, M., 2010. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Report* 15, 2–10. <https://doi.org/10.1179/174329210X12650506623122>
- Ajima, M.N.O., Kumar, K., Poojary, N., Pandey, P.K., 2021. Oxidative stress biomarkers, biochemical responses and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activities in *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* exposed to diclofenac. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 240, 108934. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108934>
- 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. *Science of The Total Environment* 669, 11–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.035>
- ANSES, 2019. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de diclofénac dans les eaux destinées à la consommation humaine. Saisine n° 2016-SA-0135.
- ANSM, 2013. Analyse des ventes de médicaments en France en 2013 36.
- Aonuma, H., Mezheritskiy, M., Boldyshev, B., Totani, Y., Vorontsov, D., Zakharov, I., Ito, E., Dyakonova, V., 2020. The Role of Serotonin in the Influence of Intense Locomotion on the Behavior Under Uncertainty in the Mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Frontiers in Physiology* 11, 221. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00221>
- Armengaud, J., Trapp, J., Pible, O., Geffard, O., Chaumot, A., Hartmann, E.M., 2014. Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics. *Journal of Proteomics*, Special Issue: Proteomics of non-model organisms 105, 5–18. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.007>
- Atkinson, D., 1994. Temperature and organism size – a biological law for ectotherms? *Adv. Ecol. Res.* 1–58.
- Bahamonde, P.A., Feswick, A., Isaacs, M.A., Munkittrick, K.R., Martyniuk, C.J., 2016. Defining the role of omics in assessing ecosystem health: Perspectives from the Canadian environmental monitoring program. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 20–35. <https://doi.org/10.1002/etc.3218>
- Batucan, N.S.P., Tremblay, L.A., Northcott, G.L., Mattheai, C.D., 2021. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environmental Advances* 100164. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100164>
- Bernhardt, E.S., Rosi, E.J., Gessner, M.O., 2017. Synthetic chemicals as agents of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* 15, 84–90. <https://doi.org/10.1002/fee.1450>
- Bilan du PNRM, 2015. Bilan du plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux 2011-2015.
- 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. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 4, 213–222. <https://doi.org/10.1080/01651269.1981.10553430>
- Boisseaux, P., Noury, P., Thomas, H., Garric, J., 2017. Immune responses in the aquatic gastropod *Lymnaea stagnalis* under short-term exposure to pharmaceuticals of concern for immune systems: Diclofenac, cyclophosphamide and cyclosporine A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 139, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.003>
- Bonnefille, B., Arpin-Pont, L., Gomez, E., Fenet, H., Courant, F., 2017. Metabolic profiling identification of metabolites formed in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) after diclofenac exposure. *Science of The Total Environment* 583, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.063>
- Bonnefille, B., Gomez, E., Alali, M., Rosain, D., Fenet, H., Courant, F., 2018. Metabolomics assessment of the effects of diclofenac exposure on *Mytilus galloprovincialis*: Potential effects on osmoregulation and reproduction. *Science of The Total Environment* 613–614, 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.146>
- Bonnet, C., Cambois, E., Fontaine, R., 2021. Dynamiques, enjeux démographiques et socioéconomiques du vieillissement dans les pays à longévité élevée *Population* Vol. 76, 225–325. <https://doi.org/10.3917/popu.2102.0225>
- Bort, R., Ponsoda, X., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J., Castell, J.V., 1999. Diclofenac Toxicity to Hepatocytes: A Role for Drug Metabolism in Cell Toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 65–72.

- Castilho, P.C., Martins, I.A., Bianchini, A., 2001. Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 256, 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00315-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00315-4)
- Cavill, R., Jennen, D., Kleinjans, J., Briedé, J.J., 2016. Transcriptomic and metabolomic data integration. *Briefings in Bioinformatics* 17, 891–901. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv090>
- Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H., 2005. The solids retention time—a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. *Water Research* 39, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.08.036>
- Clements, W.H., Rohr, J.R., 2009. Community responses to contaminants: Using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1789–1800. <https://doi.org/10.1897/09-140.1>
- Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters, Hot Spot Pollutants: Pharmaceuticals in the Environment* 142, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00068-7)
- Clouzot, L., Marrot, B., Doumenq, P., Roche, N., 2008. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environmental Progress* 27, 383–396. <https://doi.org/10.1002/ep.10291>
- Coeurdassier, M., De Vaufleury, A., Badot, P.-M., 2003. Bioconcentration of Cadmium and Toxic Effects on Life-History Traits of Pond Snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in Laboratory Bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 0102–0109. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-0152-4>
- Costa, S., Coppola, F., Pretti, C., Intorre, L., Meucci, V., Soares, A.M.V.M., Freitas, R., Solé, M., 2020. The influence of climate change related factors on the response of two clam species to diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189, 109899. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109899>
- Courant, F., Arpin-Pont, L., Bonnefille, B., Vacher, S., Picot-Groz, M., Gomez, E., Fenet, H., 2018. Exposure of marine mussels to diclofenac: modulation of prostaglandin biosynthesis. *Environ Sci Pollut Res* 25, 6087–6094. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9228-6>
- Coutellec MA, et al. Reference genome of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*, a multidisciplinary invertebrate model: overall rationale of the STAGING project. In: Pearls of wisdom: synergising leadership and expertise in molluscan genomics, a Theo Murphy international scientific meeting by the Royal Society. Newport Pagnell: The Royal Society, Chicheley Hall; 2019 <https://royalsociety.org/science-events-and-lectures/2019/09/pearls-of-wisdom/>, n.d.
- Couto, C.F., Lange, L.C., Amaral, M.C.S., 2019. Occurrence, fate and removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) in water and wastewater treatment plants—A review. *Journal of Water Process Engineering* 32, 100927. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100927>
- Czech, P., Weber, K., Dietrich, D.R., 2001. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquatic Toxicology* 53, 103–114. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00169-7)
- Daniele, G., Fieu, M., Joachim, S., James-Casas, A., Andres, S., Baudoin, P., Bonnard, M., Bonnard, I., Geffard, A., Vulliet, E., 2016. Development of a multi-residue analysis of diclofenac and some transformation products in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Application to samples from mesocosm studies. *Talanta* 155, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.016>
- Darzi, Y., Letunic, I., Bork, P., Yamada, T., 2018. iPath3.0: interactive pathways explorer v3. *Nucleic Acids Research* 46, W510–W513. <https://doi.org/10.1093/nar/gky299>
- Daughton, C.G., 2003. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environmental Health Perspectives* 111, 757–774. <https://doi.org/10.1289/ehp.5947>
- Davies, N.M., Anderson, K.E., 1997. Clinical Pharmacokinetics of Diclofenac. *Clin. Pharmacokinet.* 33, 184–213. <https://doi.org/10.2165/00003088-199733030-00003>
- De Boer, P., Jansen, R., Koene, J., Maat, A., 1997a. Nervous control of male sexual drive in the hermaphroditic snail. *Journal of Experimental Biology* 200, 941–951.
- De Boer, P., Jansen, R.F., Maat, A.T., 1996. Copulation in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis*: a review. *Invertebrate Reproduction & Development* 30, 167–176. <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672542>
- De Boer, P., Ter Maat, A., Pieneman, A.W., Croll, R.P., Kurokawa, M., Jansen, R.F., 1997b. Functional role of peptidergic anterior lobe neurons in male sexual behavior of the snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurophysiol* 78, 2823–2833. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.6.2823>

- Dewsbury, D.A., 1982. Ejaculate Cost and Male Choice. *The American Naturalist* 119, 601–610. <https://doi.org/10.1086/283938>
- Di Cicco, M., Di Lorenzo, T., Fiasca, B., Ruggieri, F., Cimini, A., Panella, G., Benedetti, E., Galassi, D.M.P., 2021. Effects of diclofenac on the swimming behavior and antioxidant enzyme activities of the freshwater interstitial crustacean *Bryocamptus pygmaeus* (Crustacea, Harpacticoida). *Science of The Total Environment* 149461. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149461>
- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., Laforsch, C., 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*--a multigenerational study. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.069>
- Ding, J., Lu, G., Liu, J., Yang, H., Li, Y., 2016. Uptake, depuration, and bioconcentration of two pharmaceuticals, roxithromycin and propranolol, in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 126, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.020>
- Dobranskyte, A., Jugdaohsingh, R., McCrohan, C.R., Stuchlik, E., Powell, J.J., White, K.N., 2006. Effect of humic acid on water chemistry, bioavailability and toxicity of aluminium in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*, at neutral pH. *Environmental Pollution* 140, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.030>
- Du, J., Mei, C.-F., Ying, G.-G., Xu, M.-Y., 2016. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol* 97, 84–90. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1806-7>
- Ducrot, V., Teixeira-Alves, M., Lopes, C., Delignette-Muller, M.-L., Charles, S., Lagadic, L., 2010. Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine disruptors on the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: a case-study with vinclozolin. *Ecotoxicology* 19, 1312–1321. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0518-8>
- Dzialowski, E.M., Turner, P.K., Brooks, B.W., 2006. Physiological and Reproductive Effects of Beta Adrenergic Receptor Antagonists in *Daphnia magna*. *Arch Environ Contam Toxicol* 50, 503–510. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0121-9>
- Eades, C., Waring, C.P., 2010. The effects of diclofenac on the physiology of the green shore crab *Carcinus maenas*. *Marine Environmental Research, PRIMO* 15 69, S46–S48. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.11.001>
- Ebbels, T.M.D., Cavill, R., 2009. Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 4, 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2009.07.003>
- Ebele, A.J., Abou-Elwafa Abdallah, M., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants* 3, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>
- Ebner, J.N., 2021. Trends in the Application of “Omics” to Ecotoxicology and Stress Ecology. *Genes* 12, 1481. <https://doi.org/10.3390/genes12101481>
- Elliott, C.J., Benjamin, P.R., 1985. Interactions of pattern-generating interneurons controlling feeding in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurophysiology* 54, 1396–1411. <https://doi.org/10.1152/jn.1985.54.6.1396>
- 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.
- Ericson, H., Thorsén, G., Kumblad, L., 2010. Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels. *Aquatic Toxicology* 99, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.017>
- European Union, 2020. Update on Progress and Implementation: European Union Strategic Approach to Pharmaceuticals in the Environment.
- European Union, 2011. Règlement (UE) no 253/2011 de la Commission du 15 mars 2011 modifiant le règlement (CE) no 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l’enregistrement, l’évaluation et l’autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), en ce qui concerne l’annexe XIII Texte présentant de l’intérêt pour l’EEE 6.
- Faigle, J.W., Böttcher, I., Godbillon, J., Kriemler, H.P., Schlumpf, E., Schneider, W., Schweizer, A., Stierlin, H., Winkler, T., 1988. A new metabolite of diclofenac sodium in human plasma. *Xenobiotica* 18, 1191–1197. <https://doi.org/10.3109/00498258809042242>
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., Van der Bruggen, B., 2019. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of The Total Environment* 654, 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>
- Feng, Z.-P., Zhang, Z., van Kesteren, R., Straub, V., van Nierop, P., Jin, K., Nejatbakhsh, N., Goldberg, J., Spencer, G., Yeoman, M., Wildering, W., Coorsen, J., Croll, R., Buck, L., Syed, N., Smit, A., 2009. Transcriptome

- analysis of the central nervous system of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. BMC Genomics 10, 451. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-451>
- Ferguson, G.P., Pieneman, A.W., Jansen, R.F., Ter Maat, A., 1993. Neuronal feedback in egg-laying behaviour of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Journal of Experimental Biology 178, 251–259. <https://doi.org/10.1242/jeb.178.1.251>
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D.G.J., 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 2522–2527. <https://doi.org/10.1897/09-073.1>
- Fodor, I., Hussein, A.A., Benjamin, P.R., Koene, J.M., Pirger, Z., 2020. The unlimited potential of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis*. eLife 9, e56962. <https://doi.org/10.7554/eLife.56962>
- Fong, P.P., Olex, A.L., Farrell, J.E., Majchrzak, R.M., Muschamp, J.W., 2005. Induction of Preputium Eversion by Peptides, Serotonin Receptor Antagonists, and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in *Biomphalaria glabrata*. Invertebrate Biology 124, 296–302.
- Fontes, M.K., Gusso-Choueri, P.K., Maranhão, L.A., Abessa, D.M. de S., Mazur, W.A., de Campos, B.G., Guimarães, L.L., de Toledo, M.S., Lebre, D., Marques, J.R., Felício, A.A., Cesar, A., Almeida, E.A., Pereira, C.D.S., 2018. A tiered approach to assess effects of diclofenac on the brown mussel *Perna perna*: A contribution to characterize the hazard. Water Research 132, 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.077>
- Freitas, R., Coppola, F., Costa, S., Pretti, C., Intorre, L., Meucci, V., Soares, A.M.V.M., Solé, M., 2019. The influence of temperature on the effects induced by Triclosan and Diclofenac in mussels. Science of The Total Environment 663, 992–999. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.189>
- Fu, Q., Fedrizzi, D., Kosfeld, V., Schlechtriem, C., Ganz, V., Derrer, S., Rentsch, D., Hollender, J., 2020. Biotransformation Changes Bioaccumulation and Toxicity of Diclofenac in Aquatic Organisms. Environ. Sci. Technol. 54, 4400–4408. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07127>
- Fu, Q., Scheidegger, A., Laczko, E., Hollender, J., 2021. Metabolomic Profiling and Toxicokinetics Modeling to Assess the Effects of the Pharmaceutical Diclofenac in the Aquatic Invertebrate *Hyalella azteca*. Environ. Sci. Technol. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07887>
- Fu, X., Sun, Y., Wang, J., Xing, Q., Zou, J., Li, R., Wang, Z., Wang, S., Hu, X., Zhang, L., Bao, Z., 2014. Sequencing-based gene network analysis provides a core set of gene resource for understanding thermal adaptation in Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Molecular Ecology Resources 14, 184–198. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12169>
- Gan, T.J., 2010. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. Current Medical Research and Opinion 26, 1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>
- Garrison, A.W., Pope, J.D., Allen, F.R., 1976. GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water 517–566.
- GBIF Secretariat. *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2021-12-16.
- Geier, F.M., Want, E.J., Leroi, A.M., Bundy, J.G., 2011. Cross-Platform Comparison of *Caenorhabditis elegans* Tissue Extraction Strategies for Comprehensive Metabolome Coverage. Anal. Chem. 83, 3730–3736. <https://doi.org/10.1021/ac2001109>
- Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N., 2014. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. Drug and Chemical Toxicology 37, 391–399. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.870191>
- Gonçalves, Davies, Bennett, M., Raab, A., Feldmann, J., Kille, P., Loureiro, S., Dj, S., Jg, B., 2016. Sub-lethal cadmium exposure increases phytochelatin concentrations in the aquatic snail *Lymnaea stagnalis*. Science of The Total Environment 568, 1054–1058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.149>
- Gonzalez, P., Pierron, F., 2015. Chapter 8 - Omics in Aquatic Ecotoxicology: The Ultimate Response to Biological Questions?, in: Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C. (Eds.), Aquatic Ecotoxicology. Academic Press, pp. 183–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00008-5>
- Gonzalez-Rey, M., Bebianno, M.J., 2014. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology 148, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.011>
- Goralski, T., Ram, J.L., 2022. Extracellular Calcium Receptor as a Target for Glutathione and Its Derivatives. Int J Mol Sci 23, 717. <https://doi.org/10.3390/ijms23020717>
- Guichard, C., Pedruzzi, E., Fay, M., Ben Mkaddem, S., Coant, N., Daniel, F., Ogier-Denis, E., 2006. Les Nox/Duox : une nouvelle famille de NADPH oxydases. Med Sci (Paris) 22, 953–960. <https://doi.org/10.1051/medsci/20062211953>



- Guise, C.P., Abbattista, M.R., Tipparaju, S.R., Lambie, N.K., Su, J., Li, D., Wilson, W.R., Dachs, G.U., Patterson, A.V., 2012. Diflavin oxidoreductases activate the bioreductive prodrug PR-104A under hypoxia. *Mol Pharmacol* 81, 31–40. <https://doi.org/10.1124/mol.111.073759>
- Haap, T., Triebkorn, R., Köhler, H.-R., 2008. Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: immobilisation and hsp70-induction. *Chemosphere* 73, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.062>
- 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. *Science of The Total Environment* 543, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.040>
- Handy, R.D., Depledge, M.H., 1999. Physiological Responses: Their Measurement and Use as Environmental Biomarkers in Ecotoxicology. *Ecotoxicology* 8, 329–349. <https://doi.org/10.1023/A:1008930404461>
- Harris, C.A., Scott, A.P., Johnson, A.C., Panter, G.H., Sheahan, D., Roberts, M., Sumpter, J.P., 2014. Principles of Sound Ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3100–3111. <https://doi.org/10.1021/es4047507>
- 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*. *Journal of Neurophysiology* 78, 2859–2869. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.6.2859>
- Herrero-Villar, M., Delepouille, É., Suárez-Regalado, L., Solano-Manrique, C., Juan-Sallés, C., Iglesias-Lebrija, J.J., Camarero, P.R., González, F., Álvarez, E., Mateo, R., 2021. First diclofenac intoxication in a wild avian scavenger in Europe. *Science of The Total Environment* 782, 146890. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146890>
- Jewell, K.S., Falås, P., Wick, A., Joss, A., Ternes, T.A., 2016. Transformation of diclofenac in hybrid biofilm-activated sludge processes. *Water Research* 105, 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.08.002>
- Joachim, S., Beaudouin, R., Daniele, G., Geffard, A., Bado-Nilles, A., Tebby, C., Palluel, O., Dedourge-Geffard, O., Fieu, M., Bonnard, M., Palos-Ladeiro, M., Turiès, C., Vulliet, E., David, V., Baudoin, P., James, A., Andres, S., Porcher, J.M., 2021. Effects of diclofenac on sentinel species and aquatic communities in semi-natural conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 211, 111812. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111812>
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Lopes, C., Lacaze, E., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O., 2012. Vitellogenin-like protein measurement in caged *Gammarus fossarum* males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: Inconclusive experience. *Aquatic Toxicology* 122–123, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.007>
- Kim, H.M., Kang, J.S., 2021. Metabolomic Studies for the Evaluation of Toxicity Induced by Environmental Toxicants on Model Organisms. *Metabolites* 11, 485. <https://doi.org/10.3390/metabo11080485>
- Kobayashi, S., Sadamoto, H., Ogawa, H., Kitamura, Y., Oka, K., Tanishita, K., Ito, E., 2000. Nitric oxide generation around buccal ganglia accompanying feeding behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience Research* 38, 27–34. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00136-X)
- Koene, J.M., 2010. Neuro-Endocrine Control of Reproduction in Hermaphroditic Freshwater Snails: Mechanisms and Evolution. *Front Behav Neurosci* 4. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00167>
- Koene, J.M., Ter Maat, A., 2007. Coolidge effect in pond snails: male motivation in a simultaneous hermaphrodite. *BMC Evol Biol* 7, 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-212>
- Kümmerer, K., 2010. Pharmaceuticals in the Environment. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35, 57–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-052809-161223>
- Kuroda, R., Abe, M., 2020. The pond snail *Lymnaea stagnalis*. *EvoDevo* 11, 24. <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00169-4>
- Kuroda, R., Endo, B., Abe, M., Shimizu, M., 2009. Chiral blastomere arrangement dictates zygotic left–right asymmetry pathway in snails. *Nature* 462, 790–794. <https://doi.org/10.1038/nature08597>
- Kyriakides, M.A., McCrohan, C.R., 1989. Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurobiology* 20, 635–650. <https://doi.org/10.1002/neu.480200704>
- Lagadic, L., Katsiadaki, I., Biever, R., Guiney, P.D., Karouna-Renier, N., Schwarz, T., Meador, J.P., 2017. Tributyltin: Advancing the Science on Assessing Endocrine Disruption with an Unconventional Endocrine-Disrupting Compound, in: de Voogt, P. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 245, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 65–127. [https://doi.org/10.1007/398\\_2017\\_8](https://doi.org/10.1007/398_2017_8)
- Lance, E., Brient, L., Bormans, M., Gérard, C., 2006. Interactions between cyanobacteria and Gastropods: I. Ingestion of toxic *Planktothrix agardhii* by *Lymnaea stagnalis* and the kinetics of microcystin bioaccumulation and detoxification. *Aquatic Toxicology* 79, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.004>

- Langford, K., Thomas, K.V., 2011. Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *J Environ Monit* 13, 416–421. <https://doi.org/10.1039/c0em00342e>
- Large, C.J., Smith, T., Foulds, G., Currey, J.D., Elliott, C.J.H., 2006. Leaf mechanical properties modulate feeding movements and ingestive success of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Invert Neurosci* 6, 133–140. <https://doi.org/10.1007/s10158-006-0022-2>
- Leavy, O., 2014. Regulating ROS. *Nat Rev Immunol* 14, 357–357. <https://doi.org/10.1038/nri3685>
- Lebrun, J.D., De Jesus, K., Rouillac, L., Ravelli, M., Guenne, A., Tournebize, J., 2020. Single and combined effects of insecticides on multi-level biomarkers in the non-target amphipod *Gammarus fossarum* exposed to environmentally realistic levels. *Aquatic Toxicology* 218, 105357. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105357>
- Lee, B.-Y., Kim, H.-S., Choi, B.-S., Hwang, D.-S., Choi, A.Y., Han, J., Won, E.-J., Choi, I.-Y., Lee, S.-H., Om, A.-S., Park, H.G., Lee, J.-S., 2015. RNA-seq based whole transcriptome analysis of the cyclopoid copepod *Paracyclops nana* focusing on xenobiotics metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 15, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2015.04.002>
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P., Choi, K., 2011. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1216–1225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.014>
- Leem, 2020. Bilan économique, Edition 2020.
- Leverett, D., Merrington, G., Crane, M., Ryan, J., Wilson, I., 2021. Environmental quality standards for diclofenac derived under the european water framework directive: 1. Aquatic organisms (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-917484/v1>
- Liao, M., Xiao, J.-J., Zhou, L.-J., Liu, Y., Wu, X.-W., Hua, R.-M., Wang, G.-R., Cao, H.-Q., 2016. Insecticidal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and RNA-Seq Analysis of *Sitophilus zeamais* Transcriptome in Response to Oil Fumigation. *PLOS ONE* 11, e0167748. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167748>
- Liu, Y., Wang, L., Pan, B., Wang, C., Bao, S., Nie, X., 2017. Toxic effects of diclofenac on life history parameters and the expression of detoxification-related genes in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 183, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.020>
- Longo, N., Frigeni, M., Pasquali, M., 2016. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Channels and transporters in cell metabolism* 1863, 2422–2435. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.023>
- 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. *Science of The Total Environment* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2010. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *Journal of Separation Science* 33, 1760–1766. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900873>
- Martínez-Gómez, C., Bignell, J., Lowe, D., 2015. Lysosomal membrane stability in mussels. (Report). International Council for the Exploration of the Sea (ICES). <https://doi.org/10.25607/OBP-240>
- 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>
- Meshcheryakov, V.N., 1990. The common pond snail *Lymnaea stagnalis*, in: *Animal Species for Developmental Studies*. pp. 79–142.
- Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., Halm-Lemeille, M.-P., 2016. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *Environ Sci Pollut Res* 23, 4992–5001. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3662-5>
- Miyamae, Y., Komuro, M., Murata, A., Aono, K., Nishikata, K., Kanazawa, A., Fujito, Y., Komatsu, T., Ito, D., Abe, T., Nagayama, M., Uchida, T., Gohara, K., Murakami, J., Kawai, R., Hatakeyama, D., Lukowiak, K., Ito, E., 2010. Contrary Effects of Octopamine Receptor Ligands on Behavioral and Neuronal Changes in Locomotion of *Lymnaea*. *The Biological Bulletin* 218, 6–14. <https://doi.org/10.1086/BBLv218n1p6>
- Mohd Zanuri, N.B., Bentley, M.G., Caldwell, G.S., 2017. Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate (Viagra®) on the fertilisation biology of broadcast spawning marine invertebrates. *Marine Environmental Research* 127, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.04.005>
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Paul Leonard, D.R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental*

- and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, *Genotoxicological Studies in Aquatic Organisms* 552, 247–268. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028>
- Morozov, A.A., Berezina, N.A., Sladkova, S.V., Chernova, E.N., Yurchenko, V.V., 2021. Biochemical and respiratory parameters in a gastropod *Radix balthica* exposed to diclofenac. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 109240. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109240>
- Mulkiewicz, E., Wolecki, D., Świacka, K., Kumirska, J., Stepnowski, P., Caban, M., 2021. Metabolism of non-steroidal anti-inflammatory drugs by non-target wild-living organisms. *Science of The Total Environment* 148251. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148251>
- Munari, M., Chemello, G., Finos, L., Ingrosso, G., Giani, M., Marin, M.G., 2016. Coping with seawater acidification and the emerging contaminant diclofenac at the larval stage: A tale from the clam *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere* 160, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.095>
- Muschamp, J.W., Fong, P.P., 2001. Effects of the serotonin receptor ligand methiothepin on reproductive behavior of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: Reduction of egg laying and induction of penile erection. *Journal of Experimental Zoology* 289, 202–207. [https://doi.org/10.1002/1097-010X\(20010215\)289:3<202::AID-JEZ7>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-010X(20010215)289:3<202::AID-JEZ7>3.0.CO;2-B)
- Nakadera, Y., Swart, E.M., Maas, J.P.A., Montagne-Wajer, K., Ter Maat, A., Koene, J.M., 2015. Effects of age, size, and mating history on sex role decision of a simultaneous hermaphrodite. *Behavioral Ecology* 26, 232–241. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru184>
- Nguyen, P.Y., Carvalho, G., Reis, M.A.M., Oehmen, A., 2021. A review of the biotransformations of priority pharmaceuticals in biological wastewater treatment processes. *Water Research* 188, 116446. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116446>
- Nieto, E., Blasco, J., González-Ortegón, E., Drake, P., Hampel, M., 2013. Is *Atyaephyra desmarestii* a useful candidate for lethal and sub-lethal toxicity tests on pharmaceutical compounds? *Journal of Hazardous Materials* 263, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.035>
- Nieto, E., Hampel, M., González-Ortegón, E., Drake, P., Blasco, J., 2016. Influence of temperature on toxicity of single pharmaceuticals and mixtures, in the crustacean *A. desmarestii*. *Journal of Hazardous Materials* 313, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.061>
- Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology—Do not forget the function. *Aquatic Toxicology* 105, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.019>
- Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem* 387, 1225–1234. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1035-8>
- Niyogi, S., Brix, K.V., Grosell, M., 2014. Effects of chronic waterborne nickel exposure on growth, ion homeostasis, acid-base balance, and nickel uptake in the freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. *Aquatic Toxicology* 150, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.02.012>
- Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Dong, H., Yang, H., 2019. Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res* 26, 5704–5712. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-04072-3>
- Nørregaard Jensen, O., 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.12.009>
- Nunes, B., Daniel, D., Canelas, G.G., Barros, J., Correia, A.T., 2020. Toxic effects of environmentally realistic concentrations of diclofenac in organisms from two distinct trophic levels, *Hediste diversicolor* and *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 231, 108722. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108722>
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, 630–633. <https://doi.org/10.1038/nature02317>
- OCDE, 2019. *Pharmaceutical Residues in Freshwater: Hazards and Policy Responses*.
- OECD, 2017. *Panorama de la Sante 2017: Les Indicateurs de L'OCDE*. Organization for Economic Cooperation & Development, Paris.
- OECD, 2016. Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003. Chapter 17 Molluscs as bioindicators, in: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (Eds.), *Trace Metals and Other Contaminants in the Environment, Bioindicators & Biomonitoring*. Elsevier, pp. 577–635. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80147-9](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9)
- Ogungbemi, A., Leuthold, D., Scholz, S., Küster, E., 2019. Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes. *Environ Sci Eur* 31, 88. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0270-5>

- Oliveira, L.L.D. de, Antunes, S.C., Gonçalves, F., Rocha, O., Nunes, B., 2016. Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology* 39, 13–21. <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1029048>
- Oomen, R.A., Hutchings, J.A., 2017. Transcriptomic responses to environmental change in fishes: Insights from RNA sequencing. *FACETS*. <https://doi.org/10.1139/facets-2017-0015>
- Ormslow, J.C., Elliott, C.J.H., 2006. Octopamine boosts snail locomotion: behavioural and cellular analysis. *Invert Neurosci* 6, 215–220. <https://doi.org/10.1007/s10158-006-0031-1>
- Osada, M., Nomura, T., 1990. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop, *patinopecten yessoensis*. *Prostaglandins* 40, 229–239. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(90\)90011-J](https://doi.org/10.1016/0090-6980(90)90011-J)
- Oskarsson, H., Eriksson Wiklund, A.-K., Lindh, K., Kumblad, L., 2012. Effect studies of human pharmaceuticals on *Fucus vesiculosus* and *Gammarus spp.* *Marine Environmental Research* 74, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.11.001>
- Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J., Pérez, S., Barceló, D., 2016. Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Science of The Total Environment*, 5th Special Issue SCARCE: River Conservation under Multiple stressors: Integration of ecological status, pollution and hydrological variability 540, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.143>
- Pala-Ozkok, I., Rehman, A., Ubay-Cokgor, E., Jonas, D., Orhon, D., 2014. Pyrosequencing reveals the inhibitory impact of chronic exposure to erythromycin on activated sludge bacterial community structure. *Biochemical Engineering Journal* 90, 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.003>
- Pandey, P.K., Ajima, M.N.O., Kumar, K., Poojary, N., Kumar, S., 2017. Evaluation of DNA damage and physiological responses in *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposed to sub-lethal diclofenac (DCF). *Aquatic Toxicology* 186, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.007>
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Riva, C., Provini, A., 2009. An in vitro biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Toxicology in Vitro* 23, 935–942. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.04.014>
- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011a. Assessment of the Potential Cyto-Genotoxicity of the Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID) Diclofenac on the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*). *Water Air Soil Pollut* 217, 589–601. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0612-9>
- Parolini, M., Quinn, B., Binelli, A., Provini, A., 2011b. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere* 84, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.049>
- Pavlova, G.A., 2010. Muscular waves contribute to gliding rate in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*. *J Comp Physiol A* 196, 241–248. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0509-5>
- Pereira, A., Silva, L., Laranjeiro, C., Lino, C., Pena, A., 2020. Selected Pharmaceuticals in Different Aquatic Compartments: Part I—Source, Fate and Occurrence. *Molecules* 25, 1026. <https://doi.org/10.3390/molecules25051026>
- Pfaff, J., Reinwald, H., Ayobahan, S.U., Alvincz, J., Göckener, B., Shomroni, O., Salinas, G., Düring, R.-A., Schäfers, C., Eilebrecht, S., 2021. Toxicogenomic differentiation of functional responses to fipronil and imidacloprid in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 238, 105927. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105927>
- Piña, B., Barata, C., 2011. A genomic and ecotoxicological perspective of DNA array studies in aquatic environmental risk assessment. *Aquat Toxicol* 105, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.006>
- Plesch, B., Janse, C., Boer, H.H., 1974. Gross Morphology and Histology of the Musculature of the Freshwater Pulmonate *Lymnaea Stagnalis* (L.). *Neth J Zool* 25, 332–352. <https://doi.org/10.1163/002829675X00317>
- Plesch, B., Jong-Brink, M.D., Boer, H.H., 1970. Histological and Histochemical Observations On the Reproductive Tract of the Hermaphrodite Pond Snail *Lymnaea Stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology* 21, 180–201. <https://doi.org/10.1163/002829671X00159>
- PNM2, 2016. Plan micropolluants 2016-2021 pour préserver la qualité des eaux et la biodiversité.
- PNRM, 2011. Plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux.
- PNSE, 2004. Plan national santé environnement.
- Prat, O., Degli-Esposti, D., 2019. 6 - New Challenges: Omics Technologies in Ecotoxicology, in: Gross, E., Garric, J. (Eds.), *Ecotoxicology*. Elsevier, pp. 181–208. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-314-1.50006-7>
- Présing, M., V.-Balogh, K., Salánki, J., 1993. Cadmium uptake and depuration in different organs of *Lymnaea stagnalis* L. and the effect of cadmium on the natural zinc level. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 28–34. <https://doi.org/10.1007/BF01061086>
- Pyatt, A., Pyatt, F., Pentreath, V., 2002. Lead toxicity, locomotion and feeding in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). *Invertebrate Neuroscience* 4, 135–140. <https://doi.org/10.1007/s10158-001-0015-0>



- Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests. *Chemosphere* 84, 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.033>
- Richardson, M.L., Bowron, J.M., 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb04922.x>
- Rivi, V., Benatti, C., Colliva, C., Radighieri, G., Brunello, N., Tascetta, F., Blom, J.M.C., 2020. *Lymnaea stagnalis* as model for translational neuroscience research: From pond to bench. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 108, 602–616. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.020>
- Robertson, D.G., 2005. Metabonomics in Toxicology: A Review. *Toxicological Sciences* 85, 809–822. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi102>
- Roubos, E.W., Moorer-van Delft, C.M., 1979. Synaptology of the central nervous system of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.), with particular reference to neurosecretion. *Cell Tissue Res.* 198, 217–235. <https://doi.org/10.1007/BF00232006>
- Sadamoto, H., Takahashi, H., Okada, T., Kenmoku, H., Toyota, M., Asakawa, Y., 2012. De Novo Sequencing and Transcriptome Analysis of the Central Nervous System of Mollusc *Lymnaea stagnalis* by Deep RNA Sequencing. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042546>
- Santama, N., Benjamin, P.R., Burke, J.F., 1995. Alternative RNA splicing generates diversity of neuropeptide expression in the brain of the snail *Lymnaea*: in situ analysis of mutually exclusive transcripts of the FMRFamide gene. *Eur J Neurosci* 7, 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01021.x>
- Santiago-Rodriguez, T.M., Hollister, E.B., 2021. Multi 'omic data integration: A review of concepts, considerations, and approaches. *Seminars in Perinatology, Neonatal GI: The Intestinal Microbiome* 45, 151456. <https://doi.org/10.1016/j.semperi.2021.151456>
- Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175, 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
- Saravanan, M., Karthika, S., Malarvizhi, A., Ramesh, M., 2011. Ecotoxicological impacts of clofibrac acid and diclofenac in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings: Hematological, biochemical, ionoregulatory and enzymological responses. *Journal of Hazardous Materials* 195, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.029>
- Sarma, S.S.S., González-Pérez, B.K., Moreno-Gutiérrez, R.M., Nandini, S., 2014. Effect of paracetamol and diclofenac on population growth of *Platyonus patulus* and *Moina macrocopa*. *Journal of Environmental Biology* 8.
- Scheurell, M., Franke, S., Shah, R.M., Hühnerfuss, H., 2009. Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan. *Chemosphere* 77, 870–876. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.066>
- Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., Quinn, B., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus spp.*) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1389–1395. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.043>
- Schmidt, W., Rainville, L.-C., McEneff, G., Sheehan, D., Quinn, B., 2014. A proteomic evaluation of the effects of the pharmaceuticals diclofenac and gemfibrozil on marine mussels (*Mytilus spp.*): evidence for chronic sublethal effects on stress-response proteins. *Drug Testing and Analysis* 6, 210–219. <https://doi.org/10.1002/dta.1463>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shen, S., Marchick, M.R., Davis, M.R., Doss, G.A., Pohl, L.R., 1999. Metabolic Activation of Diclofenac by Human Cytochrome P450 3A4: Role of 5-Hydroxydiclofenac. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 214–222. <https://doi.org/10.1021/tx9802365>
- Sispea, 2009. A propos de l'assainissement collectif [WWW Document]. Observatoire des services publics de l'eau et de l'assainissement: prix de l'eau et performance des services. URL <https://www.services.eaufrance.fr/gestion/services/eau-potable-assainissement/l-assainissement-collectif> (accessed 12.6.21).
- Smith, J.R., Jamie, J.F., Guillemin, G.J., 2016. Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors. *Drug Discovery Today* 21, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.001>

- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 67, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.011>
- 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. *TSM* 63–77. <https://doi.org/10.1051/tsm/201101063>
- Stanley-Samuelson, D.W., 1994. The Biological Significance of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates. *American Zoologist* 34, 589–598. <https://doi.org/10.1093/icb/34.6.589>
- Stephenson, R., Lewis, V., 2011. Behavioural evidence for a sleep-like quiescent state in a pulmonate mollusc, *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus). *Journal of Experimental Biology* 214, 747–756. <https://doi.org/10.1242/jeb.050591>
- Stierlin, H., Faigle, J.W., 1979. Biotransformation of Diclofenac Sodium (Voltaren®) in Animals and in Man.: II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile. *Xenobiotica* 9, 611–621. <https://doi.org/10.3109/00498257909042328>
- Straalen, N.M.V., 2003. Ecotoxicology Becomes Stress Ecology. *Environ. Sci. Technol* 37, 324A–330A.
- Straub, V.A., Staras, K., Kemenes, G., Benjamin, P.R., 2002. Endogenous and Network Properties of *Lymnaea* Feeding Central Pattern Generator Interneurons. *Journal of Neurophysiology* 88, 1569–1583. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.4.1569>
- Stülten, D., Zühlke, S., Lamshöft, M., Spitteller, M., 2008. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Science of The Total Environment* 405, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.036>
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reilly, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 3, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>
- Swan, G.E., Cuthbert, R., Quevedo, M., Green, R.E., Pain, D.J., Bartels, P., Cunningham, A.A., Duncan, N., Meharg, A.A., Lindsay Oaks, J., Parry-Jones, J., Shultz, S., Taggart, M.A., Verdoorn, G., Wolter, K., 2006. Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biology Letters* 2, 279–282. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0425>
- Świacka, K., Michnowska, A., Maculewicz, J., Caban, M., Smolarz, K., 2020a. Toxic effects of NSAIDs in non-target species: a review from the perspective of the aquatic environment. *Environmental Pollution* 115891. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115891>
- Świacka, K., Smolarz, K., Maculewicz, J., Caban, M., 2020b. Effects of environmentally relevant concentrations of diclofenac in *Mytilus trossulus*. *Science of The Total Environment* 737, 139797. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139797>
- Świacka, K., Smolarz, K., Maculewicz, J., Michnowska, A., Caban, M., 2021. Exposure of *Mytilus trossulus* to diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac: Uptake, bioconcentration and mass balance for the evaluation of their environmental fate. *Science of The Total Environment* 791, 148172. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148172>
- Świacka, K., Szaniawska, A., Caban, M., 2019. Evaluation of bioconcentration and metabolism of diclofenac in mussels *Mytilus trossulus* - laboratory study. *Marine Pollution Bulletin* 141, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.050>
- Syed, M., Skonberg, C., Hansen, S.H., 2016. Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: Possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicology in Vitro* 31, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.020>
- Tallarico, L. de F., 2015. Freshwater Gastropods as a Tool for Ecotoxicology Assessments in Latin America\*. *malb* 33, 330–336. <https://doi.org/10.4003/006.033.0220>
- Tegelenbosch, R.A.J., Noldus, L.P.J.J., Richardson, M.K., Ahmad, F., 2012. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour* 149, 1241–1281. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003020>
- 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.* 164, 673–683. <https://doi.org/10.1007/BF00614510>
- Ter Maat, A., Pieneman, A.W., Koene, J.M., 2012. The effect of light on induced egg laying in the simultaneous hermaphrodite *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Molluscan Studies* 78, 262–267. <https://doi.org/10.1093/mollus/ey008>
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32, 3245–3260. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00099-2)

- Terpos, E., Kleber, M., Engelhardt, M., Zweegman, S., Gay, F., Kastritis, E., van de Donk, N.W.C.J., Bruno, B., Sezer, O., Broijl, A., Bringhen, S., Beksac, M., Larocca, A., Hajek, R., Musto, P., Johnsen, H.E., Morabito, F., Ludwig, H., Cavo, M., Einsele, H., Sonneveld, P., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., 2015. European Myeloma Network Guidelines for the Management of Multiple Myeloma-related Complications. *Haematologica* 100, 1254–1266. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.117176>
- Tieppo Francio, V., Davani, S., Towery, C., Brown, T.L., 2017. Oral Versus Topical Diclofenac Sodium in the Treatment of Osteoarthritis. *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy* 31, 113–120. <https://doi.org/10.1080/15360288.2017.1301616>
- Tipsmark, C.K., Madsen, S.S., 2001a. Rapid modulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in osmoregulatory tissues of a salmonid fish. *Journal of Experimental Biology* 204, 701–709. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.4.701>
- Tipsmark, C.K., Madsen, S.S., 2001b. Rapid modulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in osmoregulatory tissues of a salmonid fish. *Journal of Experimental Biology* 204, 701–709. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.4.701>
- Toufexi, E., Dailianis, S., Vlastos, D., Manariotis, I.D., 2016. Mediated effect of ultrasound treated Diclofenac on mussel hemocytes: First evidence for the involvement of respiratory burst enzymes in the induction of DCF-mediated unspecific mode of action. *Aquat Toxicol* 175, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.017>
- Trombini, C., Hampel, M., Blasco, J., 2019. Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: An integrative and multibiomarker approach. *Aquatic Toxicology* 208, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.004>
- Tufi, S., Lamoree, M.H., De Boer, J., Leonards, P.E.G., 2015a. Cross-platform metabolic profiling: application to the aquatic model organism *Lymnaea stagnalis*. *Anal Bioanal Chem* 407, 1901–1912. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8431-2>
- Tufi, S., Stel, J.M., de Boer, J., Lamoree, M.H., Leonards, P.E.G., 2015b. Metabolomics to Explore Imidacloprid-Induced Toxicity in the Central Nervous System of the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14529–14536. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03282>
- Vakolyuk, I.A., Zhukov, V.V., 2000. Study of the *Lymnaea stagnalis* Photoreception from Phototaxis Manifestations 36, 8.
- van Leeuwen, J.S., Vredenburg, G., Dragovic, S., Tjong, T.F.J., Vos, J.C., Vermeulen, N.P.E., 2011. Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system. *Toxicology Letters* 200, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.010>
- Vandegheuchte, M.B., Janssen, C.R., 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20, 607–624. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0634-0>
- Velki, M., Di Paolo, C., Nelles, J., Seiler, T.-B., Hollert, H., 2017. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. *Chemosphere* 180, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.017>
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of The Total Environment, Special Section - Arsenic in Latin America, An Unrevealed Continent: Occurrence, Health Effects and Mitigation* 429, 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
- Vieno, N., Sillanpää, M., 2014. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - a review. *Environment international*. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.021>
- Vignet, C., Devier, M.-H., Le Menach, K., Lyphout, L., Potier, J., Cachot, J., Budzinski, H., Bégout, M.-L., Cousin, X., 2014. Long-term disruption of growth, reproduction, and behavior after embryonic exposure of zebrafish to PAH-spiked sediment. *Environ Sci Pollut Res* 21, 13877–13887. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2585-5>
- Vinarski, M.V., 2014. A comparative study of shell variation in two morphotypes of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata). *Zoological Studies* 53, 69. <https://doi.org/10.1186/s40555-014-0069-4>
- Vorontsov, D.D., Tsyganov, V.V., Sakharov, D.A., 2003. Central Mechanisms that Control Respiration in the Pulmonate Snail *Lymnaea stagnalis*: Phasic Coupling of Lung Ventilation to Cyclic Locomotion. *Doklady Biological Sciences* 391, 303–305. <https://doi.org/10.1023/A:1025134130009>
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* 34, 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wang, R.-L., Biales, A., Bencic, D., Lattier, D., Kostich, M., Villeneuve, D., Ankley, G.T., Lazorchak, J., Toth, G., 2008. DNA microarray application in ecotoxicology: Experimental design, microarray scanning, and factors affecting transcriptional profiles in a small fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 652–663. <https://doi.org/10.1897/07-191.1>

- Wang, S., Gunsch, C.K., 2011. Effects of selected pharmaceutically active compounds on treatment performance in sequencing batch reactors mimicking wastewater treatment plants operations. *Water Research* 45, 3398–3406. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.055>
- Watanabe, H., Takahashi, E., Nakamura, Y., Oda, S., Tatarazako, N., Iguchi, T., 2007. Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 669–676. <https://doi.org/10.1897/06-075R.1>
- Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1, REVIEWS3003. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003>
- Wickham, S., West, M.B., Cook, P.F., Hanigan, M.H., 2011. Gamma-glutamyl compounds: Substrate specificity of gamma-glutamyl transpeptidase enzymes. *Analytical Biochemistry* 414, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.026>
- Wittich, R.-M., Häidour, A., Van Dillewijn, P., Ramos, J.-L., 2008. OYE Flavoprotein Reductases Initiate the Condensation of TNT-Derived Intermediates to Secondary Diarylamines and Nitrite. *Environ. Sci. Technol.* 42, 734–739. <https://doi.org/10.1021/es071449w>
- Xie, Z., Tang, J., Wu, X., Li, X., Hua, R., 2019. Bioconcentration, metabolism and the effects of tetracycline on multiple biomarkers in *Chironomus riparius* larvae. *Science of The Total Environment* 649, 1590–1598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.371>
- Ye, J., Zhang, Y., Cui, H., Liu, J., Wu, Y., Cheng, Y., Xu, H., Huang, X., Li, S., Zhou, A., Zhang, X., Bolund, L., Chen, Q., Wang, J., Yang, H., Fang, L., Shi, C., 2018. WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. *Nucleic Acids Research* 46, W71–W75. <https://doi.org/10.1093/nar/gky400>
- Ying, W., 2008. NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants & Redox Signaling* 10, 179–206. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1672>
- Żbikowska, E., Kobak, J., Żbikowski, J., Kąklewski, J., 2006. Infestation of *Lymnaea stagnalis* by digenean flukes in the Jeziorak Lake. *Parasitol Res* 99, 434–439. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0178-z>
- Zhang, D.Q., Gersberg, R.M., Zhu, J., Hua, T., Jinadasa, K.B.S.N., Tan, S.K., 2012. Batch versus continuous feeding strategies for pharmaceutical removal by subsurface flow constructed wetland. *Environmental Pollution* 167, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.004>
- Zhang, L., Yang, J., Li, H., You, J., Chatterjee, N., Zhang, X., 2020. Development of the transcriptome for a sediment ecotoxicological model species, *Chironomus dilutus*. *Chemosphere* 244, 125541. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125541>
- Zhang, Y., Geißen, S.-U., Carmen Gal, 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.086>
- Ziarrusta, H., Mijangos, L., Izagirre, U., Plassmann, M.M., Benskin, J.P., Anakabe, E., Olivares, M., Zuloaga, O., 2017. Bioconcentration and Biotransformation of Amitriptyline in Gilt-Head Bream. *Environ. Sci. Technol.* 51, 2464–2471. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05831>



---

---

**ANNEXES**

---

---

# ANNEXE I : Supplementary data article n°1

Metabolism of the aquatic pollutant diclofenac in the *Lymnaea stagnalis* freshwater gastropod  
*Supplementary material*

Lucie Bouly<sup>a,b</sup>, Hélène Fenet<sup>b</sup>, Jean-Luc Carayon<sup>a</sup>, Elena Gomez<sup>b</sup>, Florence G  ret<sup>a</sup> and Frédérique Courant<sup>b,\*</sup>

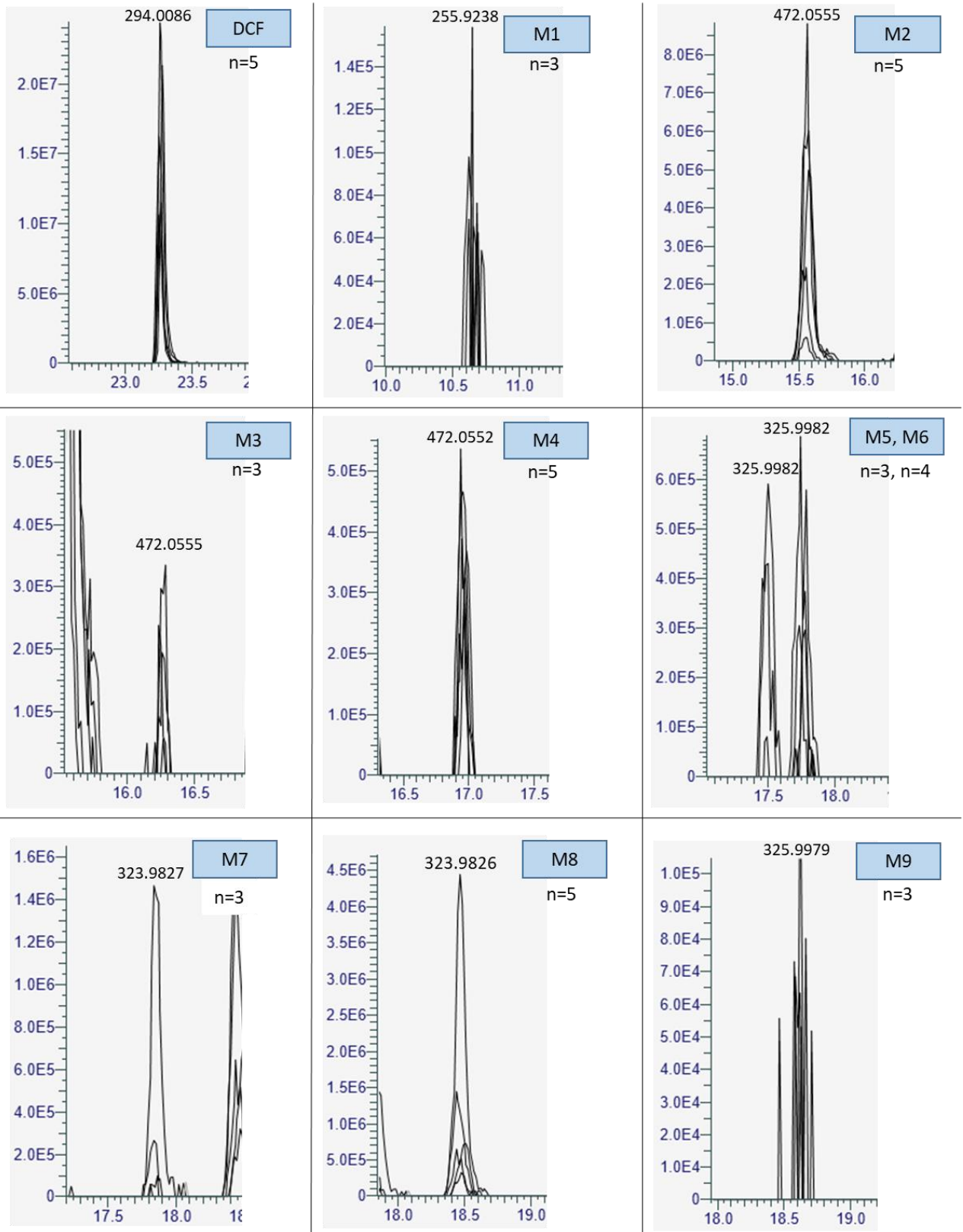
<sup>a</sup>Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA 7417, INU Champollion, Albi, France

<sup>b</sup>HydroSciences Montpellier, University of Montpellier, IRD, CNRS, Montpellier, France

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



1. Extracted ion chromatograms on day 3



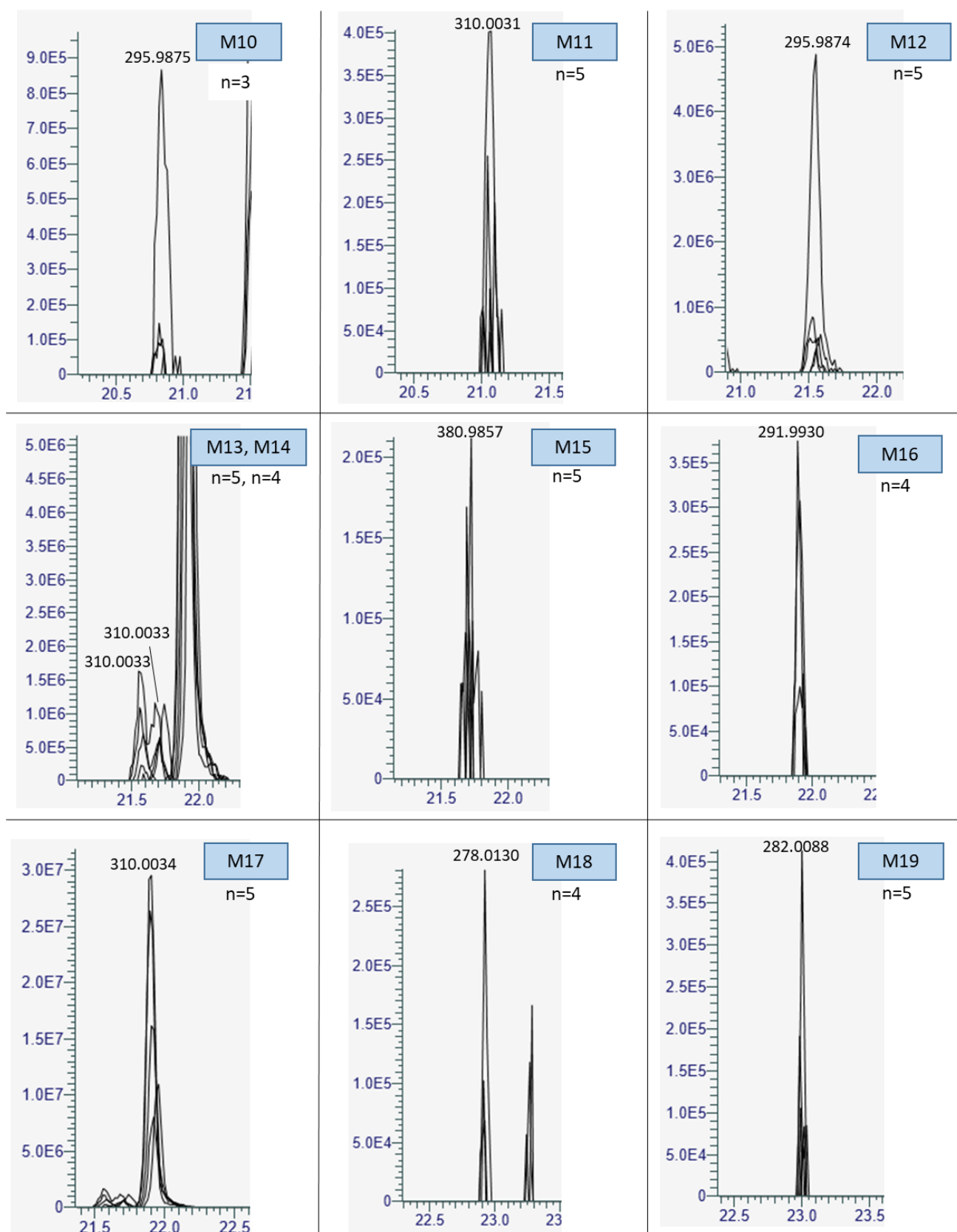
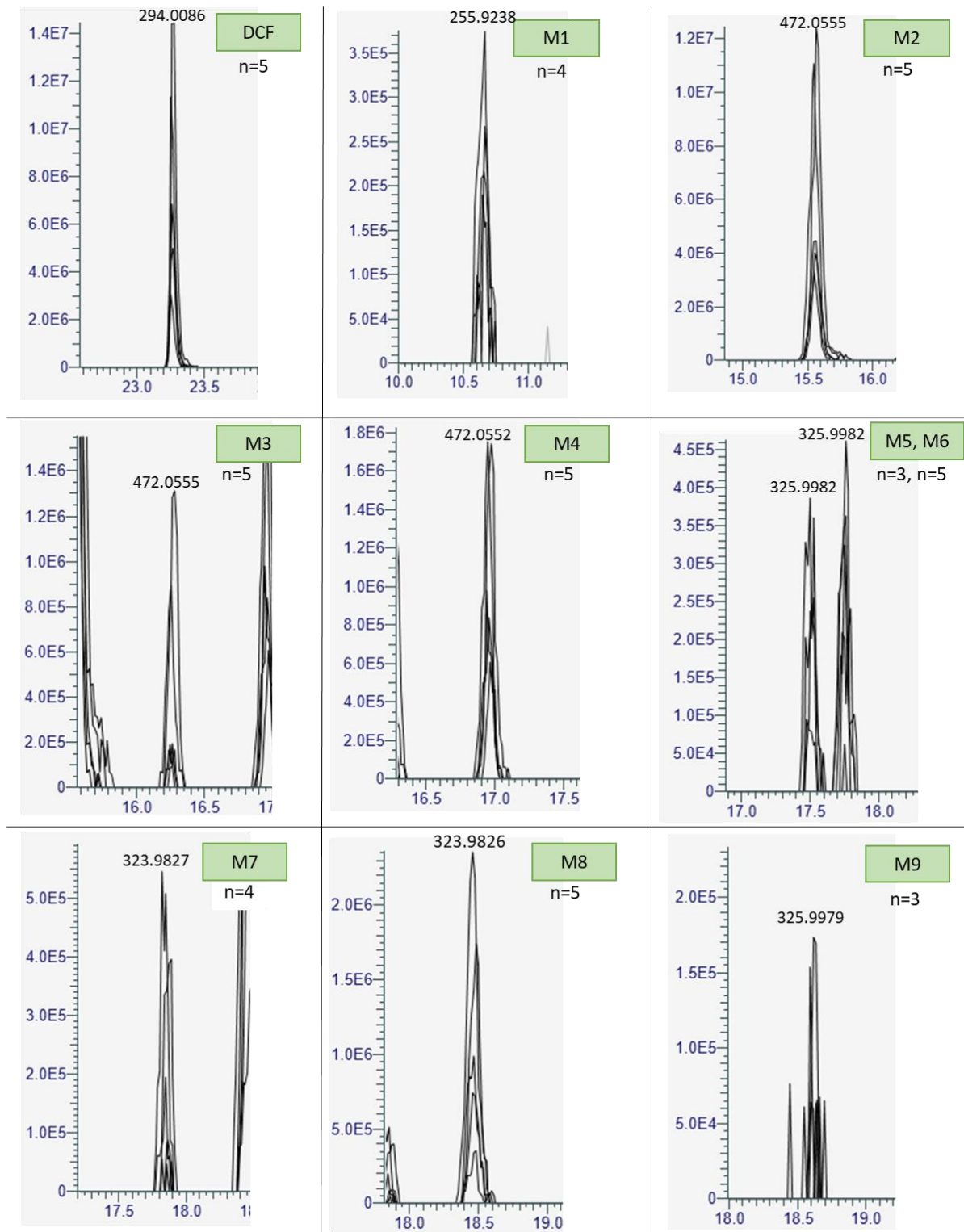


Figure S1: Extracted ion chromatograms (EIC) of DCF and its metabolites in tissue samples collected on day 3. Exposed samples are represented in black. Control samples are shown in grey. As the metabolites were not present in the control samples, they are mostly non visible on EIC. On the ordinate are represented abundances and on the abscissa retention time (min). The n designates the number of exposed samples where the signal was observed.

2. Extracted ion chromatograms on day 7



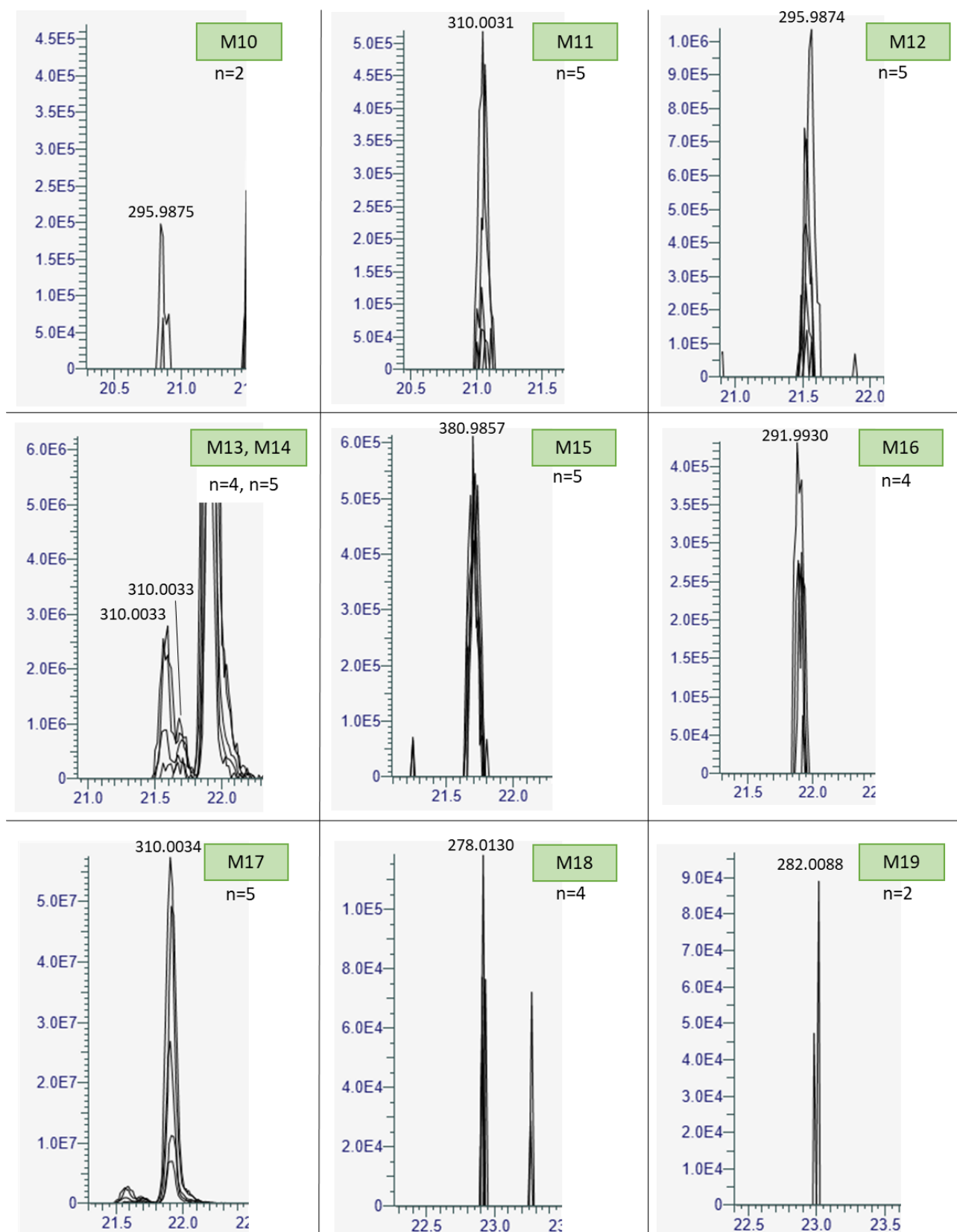


Figure S2: Extracted ion chromatograms (EIC) of DCF and its metabolites in tissue samples collected on day 7. Exposed samples are represented in black. Control samples are shown in grey. As the metabolites were not present in the control samples, they are mostly non visible on EIC. On the ordinate are represented abundances and on the abscissa retention time (min). The n designates the number of exposed samples where the signal was observed.

## 3. Chromatograms of DCF and detected metabolites

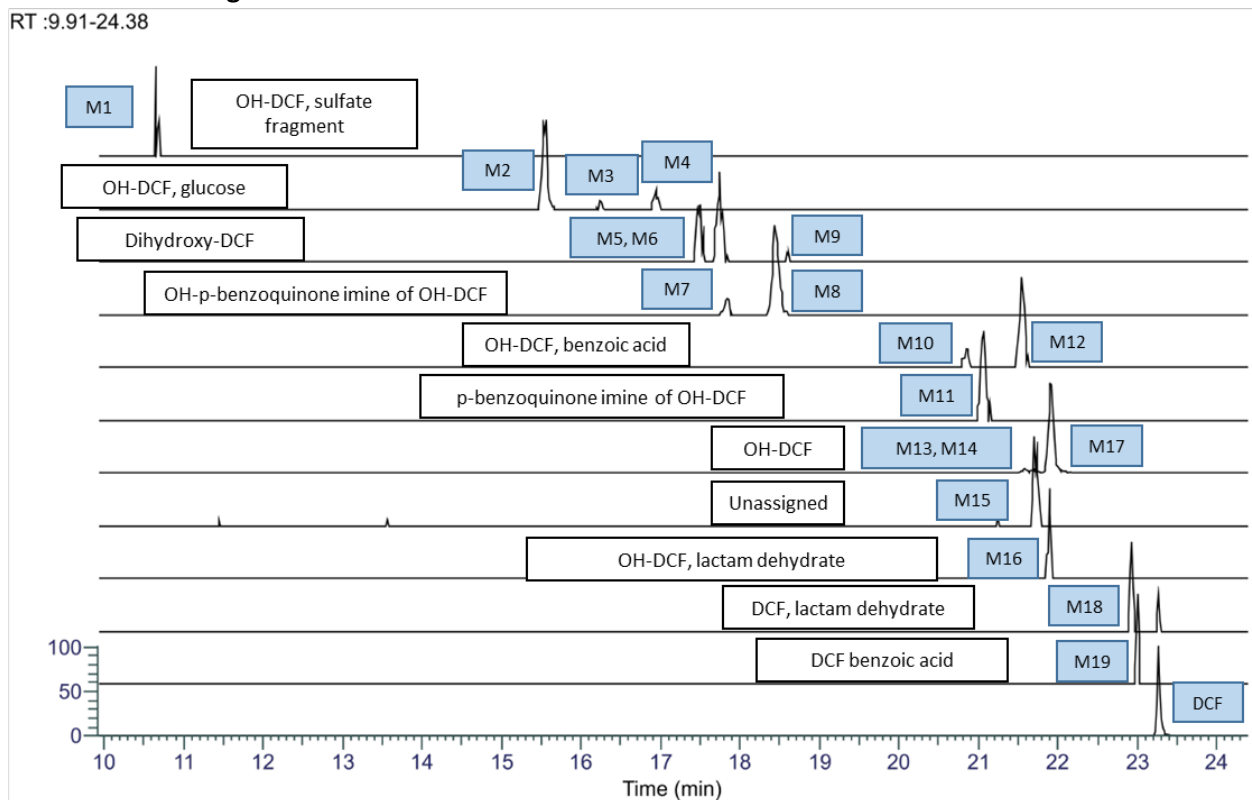


Figure S3: Chromatograms of DCF and its metabolites in a sample exposed for 3 days

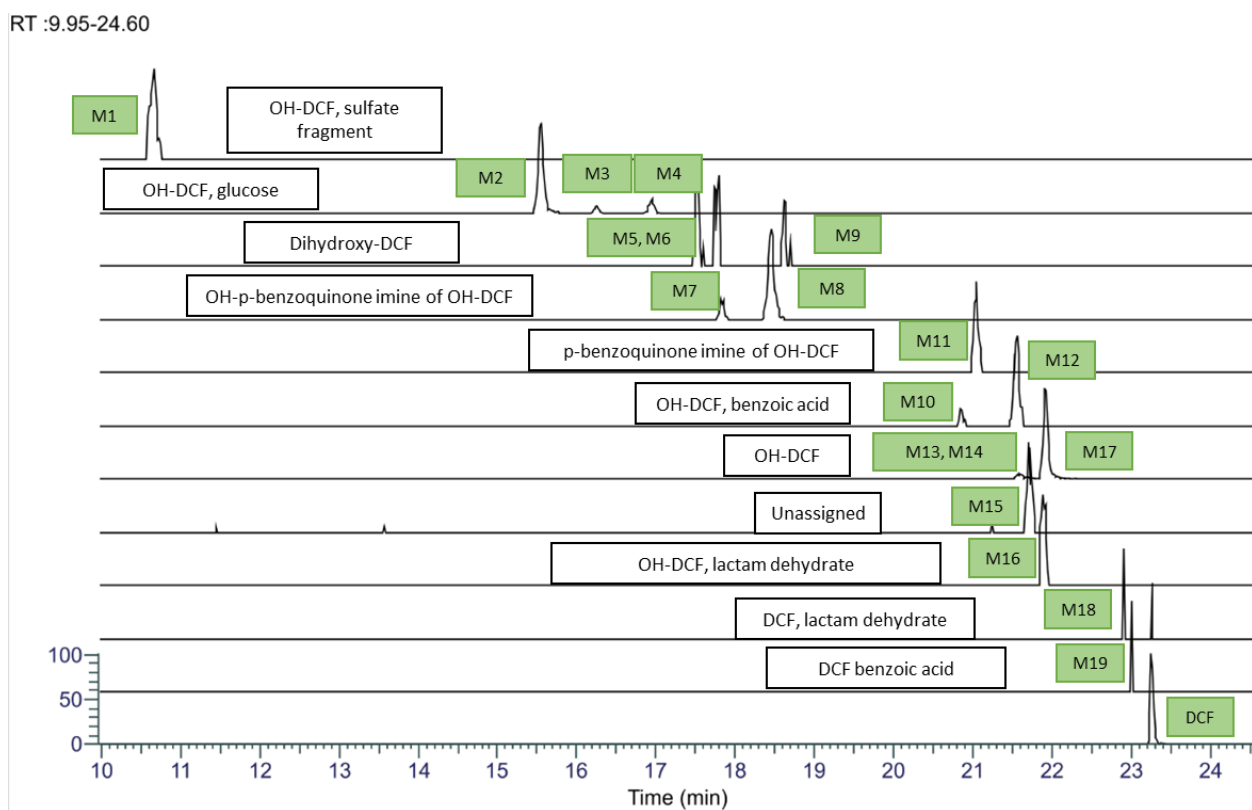


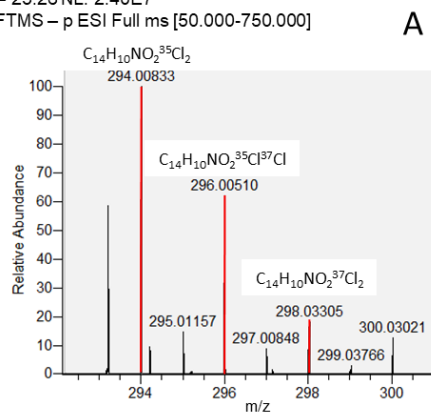
Figure S4: Chromatograms of DCF and its metabolites in a sample exposed for 7 days

#### 4. Isotopic pattern and MS<sup>2</sup> fragments for DCF and its metabolite in exposed sample

##### 4.1. Diclofenac (DCF)

Rt = 23.26 NL: 2.40E7

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]



Rt = 23.28 NL: 2.26E6

F: FTMS - p ESI Full ms2 294.0094@hcd20.00 [50.0000-320.0000]

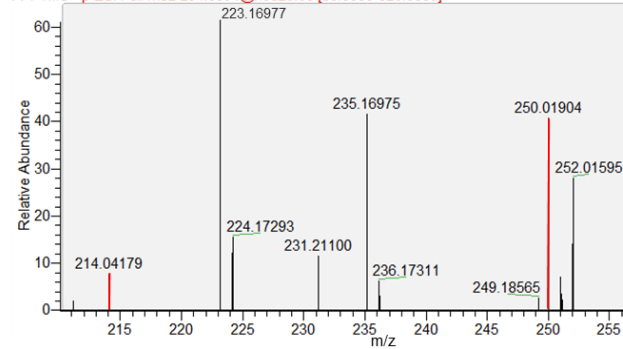
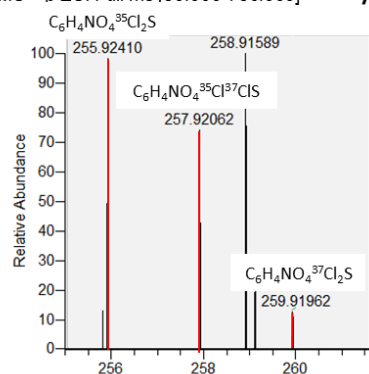


Figure S5: Negative ESI (A) isotopic pattern of DCF ( $m/z$  294) and (B) fragments of interest in MS<sup>2</sup> (20 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.

##### 4.2. M1 – 4-amino-3,5-dichlorophenyl hydrogen sulfate

Rt = 10.66 NL: 3.70E5

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]



Rt = 10.52 NL: 1.35E5

F: FTMS - p ESI Full ms2 255.9238@hcd10.00 [50.0000-280.0000]

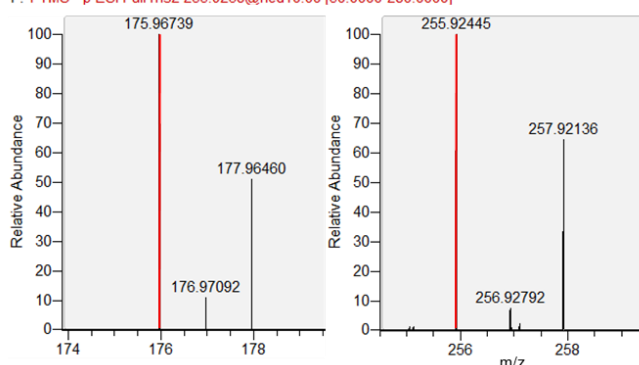
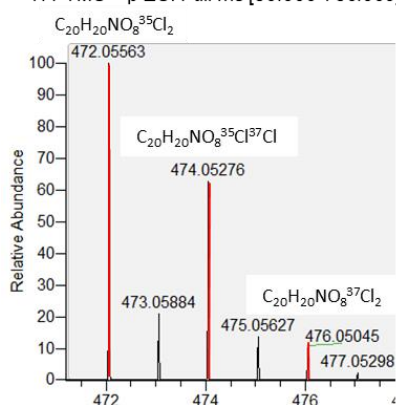


Figure S6: Negative ESI (A) isotopic pattern of M1 ( $m/z$  256) and (B) fragments of interest in MS<sup>2</sup> (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.

##### 4.3. M2 – OH-DCF, glucose

Rt = 15.55 NL: 1.10E7

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]



Rt = 15.54 NL: 8.60E6

F: FTMS - p ESI Full ms2 472.0553@hcd10.00 [50.0000-500.0000]

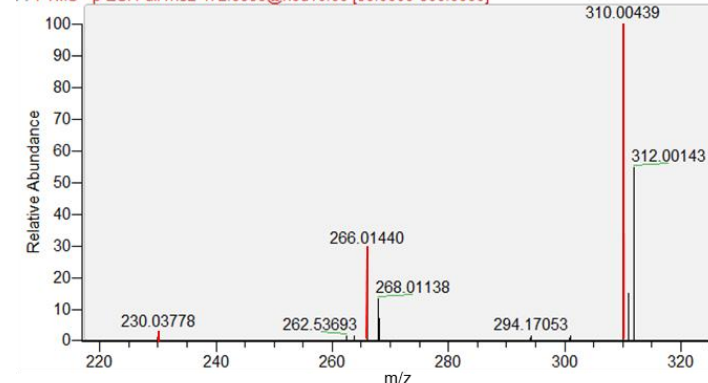


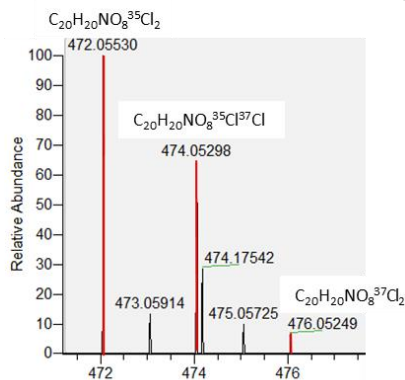
Figure S7: Negative ESI (A) isotopic pattern of M2 ( $m/z$  472) and (B) fragments of interest in MS<sup>2</sup> (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.



**4.4. M3 – OH-DCF, glucose**

Rt = 16.24 NL: 7.76E5

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]

**A**

Rt = 16.25 NL: 2.04E6

F: FTMS - p ESI Full ms2 472.0553@hcd10.00 [50.0000-500.0000]

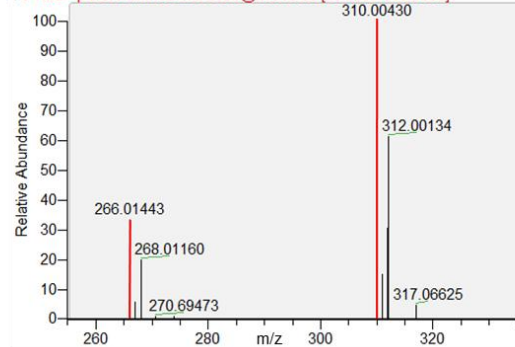
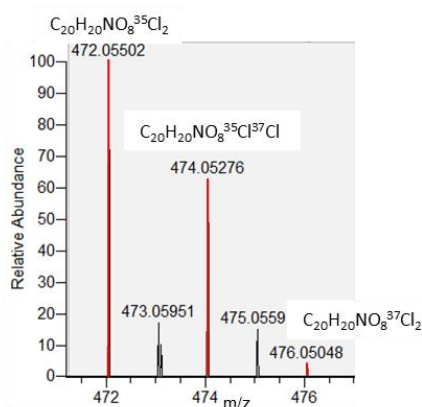
**B**

Figure S8: Negative ESI (A) isotopic pattern of M3 ( $m/z$  472) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) (B) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.

**4.5. M4 – OH-DCF, glucose**

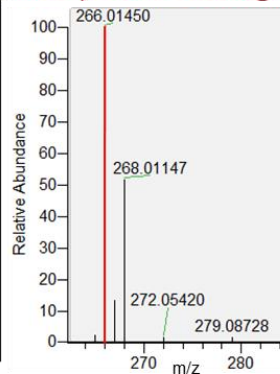
Rt = 16.95 NL: 1.75E6

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]

**A**

Rt = 16.93 NL: 1.18E6

F: FTMS - p ESI Full ms2 472.0553@hcd10.00 [50.0000-500.0000]

**B**

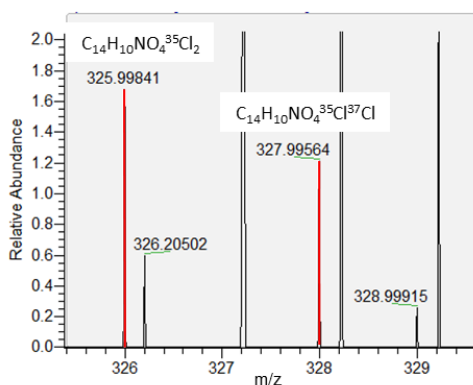
Rt = 16.93 NL: 2.08E6

Figure S9: Negative ESI (A) isotopic pattern of M4 ( $m/z$  472) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.

**4.6. M5 – Dihydroxy-DCF**

Rt = 17.49 NL: 2.49E7

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]

**A**

Rt = 17.50 NL: 2.63E5

F: FTMS - p ESI Full ms2 325.9982@hcd10.00 [50.0000-355.0000]

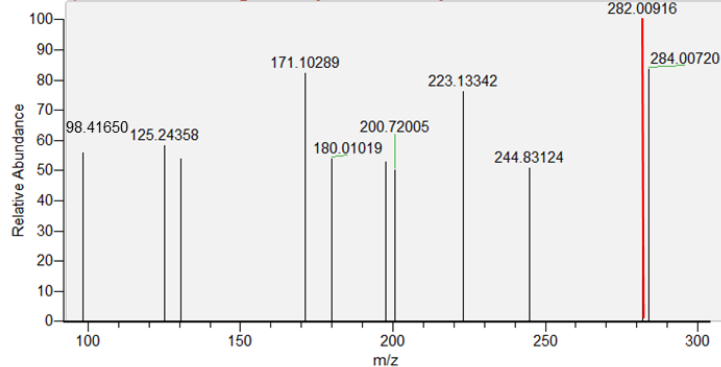
**B**

Figure S10: Negative ESI (A) isotopic pattern of M5 ( $m/z$  326) and fragment of interest in  $MS^2$  (10 eV) (B) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.

## 4.7. M6 – Dihydroxy-DCF

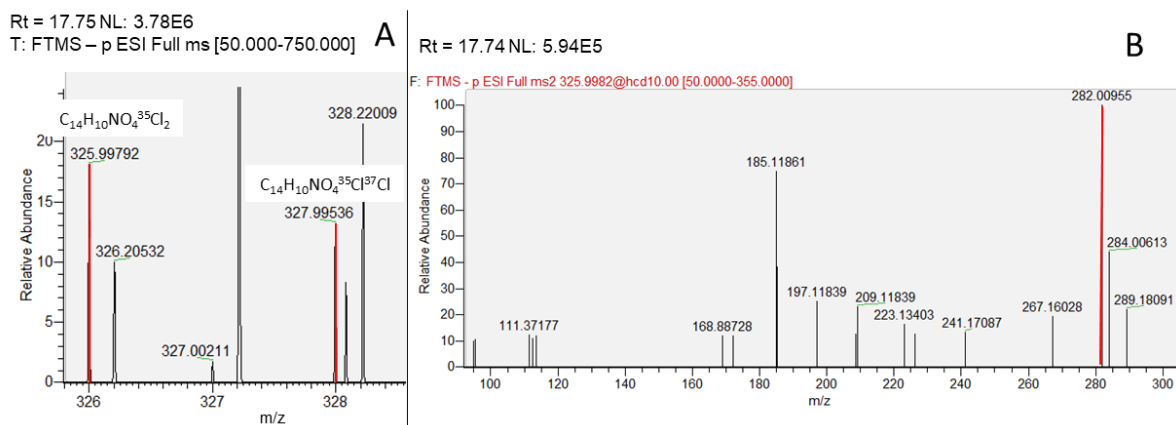


Figure S11: Negative ESI (A) isotopic pattern of M6 ( $m/z$  326) and (B) fragment of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.

## 4.8. M7 – OH-p-benzoquinone imine of OH-DCF

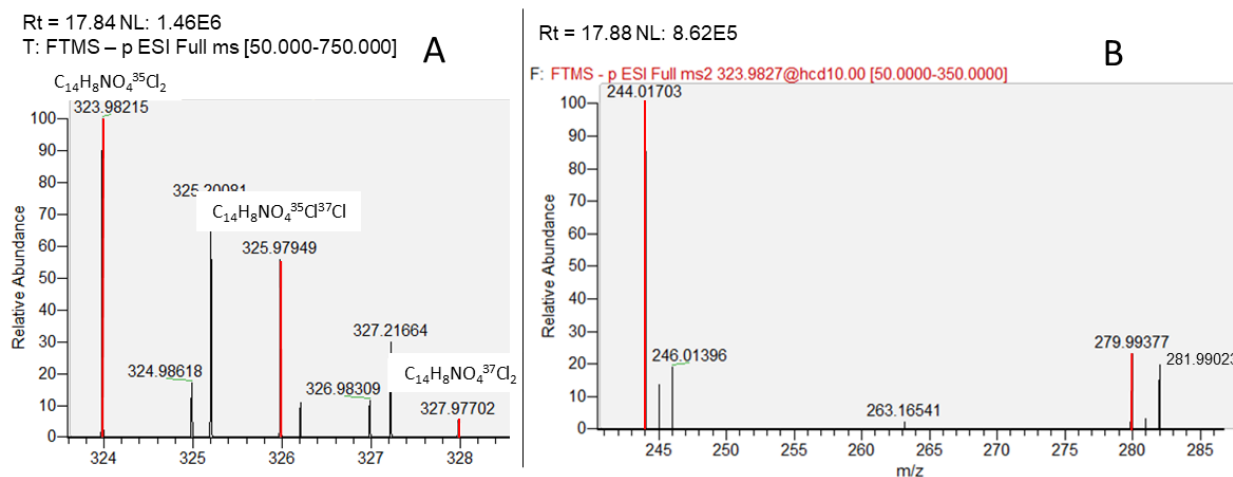


Figure S12: Negative ESI (A) isotopic pattern of M7 ( $m/z$  324) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.

## 4.9. M8 – OH-p-benzoquinone imine of OH-DCF

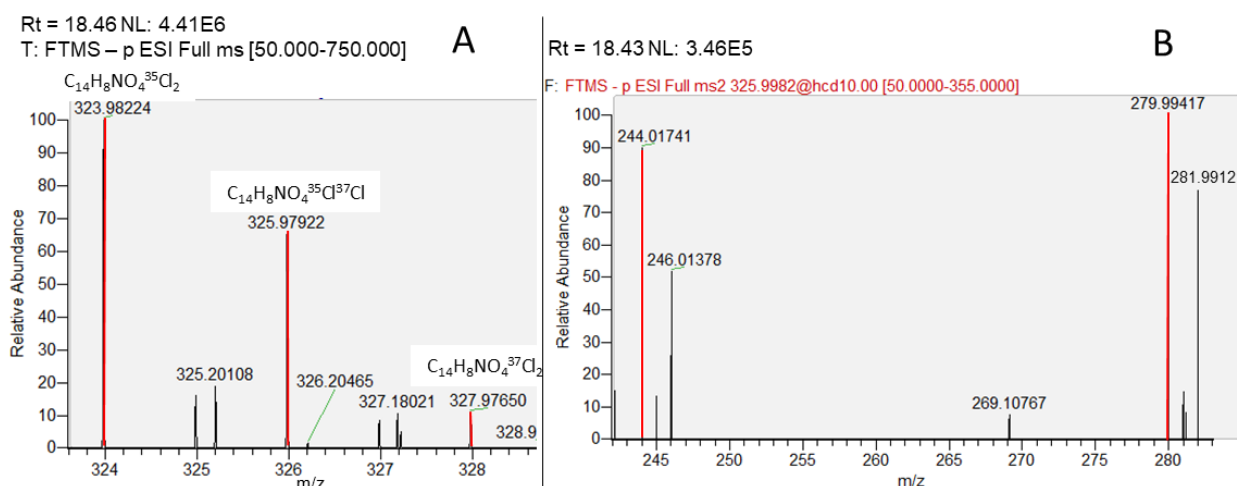


Figure S13: Negative ESI (A) isotopic pattern of M8 ( $m/z$  324) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.



## 4.10. M9 – Dihydroxy-DCF

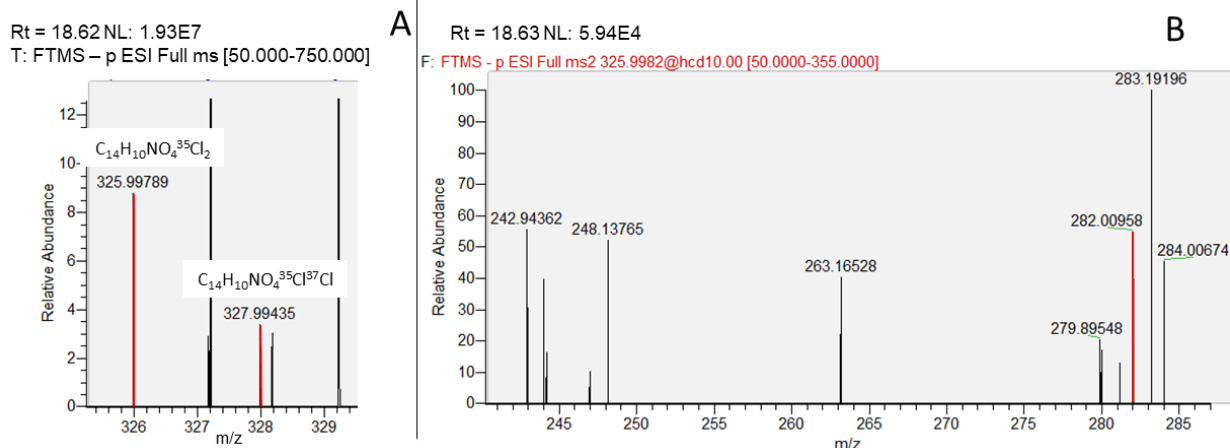


Figure S14: Negative ESI (A) isotopic pattern of M9 ( $m/z$  326) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.

## 4.11. M10 – OH-DCF benzoic acid

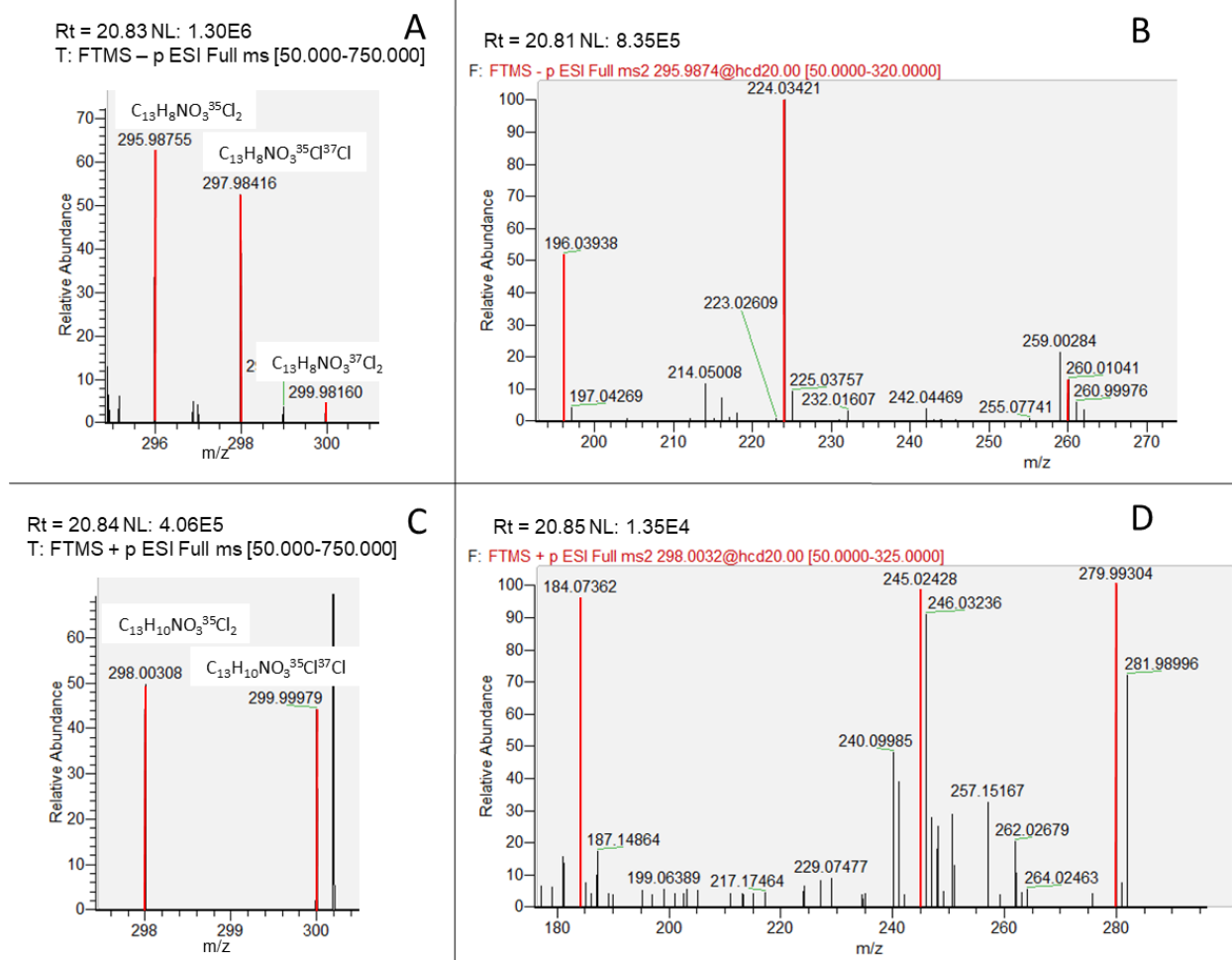
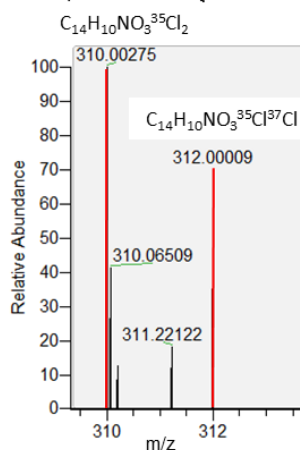


Figure S15: Negative ESI (A) isotopic pattern of M10 ( $m/z$  296) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (20 eV) and positive ESI (C) isotopic pattern of M10 ( $m/z$  298) and (D) fragments of interest in  $MS^2$  (20 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.

## 4.12. M11 – p-benzoquinone imine of OH-DCF

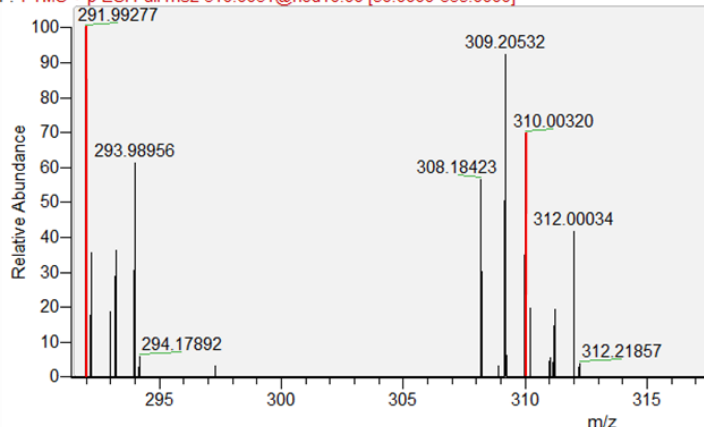
Rt = 21.07 NL: 4.63E5

T: FTMS + p ESI Full ms [50.000-750.000]

**A**

Rt = 21.07 NL: 1.01E5

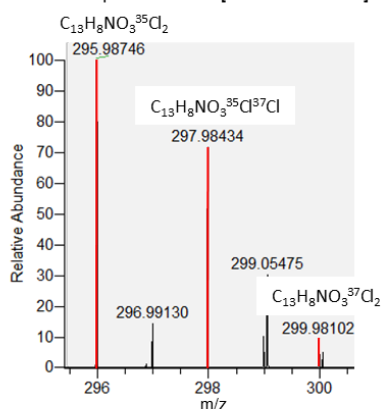
F: FTMS + p ESI Full ms2 310.0031@hcd10.00 [50.0000-335.0000]

**B**Figure S16: Positive ESI (A) isotopic pattern of M11 ( $m/z$  310) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.

## 4.13. M12 – OH-DCF benzoic acid

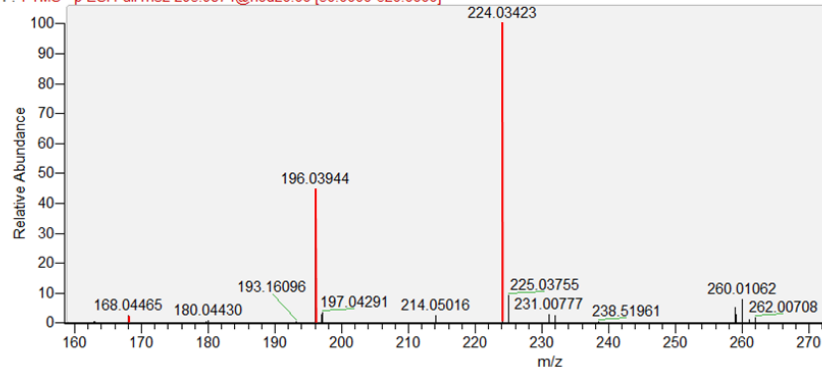
Rt = 21.54 NL: 4.35E6

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]

**A**

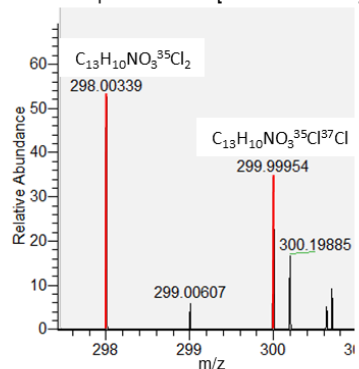
Rt = 21.54 NL: 4.43E6

F: FTMS – p ESI Full ms2 295.9874@hcd20.00 [50.0000-320.0000]

**B**

Rt = 21.55 NL: 1.89E6

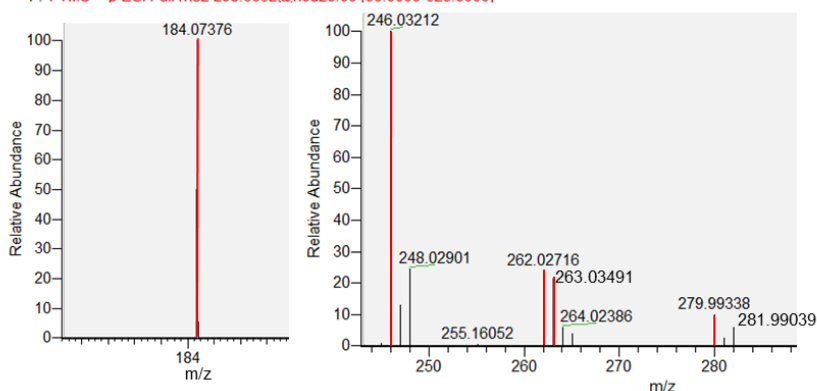
T: FTMS + p ESI Full ms [50.000-750.000]

**C**

Rt = 21.56 NL: 1.09E4

Rt = 21.56 NL: 3.12E5

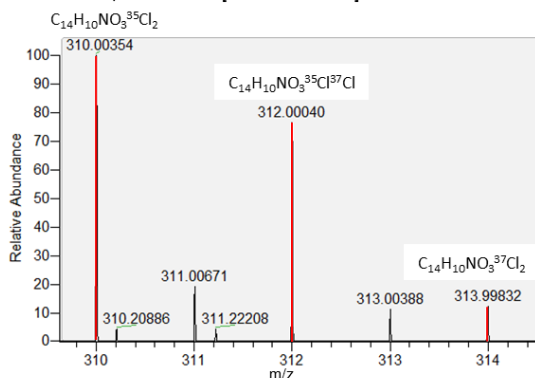
F: FTMS + p ESI Full ms2 298.0032@hcd20.00 [50.0000-325.0000]

**D**Figure S17: Negative ESI (A) isotopic pattern of M12 ( $m/z$  296) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (20 eV) and positive ESI (C) isotopic pattern of M12 ( $m/z$  298) and (D) fragments of interest in  $MS^2$  (20 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.

**4.14. M13 – 3'OH-DCF**

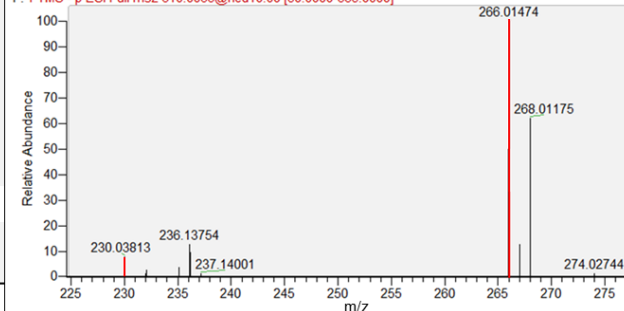
Rt = 21.58 NL: 2.03E6

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]



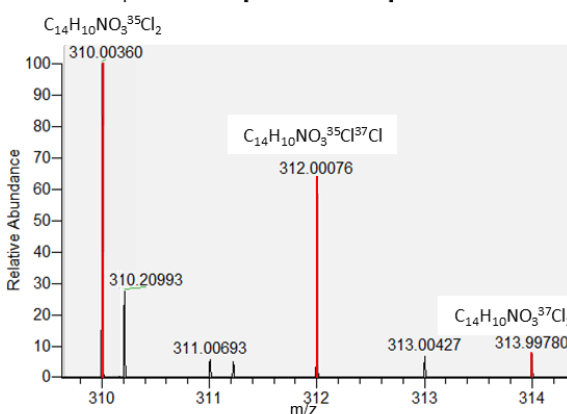
Rt = 21.57 NL: 1.81E6

F: FTMS – p ESI Full ms2 310.0033@hcd10.00 [50.0000-335.0000]

Figure S18: Negative ESI (A) isotopic pattern of M13 ( $m/z$  310) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.**4.15. M14 – 5OH-DCF**

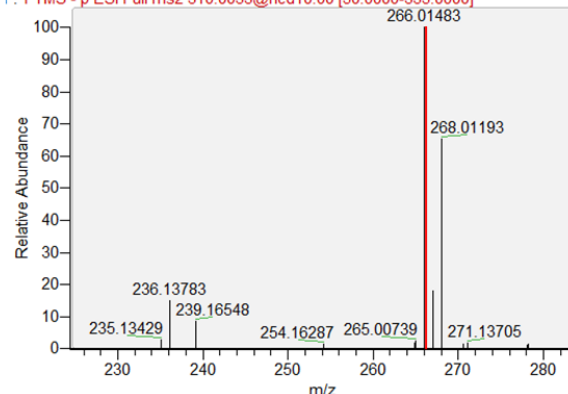
Rt = 21.69 NL: 1.00E6

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]



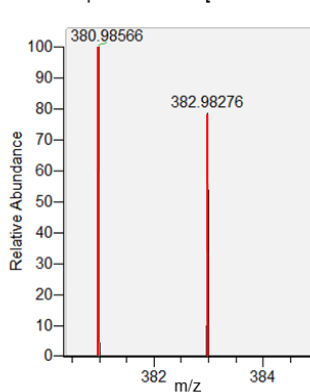
Rt = 21.71 NL: 1.01E6

F: FTMS – p ESI Full ms2 310.0033@hcd10.00 [50.0000-335.0000]

Figure S19: Negative ESI (A) isotopic pattern of M14 ( $m/z$  310) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.**4.16. M15 – Unassigned**

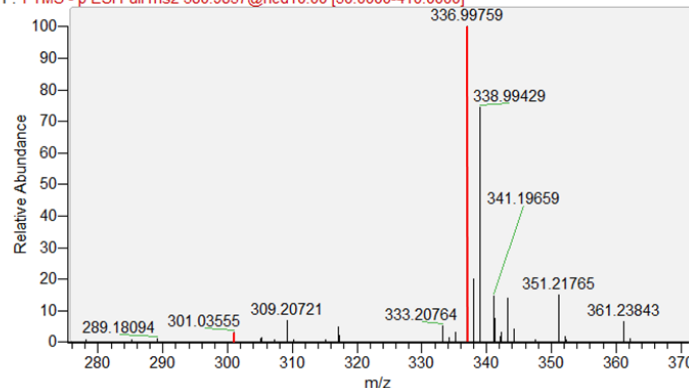
Rt = 21.70 NL: 4.68E5

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000]



Rt = 21.72 NL: 8.60E5

F: FTMS – p ESI Full ms2 380.9857@hcd10.00 [50.0000-410.0000]

Figure S20: Negative ESI (A) isotopic pattern of M15 ( $m/z$  381) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.

## 4.17. M16 – OH-DCF, lactam dehydrate

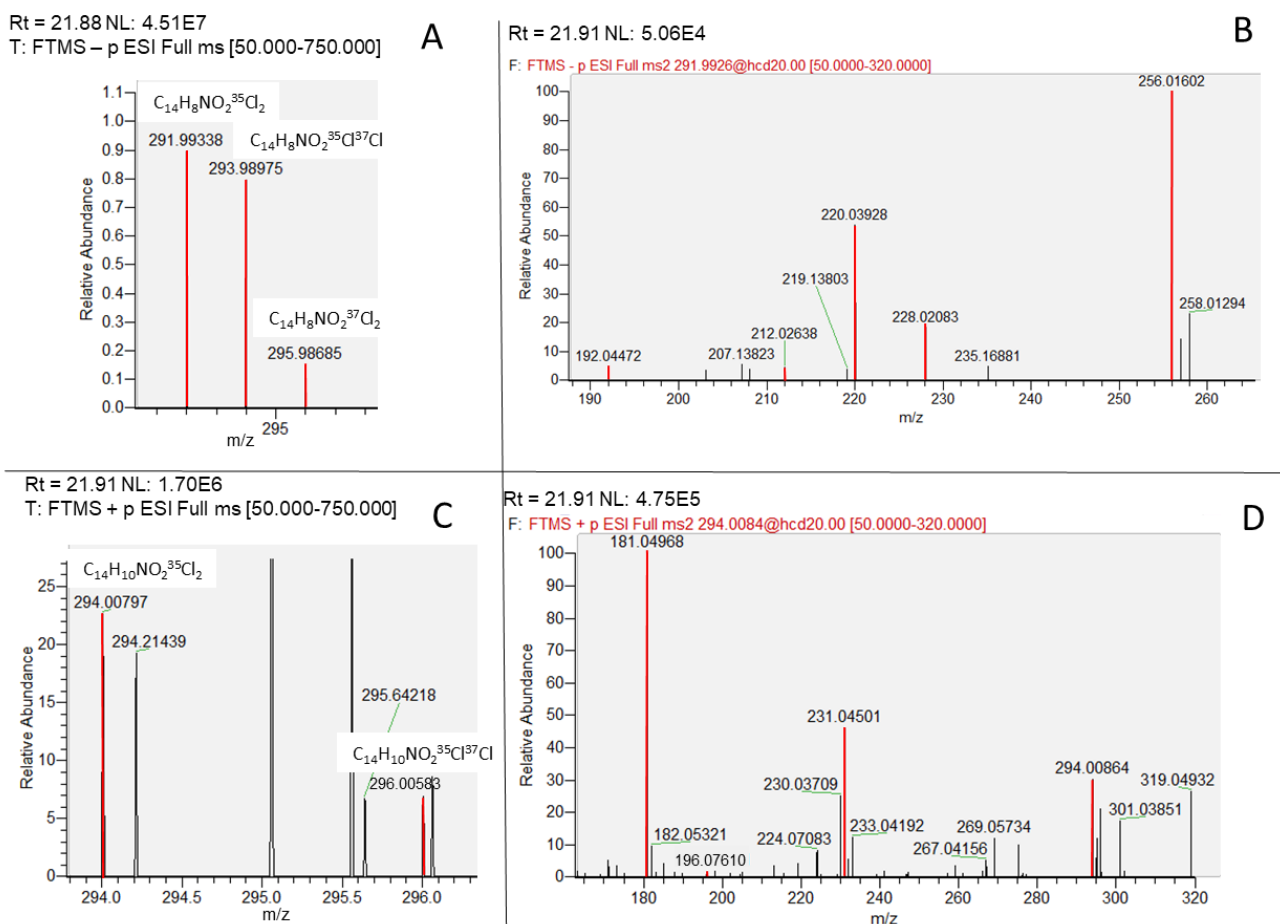


Figure S21: Negative ESI (A) isotopic pattern of M16 ( $m/z$  292) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (20 eV) and positive ESI (C) isotopic pattern of M16 ( $m/z$  294) and (D) fragments of interest in  $MS^2$  (20 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.

## 4.18. M17 – 4'OH-DCF

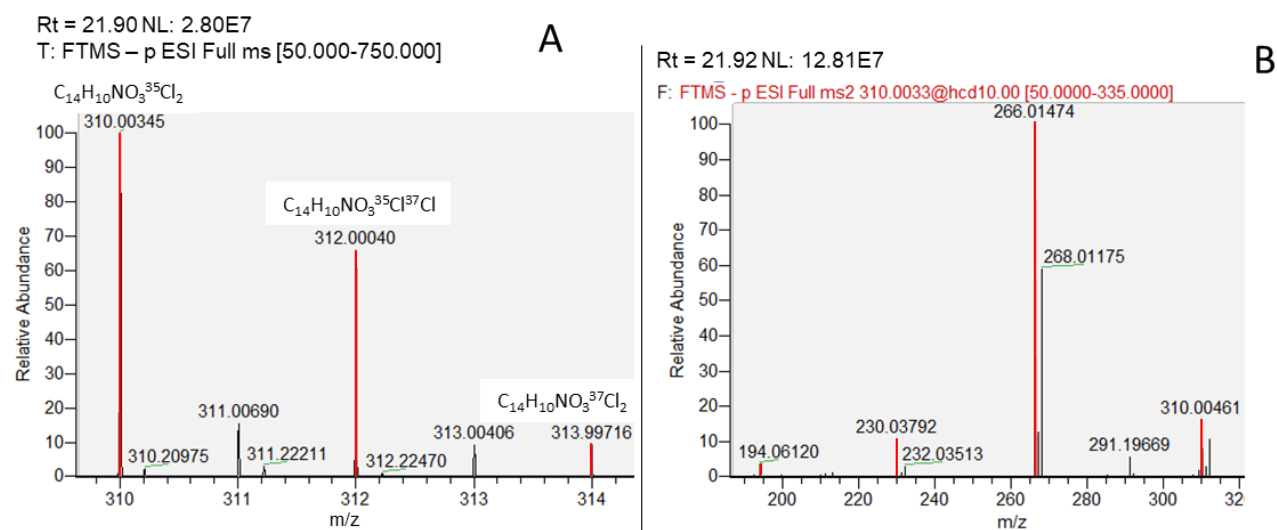
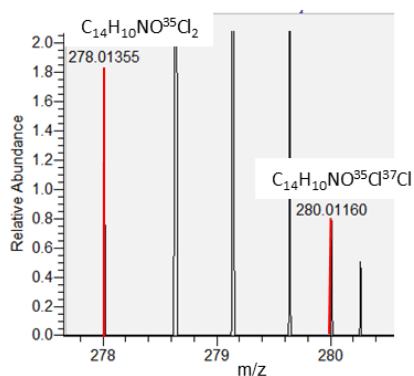


Figure S22: Negative ESI (A) isotopic pattern of M17 ( $m/z$  310) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (10 eV) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.

**4.19. M18 – DCF, lactam dehydrate**

Rt = 22.93 NL: 1.45E7

T: FTMS + p ESI Full ms [50.000-750.000] **A**

Rt = 22.92 NL: 4.06E4

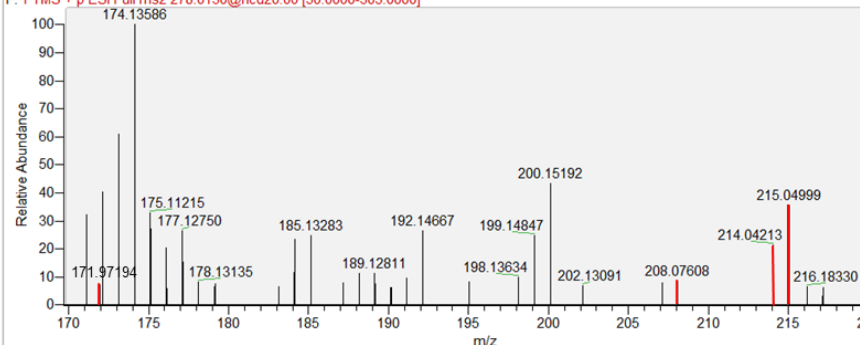
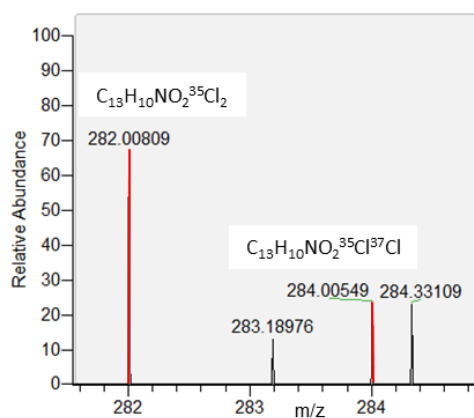
F: FTMS + p ESI Full ms2 278.0130@hcd20.00 [50.0000-305.0000] **B**

Figure S23: Positive ESI (A) isotopic pattern of M18 ( $m/z$  278) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (20 eV) (B) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 7 days to DCF.

**4.20. M19 – DCF benzoic acid**

Rt = 23.00 NL: 5.84E5

T: FTMS – p ESI Full ms [50.000-750.000] **A**

Rt = 22.99 NL: 3.33E5

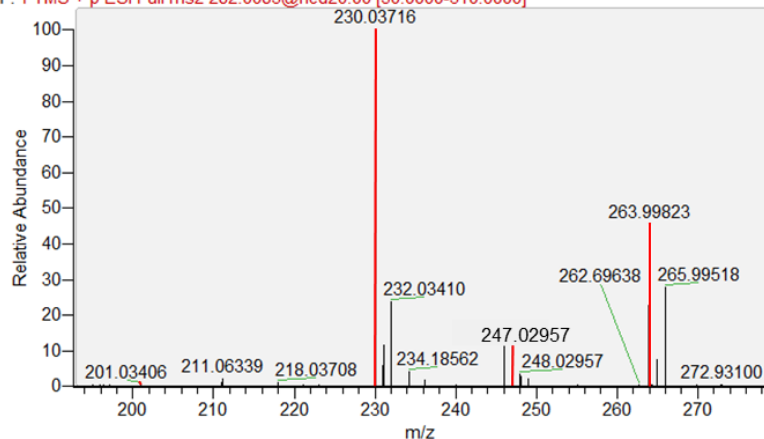
F: FTMS + p ESI Full ms2 282.0083@hcd20.00 [50.0000-310.0000] **B**

Figure S24: Positive ESI (A) isotopic pattern of M19 ( $m/z$  282) and (B) fragments of interest in  $MS^2$  (20 eV) (B) in a tissue sample of *L. stagnalis* exposed 3 days to DCF.

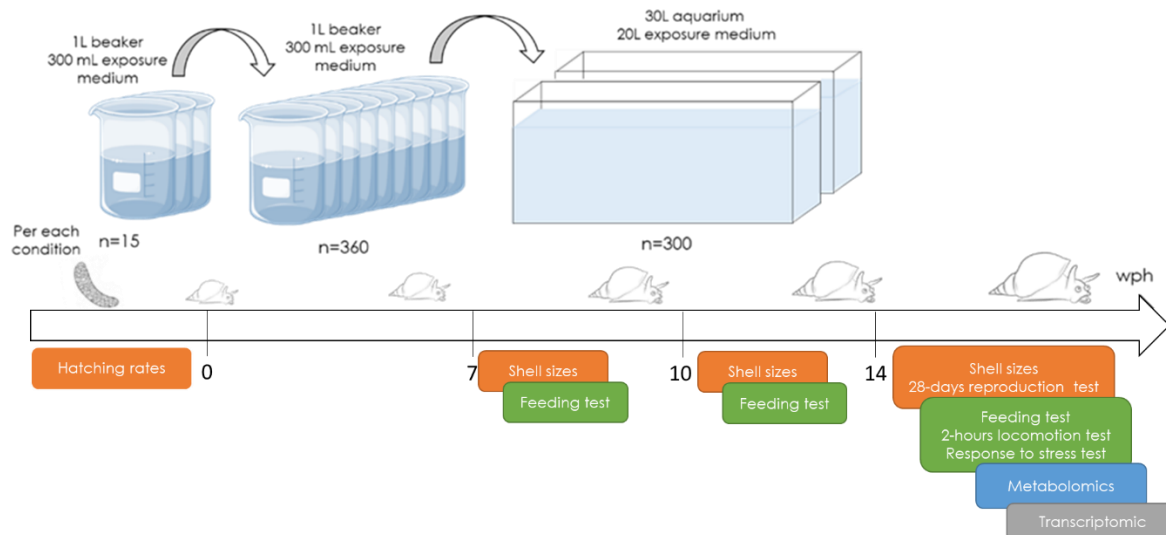


## ANNEXE II : Supplementary data article n°2

## Long-term exposure to low diclofenac concentrations impairs growth and induces molecular changes in *Lymnaea stagnalis* freshwater snails

Supplementary material

### 1. DCF exposure and chemical analysis of DCF in water



**Figure S-1.** Experimental design of diclofenac exposure in *Lymnaea stagnalis*, from the embryo to the adult stage. The experimental design was identical in all treatment conditions. Exposure medium refers to mineral water  $\pm$  DCF stock solution in order to obtain 0, 0.1  $\mu\text{g/L}$ , 2  $\mu\text{g/L}$  and 10  $\mu\text{g/L}$  exposure concentrations. Life history parameters are shown in orange, behavioral tests are shown in green; metabolomics is in blue and transcriptomic is in grey. wph: week(s) post-hatch.

For each nominal concentration, 3 water samples were taken at each life stage (egg mass; juvenile (3 wph); adult (12 wph)): for each stage, 1 sample was taken immediately after water renewal in the medium (day 0) and 2 samples were collected after 7 days of exposure (day 7), before water renewal. The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Chemical analysis was adapted from the method described by Lebreton et al. (2021). For each sample, 200 mL HCl acidified water (pH 2) was extracted on an SPE Strata C18-E column, 1 g/6 mL (Phenomenex, Le Pecq, France). Columns were then rinsed with 4 mL deionized water with HCl (pH 2) and dried for 4 h in a laboratory oven at  $45^{\circ}\text{C}$ . Components were eluted with 4 mL acetonitrile. The extracts were then dried under a nitrogen stream and reconstituted with 200  $\mu\text{L}$  acetonitrile. HPLC 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  $\mu\text{m}$  C18 (4.6  $\times$  250 mm) capillary column (Agela Technologies, Torrance, USA). The solvents were: A) water + 0.05% trifluoroacetic acid (TFA), and B) ACN + 0.05 % TFA. The elution gradient was as follows (t in min): t0, B = 30 %; t11, B = 100 %; t13, B = 100 %, t13.5, B = 30 %, t18, B = 30 %. The column oven temperature was set at  $40^{\circ}\text{C}$ , with a 20



$\mu\text{L}$  injection volume and 1 mL/min flow rate. The working UV wavelength was 275 nm. Data analyses were performed using ChromQuest 5.0. For DCF concentration quantification, 2 calibration curves were plotted in triplicate, with DCF dissolved in acetonitrile (external standard method). The first one was a 4 point-calibration curve spanning the 0.1-1 mg/L range, and the second one was a 5 point-calibration curve spanning the 1-10 mg/L range. Measurements were obtained in 1000X concentrated extracts, and the concentrations in water samples were then calculated, while taking the extraction recoveries into account. Stock solution DCF concentrations were measured using the same analytical method. The limit of quantification (LOQ) was 0.03 mg/L and the limit of detection (LOD) was 0.1 mg/L. Instrumental stability was checked regularly in triplicate by injecting a concentration corresponding to one point on the calibration curve.

**Table S-1.** Water concentrations of diclofenac (mean(SD)) in exposed tanks just after renewal of the medium (day 0) (n=3) and after a week (day 7) (n=6)

DCF nominal concentration	0.1 $\mu\text{g/L}$	2 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$
day 0	0.14 (0.10)	2.14 (0.15)	9.77 (0.64)
day 7	0.14 (0.06)	1.82 (0.54)	9.74 (1.38)

## 2. Metabolomics results

**Table S-2.** List of detected metabolites in LC-HRMS in *Lymnaea stagnalis* organs. ND: non detected

<sup>a</sup>Observed in Tufi et al., 2015a; <sup>b</sup>Observed in Tufi et al., 2015b

Metabolite	Main metabolism	Mass monoisotopic	Rt (min)	Reproductive apparatus		Heads	
				RSD (%)	Abundance	RSD (%)	Abundance
3,4-Dihydroxybenzeneacetic Acid <sup>a</sup>	Amino Acid	168.0423	6.75	1.24	+	ND	
3-Aminoisobutanoic Acid	Amino Acid	103.0633	2.65	6.2	+	ND	
4-Hydroxyproline	Amino Acid	131.0582	1.22	4.22	+++	2.54	++
5-Hydroxyindoleacetic Acid <sup>ab</sup>	Amino Acid	191.0582	7.93	4.56	+	ND	
5-L-Glutamyl-L-Alanine	Amino Acid	218.0903	1.95	ND		42.82	+
Anthranilate	Amino Acid	137.0477	8.7	2.42	+	29.85	+
Betaine <sup>b</sup>	Amino Acid	117.0790	1.34	2.3	++	2.1	+++
Choline <sup>ab</sup>	Amino Acid	104.1075	2.47	1.53	+++	5.06	++
Creatinine <sup>b</sup>	Amino Acid	113.0589	13.37	ND		44.01	++
DL-Kynurenine	Amino Acid	208.0848	7.79	7.76	+	37.56	+
Formylanthranilic Acid	Amino Acid	165.0426	9.54	7.05	+	ND	
gamma-Aminobutyric acid (GABA) <sup>ab</sup>	Amino Acid	103.0633	2.4	4.23	++	16.07	+
Glycine	Amino Acid	75.0320	1.4	3.96	++	12.17	++
Homogentisic Acid	Amino Acid	168.0423	4.46	25.28	++	5.4	+++
L-Alanine	Amino Acid	90.0550	1.5	0.95	+++	10.97	++
L- $\alpha$ -Aminobutyric Acid	Amino Acid	103.0633	1.67	8.18	++	ND	
L-Arginine	Amino Acid	174.1117	2.49	3.12	++	2.24	+++
L-Aspartic Acid	Amino Acid	133.0375	1.28	3.89	++	2.7	+++
L-Citrulline	Amino Acid	175.0957	1.42	4.73	++	11.29	++
L-Glutamic Acid <sup>b</sup>	Amino Acid	147.0532	1.45	2.24	+++	1.48	+++
L-Glutamine <sup>b</sup>	Amino Acid	146.0691	1.34	2.22	++	2.5	+++
L-Histidine <sup>b</sup>	Amino Acid	155.0695	2.1	2.81	++	26.18	++
L-Homoserine/L-Threonine /L-Allothreonine	Amino Acid	119.0582	1.38	3.92	++	1.96	++
L-Isoleucine	Amino Acid	131.0946	4.2	1.44	++	ND	
L-Leucine <sup>b</sup>	Amino Acid	131.0946	4.85	1.47	+++	ND	
L-Lysine	Amino Acid	146.1055	2.61	ND		5.38	+++
L-Methionine	Amino Acid	149.0510	2.37	36.17	++	5.17	++
L-Ornithine	Amino Acid	132.0899	2.46	ND		7.72	+++
L-Phenylalanine <sup>ab</sup>	Amino Acid	165.0790	7.22	1.58	++	3.62	+++
L-Proline <sup>ab</sup>	Amino Acid	115.0633	1.42	5.07	+++	5.13	+++
L-Serine	Amino Acid	105.0426	1.32	2.25	++	2.05	++
L-Tryptophan <sup>ab</sup>	Amino Acid	204.0899	9.75	2.16	+++	4.95	++
L-Tyrosine <sup>a</sup>	Amino Acid	149.0510	4.08	3.71	++	2.32	++
L-Valine <sup>b</sup>	Amino Acid	117.0790	2.3	32.97	++	1.67	++
N <sup>1</sup> -Formylkynurenine	Amino Acid	235.0724	7.28	12.5	+	ND	
Oxidized Glutathione	Amino Acid	612.1520	2.5	2.97	+++	ND	
Phenylpyruvic Acid	Amino Acid	164.0473	8.91	3.7	++	ND	
Pipecolic Acid <sup>b</sup>	Amino Acid	129.0790	2.1	1.6	++	ND	

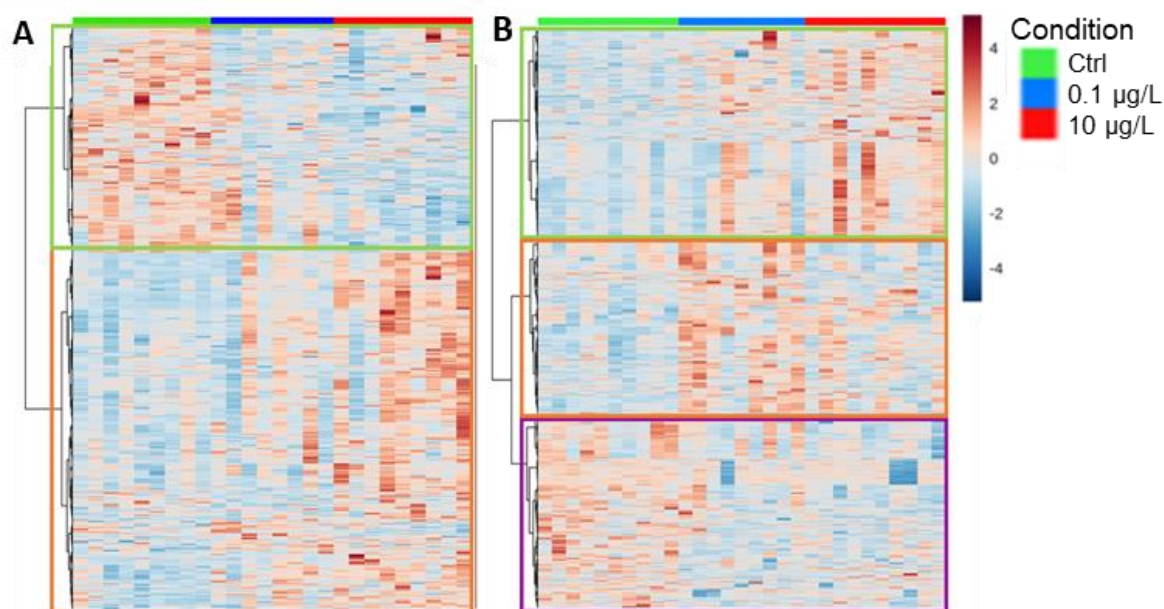
Putrescine <sup>b</sup>	Amino Acid	88.1000	5.05	1.57	++	12.99	++
Saccharopine	Amino Acid	276.1321	1.49	7.27	+	24.92	+
Serotonin <sup>ab</sup>	Amino Acid	176.0950	9.01	21.7	++	4.49	++
Citric Acid	Carbohydrate	192.0270	1.6	ND		1.83	++
Dihydroxyacetone Phosphate	Carbohydrate	169.9980	0.89	2.14	++	8.96	++
DL-Lactic Acid <sup>a</sup>	Carbohydrate	90.0317	1.57	2.15	+++		
Fumaric Acid <sup>a</sup>	Carbohydrate	116.0110	2.09	3.26	++	3.33	++
Gluconic Acid	Carbohydrate	196.0583	1.11	3.12	++	2.68	++
Glucosamine 6-Phosphate	Carbohydrate	259.0457	1.18	ND		30.19	+
Glyceric Acid	Carbohydrate	106.0266	1.19	4.8	++	5.9	++
Glyoxylic Acid	Carbohydrate	74.0004	1.14	3.5	++	ND	
L-Malic Acid	Carbohydrate	134.0215	1.32	3.2	++	1.79	+++
N-Acetyl-D-Glucosamine	Carbohydrate	221.0899	1.1	7.38	++	2.07	++
N-Acetylmannosamine	Carbohydrate	221.0899	1.13	4.34	++	2.07	++
Pyruvic Acid <sup>a</sup>	Carbohydrate	88.0160	1.16	5.88	++	ND	
Succinic Acid <sup>a</sup>	Carbohydrate	118.0266	1.95	10.32	++	1.09	++
3'-Adenosine Monophosphate	Nucleotide	347.0631	1.21	2.25	+++	ND	
Adenine <sup>ab</sup>	Nucleotide	135.0545	2.96	3.43	++	5.9	++
Adenosine <sup>a</sup>	Nucleotide	267.0968	3.46	1.18	+++	4.52	++
β-Alanine	Nucleotide	89.0477	2.08	20.5	++	ND	
Cytidine <sup>a</sup>	Nucleotide	243.0855	2.76	3.65	++	4.34	++
Cytosine	Nucleotide	111.0433	2.38	2.69	+	ND	
dCMP	Nucleotide	307.0569	1.23	19.78	+	ND	
Deoxyuridine	Nucleotide	228.0746	1.97	ND		28.95	+
Guanine <sup>ab</sup>	Nucleotide	151.0494	2.44	2.8	+++	1.88	++
Guanosine <sup>b</sup>	Nucleotide	283.0917	2.2	1.44	++	4.34	++
Guanosine Monophosphate	Nucleotide	363.0580	1.1	2.61	++	4.16	++
Hypoxanthine <sup>b</sup>	Nucleotide	136.0385	1.7	5.03	++	7.67	++
Inosine <sup>ab</sup>	Nucleotide	268.0808	1.85	9.7	++	3.7	++
Inosine-5'-Monophosphate	Nucleotide	348.0471	1	2.62	+++	11.17	++
Orotidine	Nucleotide	288.0594	0.92	9.36	+	ND	
Pseudouridine	Nucleotide	244.0695	1.24	6.69	+	ND	
Uracil <sup>b</sup>	Nucleotide	112.0273	1.63	3.18	++	ND	
Urea	Nucleotide	60.0324	1.15	2.06	+++	ND	
Uridine <sup>ab</sup>	Nucleotide	244.0695	1.68	17.62	++	5.11	++
Xanthine <sup>ab</sup>	Nucleotide	152.0334	1.94	ND		3	++
3-Methyl-2-Oxovaleric Acid <sup>b</sup>	Others	130.0630	7.17	4.48	++	14.95	++
4-Methylpentanal	Others	100.0888	8.27	3.9	++	ND	
Cysteineglutathione Disulfide	Others	426.0879	1.49	4.37	++	8.96	++
Glutaric Acid	Others	132.0423	2.69	7.69	++	4.2	++
Glycerophosphorylcholine	Others	257.1028	1.1	1.72	+++	6.24	++
Glycylproline	Others	172.0848	3.33	4.02	+		
Hypotaurine	Others	109.0197	1.1	3.08	++		
L-Acetylcarnitine <sup>b</sup>	Others	203.1158	6.14	3	++	4.87	++
Lactaldehyde	Others	74.0368	14.56	3.87	++	5.7	++

L-Carnitine <sup>ab</sup>	Others	161.1052	2.63	2.87	++	2.2	++
L-Homocysteic Acid	Others	183.0201	1.07	ND		32.67	+
Mevalonic Acid	Others	148.0736	1.98	ND		24.26	+
N-Acetyl-L-Aspartic Acid	Others	175.0481	1.6	ND		48.67	++
Niacinamide <sup>b</sup>	Others	122.0480	2.5	0.78	++	1.79	+++
Nicotinamide Riboside	Others	255.0981	12.16	5.43	++	ND	
Nicotinic Acid	Others	123.0320	1.88	7.27	++	7.22	++
Pantothenic Acid	Others	219.1107	2.86	4.26	++	5.13	++
Phthalic Acid	Others	166.0266	7.95	5.2	++	ND	
Pimelic Acid	Others	160.0736	7.38	2.96	+	6.12	++
Proline Betaine	Others	143.0946	1.64	7.36	++	11.6	++
Prostaglandin E <sub>2</sub> or D <sub>2</sub>	Others	352.2244	13.30	4.10	++	9.4	++
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	Others	354.2401	13.38	2.66	+	3.0	++
Pyridoxal	Others	167.0582	3.71	6.68	+	ND	
Pyrrolidin-2-one	Others	85.0528	1.83	35.8	++	15.64	++
Tetradecanedioic Acid	Others	258.1831	12.62	2.24	++	4.88	+++
Trigonelline	Others	137.0477	1.49	2.72	++	23.7	++

**Table S-3.** Information on features detected in the *Lymnaea stagnalis* reproductive apparatus and head samples. <sup>a</sup>RSD <20%; 65 s <Rt <1260 s, extracted-ion chromatogram quality; <sup>b</sup>significantly different between control and exposed group (Welch, p <0.1)

	Reproductive apparatus		Heads	
	ESI-	ESI+	ESI-	ESI+
Ions detected	4196	8643	3908	5218
Ions with RSD <30%	4028 (96%)	7174 (83%)	3048 (78%)	3600 (69%)
Ions analytically selected <sup>a</sup>	3040 (72%)	6014 (70%)	2312 (59%)	3133 (60%)
Ions significantly different <sup>b</sup> Ctrl vs 0.1 µg/L	304 (7%)	291 (3%)	319 (8%)	306 (6%)
Ions significantly different <sup>b</sup> Ctrl vs 10 µg/L	629 (15%)	598 (7%)	343 (9%)	565 (11%)

To highlight trends, Figure S-2 represents a heat map with a hierarchical analysis of metabolite abundances. There were two major clusters for the reproductive apparatus (framed in green and orange) (Fig. S-2A), while the hierarchical analysis for head samples (Fig. S2-B) showed 3 major clusters (framed in green, orange and red). The green frame highlights down modulation of metabolites in both DCF exposed groups whereas the orange frame displays metabolites exhibiting up-modulation mostly in 10 µg/L DCF exposed snails. Metabolites framed in red were up-modulated principally at 0.1 µg/L DCF concentration.



**Figure S-2.** Heat map representing abundances of selected metabolites ( $p > 0.1$ , abundance variation >20%) in the reproductive apparatus (A) and heads (B) of control and 0.1, 10 µg/L exposed *L. stagnalis* snails. All data were mean-centered and autoscaled and dendrograms represent the hierarchical analysis for metabolite clustering. Green, orange and red frames represent different metabolite clusters.

### 3. Transcriptomic results

**Table S-4.** List of differentially expressed genes (DEGs) in reproductive apparatus. FC: fold-change, padj: FDR adjusted p-value<sup>a</sup>Also differentially expressed in heads

Gene	Ctrl vs 0.1 µg/L			Ctrl vs 10 µg/L			Uniprot-ID	Uniprot-annotation	Species	Pvalue annotation
	logFC	FC	padj	logFC	FC	padj				
GSLYST00000068001	2.39	5.23	0.0003	1.02	2.03	0.5512	Q6NRG5	NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1	<i>Xenopus laevis</i>	0.00E+00
GSLYST00000453001	4.59	24.17	0.3243	6.19	73.09	0.0209				
GSLYST00001969001 <sup>a</sup>	1.40	2.63	0.0393	1.32	2.50	0.0736	B5RI51	UNREVIEWED Barrier-to-autointegration factor	<i>Salmo salar</i>	1.10E-13
GSLYST00002165001	-1.49	-2.82	0.0174	-0.87	-1.83	0.4822	O00625	Pirin	<i>Homo sapiens</i>	2.53E-125
GSLYST00002642001	2.12	4.36	0.0387	1.00	2.01	0.6784	O42646	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 6	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.41E-13
GSLYST00002669001	3.65	12.54	0.0393	4.41	21.24	0.0056	A0A0F7Z3J2	Thyrostimulin α-2 subunit	<i>Conus victoriae</i>	4.50E-53
GSLYST00002734001 <sup>a</sup>	5.94	61.37	0.0303	6.84	114.32	0.0032				
GSLYST00002937001	2.85	7.19	0.0090	0.37	1.29	0.9349	P14184	Lipopolysaccharide cholinephosphotransferase LicD	<i>Haemophilus influenzae</i>	4.45E-06
GSLYST00003183001	1.77	3.41	0.0391	-0.14	-1.10	0.9766	O14815	Calpain-9	<i>Homo sapiens</i>	3.97E-69
GSLYST00003209001 <sup>a</sup>	6.30	79.00	0.0000	6.64	99.77	0.0000	Q9VU52	Protein sneaky	<i>Drosophila melanogaster</i>	3.07E-54
GSLYST00003318001 <sup>a</sup>	-11.58	-3064.41	0.0284	-1.12	-2.18	0.9178	O57460	Dorsal-ventral patterning tolloid-like protein 1	<i>Danio rerio</i>	2.00E-75
GSLYST00003453001	2.93	7.61	0.7408	7.40	168.99	0.0083	A0A1X7VUB4	UNREVIEWED ANK_REP_REGION domain-containing protein	<i>Amphimedon queenslandica</i>	8.30E-41
GSLYST00003707001	-2.57	-5.96	0.0417	-0.92	-1.89	0.7468	P68370	Tubulin α-1A chain	<i>Rattus norvegicus</i>	0.00E+00
GSLYST00004181001	4.45	21.80	0.0074	0.20	1.15	0.9957	Q5CZC0	Fibrous sheath-interacting protein 2	<i>Homo sapiens</i>	2.23E-10
GSLYST00005681001	9.10	550.24	0.0043	6.09	68.35	0.1747	A0A2C9KM49	UNREVIEWED PLAT domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	4.30E-02
GSLYST00005687001	5.88	58.93	0.0438	5.50	45.39	0.0970	A0A2C9KM50	UNREVIEWED PLAT domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	8.80E-41
GSLYST00005688001	5.65	50.29	0.0038	4.72	26.36	0.0324	A0A2C9KM51	UNREVIEWED PLAT domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	4.00E-34
GSLYST00005918001	2.05	4.15	0.0422	0.65	1.57	0.7902	A4IGL7	Peroxidasin	<i>Xenopus tropicalis</i>	9.05E-89
GSLYST00006128001	1.53	2.89	0.5921	2.87	7.32	0.0280	P98068	Protein SpAN	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	1.63E-59
GSLYST00006477001	1.62	3.07	0.5543	2.94	7.66	0.0324				
GSLYST00006500001	3.43	10.75	0.0017	3.16	8.93	0.0062	Q28CE7	Zinc transporter 5	<i>Xenopus tropicalis</i>	0.00E+00
GSLYST00006670001	-0.68	-1.60	0.7245	-1.70	-3.25	0.0130	A0A2C9KXA5	UNREVIEWED C1q domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	2.80E-12
GSLYST00007091001	2.24	4.73	0.0198	0.84	1.79	0.7446	E9AEM8	UNREVIEWED Proteophosphoglycan ppg4	<i>Leishmania major</i>	4.80E-14

ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00007602001	-8.18	-290.31	0.0085	0.25	1.19	0.9954				
GSLYST00007716001	-7.08	-135.17	0.0174	-2.09	-4.27	0.6770				
GSLYST00007891001	2.19	4.57	0.0061	0.60	1.52	0.7902	Q920S2	Serine protease 41	<i>Mus musculus</i>	2.07E-22
GSLYST00008018001	1.79	3.46	0.1522	2.14	4.40	0.0344				
GSLYST00008295001	1.15	2.22	0.1641	1.56	2.96	0.0083	O42611	Protein HIRA	<i>Takifugu rubripes</i>	0.00E+00
GSLYST00008298001 <sup>a</sup>	1.97	3.93	0.0002	2.99	7.94	0.0000	O61309	Nitric oxide synthase	<i>Lymnaea stagnalis</i>	0.00E+00
GSLYST00008752001	1.68	3.21	0.0289	1.73	3.33	0.0211	P34147	Rho-related protein racA	<i>Dictyostelium discoideum</i>	5.44E-154
GSLYST00008924001 <sup>a</sup>	10.05	1056.86	0.0211	9.98	1009.16	0.0262	Q9P2D7	Dynein heavy chain 1, axonemal	<i>Homo sapiens</i>	1.98E-87
GSLYST00009020001	7.62	196.95	0.0070	7.41	169.75	0.0105				
GSLYST00009243001	-1.69	-3.23	0.1479	-2.85	-7.21	0.0002				
GSLYST00009302001 <sup>a</sup>	4.45	21.88	0.0000	2.23	4.70	0.3163	A0A2C9LAK1	UNREVIEWED Ig-like domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	5.80E-16
GSLYST00009925001	2.90	7.46	0.0211	2.97	7.82	0.0189	A1DCB2	DNA mismatch repair protein msh3	<i>Neosartorya fischeri</i>	1.20E-01
GSLYST00010396001	2.38	5.20	0.0096	1.20	2.30	0.5616	P83088	α-(1,3)-fucosyltransferase C	<i>Drosophila melanogaster</i>	3.43E-41
GSLYST00010721001	-1.87	3.65	0.4843	-5.07	-33.56	0.0001				
GSLYST00010941001 <sup>a</sup>	-0.37	-1.29	0.9941	-5.00	-31.93	0.0269				
GSLYST00010979001	3.77	13.62	0.0069	2.28	4.87	0.3820	O95897	Noelin-2	<i>Homo sapiens</i>	5.49E-44
GSLYST00011026001	4.87	29.28	0.0000	5.18	36.21	0.0000				
GSLYST00011109001	2.57	5.93	0.0593	3.62	12.28	0.0006				
GSLYST00011358001	-6.20	-73.54	0.0096	-4.40	-21.13	0.0330				
GSLYST00011412001	-1.16	-2.24	0.6487	-3.16	-8.95	0.0012	Q8BY35 F1LWT0 P04507	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 2 SUMO-interacting motif-containing protein 1 Outer capsid protein sigma-1	<i>Mus musculus</i> <i>Rattus norvegicus</i> <i>Reovirus type 2</i>	1.62E-88 0.000252 0.018
GSLYST00011453001 <sup>a</sup>	1.49	2.82	0.0476	-0.20	1.15	0.9441	Q10751	Angiotensin-converting enzyme (Fragment)	<i>Gallus gallus</i>	0.00E+00
GSLYST00011522001	-1.71	-3.26	0.0042	-1.13	-2.19	0.2311	A0A420YI78	UNREVIEWED Protein kinase domain-containing protein	<i>Coniochaeta pulveracea</i>	4.20E-02
GSLYST00011565001	-0.68	-1.60	0.8446	-2.84	-7.18	0.0062	Q8HZK2	Dual oxidase 2	<i>Sus scrofa</i>	0.00E+00
GSLYST00011987001 <sup>a</sup>	0.00	1.00	1.0000	-2.10	-4.29	0.0113	A0A1R1Y395	UNREVIEWED Peroxisomal biogenesis factor 3	<i>Smittium culicis</i>	3.60E-03
GSLYST00012348001	2.72	6.59	0.0042	3.19	9.11	0.0002	Q8IZP9	Adhesion G-protein coupled receptor G2	<i>Homo sapiens</i>	1.37E-84
GSLYST00012736001	3.68	12.77	0.0049	1.82	3.52	0.5283	A0ONLY7	Isatin hydrolase	<i>Labrenzia aggregata</i>	2.35E-27
GSLYST00012977001	-4.26	-19.14	0.0002	-3.20	-9.21	0.0062	Q9R1S8	Calpain-7	<i>Mus musculus</i>	0.00E+00
GSLYST00013611001	1.84	3.57	0.2099	3.36	10.26	0.0002				
GSLYST00013871001	1.25	2.38	0.1690	1.53	2.90	0.0332	Q96M20	Cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 2	<i>Homo sapiens</i>	1.77E-05
GSLYST00014705001	6.64	99.57	0.0174	3.09	8.54	0.6867	A0A433SMH0	UNREVIEWED Chitin-binding type-2 domain-containing protein	<i>Elysia chlorotica</i>	1.70E-18
GSLYST00015038001	2.20	4.58	0.0072	1.45	2.73	0.2967	Q3SZJ4	Prostaglandin reductase 1	<i>Bos taurus</i>	6.18E-92



## ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00015247001	1.58	3.00	0.1210	2.01	4.03	0.0105				
GSLYST00015248001	1.91	3.75	0.0109	1.93	3.81	0.0105				
GSLYST00015311001	0.46	1.37	0.9542	3.20	9.18	0.0113	Q64449	C-type mannose receptor 2	<i>Mus musculus</i>	4.93E-12
GSLYST00015517001	1.24	2.37	0.5666	2.44	5.45	0.0105	Q49429	Protein P200	<i>Mycoplasma genitalium</i>	3.00E-02
GSLYST00016188001	5.29	39.02	0.0333	3.85	14.41	0.3372	POC6U3	Replicase polyprotein 1a	<i>Human coronavirus HKU1 (isolate N1)</i>	2.63E-22
GSLYST00016209001	2.37	5.16	0.1665	3.17	8.99	0.0088	B3EWZ6	MAM and LDL-receptor class A domain-containing protein 2 (Fragment)	<i>Acropora millepora</i>	0.00E+00
GSLYST00016343001	1.23	2.35	0.8677	4.14	17.57	0.0380	A0A3S1BBV3	UNREVIEWED BTB domain-containing protein	<i>Elysia chlorotica</i>	9.70E-96
GSLYST00016439001	1.48	2.80	0.0319	1.05	2.07	0.3488	A0JM12	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10	<i>Xenopus tropicalis</i>	1.40E-87
GSLYST00017386001 <sup>a</sup>	4.16	17.93	0.0002	4.10	17.10	0.0003	P49632	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	<i>Caenorhabditis elegans</i>	4.60E-12
GSLYST00017668001	0.31	1.24	0.9871	2.75	6.72	0.0324	P07314	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	<i>Rattus norvegicus</i>	2.10E-118
GSLYST00017860001 <sup>a</sup>	1.55	2.93	0.8595	5.50	45.23	0.0474	A0A0A1UF70	UNREVIEWED Calponin-homology (CH) domain-containing protein	<i>Entamoeba invadens IP1</i>	7.90E-10
GSLYST00018020001	-0.74	-1.67	0.7276	-2.00	-3.99	0.0072	P52293	Importin subunit alpha-1	<i>Mus musculus</i>	0.00E+00
GSLYST00018033001	-0.86	-1.82	0.7245	-2.03	-4.08	0.0269				
GSLYST00018294001	0.59	1.51	0.7657	1.62	3.08	0.0269	A0A3S0ZT11	UNREVIEWED Lipase domain-containing protein	<i>Elysia chlorotica</i>	1.60E-138
GSLYST00018470001	2.10	4.28	0.0009	1.67	3.18	0.0269	P12270	Nucleoprotein TPR	<i>Homo sapiens</i>	0.00E+00
GSLYST00018602001	2.02	4.06	0.0389	1.36	2.57	0.4142	A0A4S4BXZ8	UNREVIEWED DUF3990 domain-containing protein	<i>Cohnella sp. CC-MHH1044</i>	7.6e-14
GSLYST00018675001	-5.98	-63.17	0.0000	-1.89	-3.71	0.3426	Q2TBI0	Lipopolysaccharide-binding protein	<i>Bos taurus</i>	2.77E-18
GSLYST00018719001	3.76	13.56	0.0107	3.11	8.66	0.0948	Q4ADV7	Guanine nucleotide exchange factor subunit RIC1	<i>Homo sapiens</i>	0.00E+00
GSLYST00018833001	2.54	5.82	0.0043	2.13	4.38	0.0375	P10184	Ovoinhibitor	<i>Gallus gallus</i>	5.64E-46
GSLYST00019447001	4.51	22.86	0.0042	2.86	7.26	0.2863	Q8LIY8	Carotenoid cleavage dioxygenase 8 homolog B, chloroplastic	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	2.30E-33
GSLYST00021497001	4.54	23.21	0.0391	4.15	17.70	0.0970	F4HT21	Immune-associated nucleotide-binding protein 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7.07E-32
GSLYST00021675001	3.43	10.75	0.0303	1.21	2.31	0.7468	A0A3S0Z6W2	UNREVIEWED EGF-like domain-containing protein	<i>Elysia chlorotica</i>	1.00E-22
GSLYST00021755001	1.82	3.53	0.0107	0.76	1.69	0.6896				
GSLYST00021874001	-1.67	-3.18	0.0333	-0.22	-1.16	0.9417	Q62283	Tetraspanin-7	<i>Mus musculus</i>	9.33E-63



**Table S-5.** List of differentially expressed genes (DEGs) in heads. FC: fold-change, padj: FDR adjusted p-value <sup>a</sup>Also differentially expressed in reproductive apparatus

Gene	Ctrl vs 0.1 µg/L			Ctrl vs 10 µg/L			Uniprot-ID	Uniprot-annotation	Species	Pvalue mapping
	logFC	FC	padj	logFC	FC	padj				
GSLYST00000239001	7.22	148.71	0.0218	7.35	163.12	0.0078	O81025	Immune-associated nucleotide-binding protein 10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9.59E-13
GSLYST00000240001	9.97	1001.54	0.0001	10.97	2005.55	0.0000	O81025	Immune-associated nucleotide-binding protein 10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4.72E-26
GSLYST00000241001	4.41	21.26	0.0255	5.79	55.46	0.0005	P54120	Immune-associated nucleotide-binding protein 8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.71E-23
GSLYST00000614001	-3.21	-9.22	0.8058	-8.73	-426.04	0.0139				
GSLYST00000837001	2.04	4.11	0.3728	2.71	6.55	0.0388				
GSLYST00001019001	-1.63	-3.10	0.7735	-3.03	-8.16	0.0464				
GSLYST00001098001	6.21	74.13	0.2826	7.79	220.82	0.0357				
GSLYST00001099001	5.08	33.77	0.4446	8.29	313.92	0.0062				
GSLYST00001333001	-2.24	-4.73	0.0292	-0.40	-1.32	1.0000	Q96M96	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 4	<i>Homo sapiens</i>	1.08E-71
GSLYST00001341001	-0.16	-1.11	1.0000	-4.56	-23.62	0.0495	AONLY7			
GSLYST00001343001	1.15	2.21	0.4922	2.58	5.96	0.0001	Q8BZ20	Isatin hydrolase	<i>Labrenzia aggregata</i>	9.71E-24
GSLYST00001523001	4.27	19.28	0.0002	4.49	22.45	0.0000	Q8BZ20	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP12	<i>Mus musculus</i>	6.29E-08
GSLYST00001523001	4.27	19.28	0.0002	4.49	22.45	0.0000	Q8TDB6	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	<i>Homo sapiens</i>	1.79E-30
GSLYST00001705001	-1.66	-3.17	0.2429	-2.27	-4.83	0.0100	Q64176	Carboxylesterase 1E	<i>Mus musculus</i>	8.06E-66
GSLYST00001871001	0.26	1.20	1.0000	-4.84	-28.56	0.0445	Q8N6F8	Methyltransferase-like protein 27	<i>Homo sapiens</i>	3.55E-26
GSLYST00001969001 <sup>a</sup>	1.01	2.02	0.6077	1.67	3.18	0.0303	B5RI51	UNREVIEWED Barrier-to-autointegration factor	<i>Salmo salar</i>	1.10E-13
GSLYST00002012001	4.12	17.42	0.0000	4.33	20.12	0.0000	Q1GGM4	UNREVIEWED Ribonuclease E	<i>Ruegeria sp.</i>	7.60E-03
GSLYST00002013001	4.03	16.36	0.0000	3.99	15.85	0.0000				
GSLYST00002087001	-2.38	-5.19	0.4641	-5.06	-33.32	0.0012	Q13231	Chitotriidase-1	<i>Homo sapiens</i>	1.65E-46
GSLYST00002161001	-1.91	-3.75	0.2304	-2.38	-5.20	0.0237	P10079	Fibropellin-1	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	1.24E-95
GSLYST00002220001	2.63	6.18	0.0531	3.58	11.98	0.0005	Q6B9X6	α-protein kinase vwKA	<i>Dictyostelium discoideum</i>	1.66E-05
GSLYST00002346001	0.11	1.08	1.0000	-1.87	-3.66	0.0012	A0A3S1BDU1	UNREVIEWED Caveolin	<i>Elysia chlorotica</i>	7.80E-86
GSLYST00002412001	2.06	4.16	0.7337	3.50	11.33	0.0400				
GSLYST00002556001	-2.33	-5.02	0.4893	-3.37	-10.33	0.0453	Q9NBX4 Q95SX7 Q9ULJ7	Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon X-element Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon BS Ankyrin repeat domain-containing protein 50	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Homo sapiens</i>	1.51E-19 1.00E-03 9.99E-55
GSLYST00002603001	-3.49	-11.25	0.6098	-5.86	-58.08	0.0388	A6NMZ7	Collagen α-6(VI) chain	<i>Homo sapiens</i>	9.40E-46
GSLYST00002670001	3.46	10.97	0.3135	3.98	15.76	0.0484	Q9VZW5	FMRFamide receptor	<i>Drosophila melanogaster</i>	1.54E-06
GSLYST00002720001	-0.66	-1.58	0.9551	-2.27	-4.82	0.0283				

## ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00002721001	-1.27	-2.41	0.9551	-4.05	-16.60	0.0237	O13147	Ephrin type-B receptor 3 (Fragment)	<i>Danio rerio</i>	2.20E-02
GSLYST00002722001	-1.40	2.64	0.9198	-4.14	-17.59	0.0268				
GSLYST00002728001	6.16	71.45	0.0431	6.26	76.89	0.0126				
GSLYST00002734001 <sup>a</sup>	8.70	416.22	0.0044	9.47	707.15	0.0006	A0A0F7Z3J2	Thyrostimulin alpha-2 subunit	<i>Conus victoriae</i>	4.50E-53
GSLYST00003114001	-1.26	-2.40	0.8703	-3.83	-14.27	0.0032	Q6DGN0	Ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor-like protein	<i>Danio rerio</i>	5.60E-32
GSLYST00003181001	1.76	3.38	0.0460	1.98	3.96	0.0059	Q6ZS19	Calpain-12	<i>Homo sapiens</i>	1.99E-68
GSLYST00003209001 <sup>a</sup>	5.06	33.27	0.0809	5.94	61.43	0.0124	Q9VU52	Protein sneaky	<i>Drosophila melanogaster</i>	3.07E-54
GSLYST00003318001 <sup>a</sup>	-10.14	1127.37	0.0379	-4.26	-19.14	0.5902	O57460	Dorsal-ventral patterning tolloid-like protein 1	<i>Danio rerio</i>	2E-75
GSLYST00003452001	0.24	1.18	1.0000	-4.36	-20.48	0.0012				
GSLYST00003510001	-4.07	16.75	0.8553	-10.65	1612.31	0.0445				
GSLYST00003628001	0.79	1.73	0.8352	1.63	3.09	0.0297	Q8NHV1	GTPase IMAP family member 7	<i>Homo sapiens</i>	1.16E-18
GSLYST00003768001	-4.97	-31.41	0.0809	-6.07	-66.98	0.0078	P60988	Prolactin-inducible protein homolog	<i>Macaca fuscata fuscata</i>	8.70E-02
GSLYST00003901001	2.79	6.93	0.1858	3.35	10.19	0.0237	A4FFX3	Malate dehydrogenase	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	2.10E-01
GSLYST00003902001	2.66	6.32	0.0674	3.29	9.78	0.0046	Q5QNM6	Putative CBL-interacting protein kinase 13	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	1.56E-08
GSLYST00003903001	2.77	6.81	0.0130	2.66	6.32	0.0081	A0A2C9M123	UNREVIEWED Non-specific protein-tyrosine kinase	<i>Biomphalaria glabrata</i>	1.80E-13
GSLYST00003904001	2.87	7.31	0.0013	2.53	5.78	0.0036	Q9M0X5	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.90E-07
GSLYST00003926001	-1.79	-3.46	0.4641	-2.59	-6.02	0.0328	A4IGL7	Peroxidasin	<i>Xenopus tropicalis</i>	4.29E-92
GSLYST00003960001	-3.70	-13.01	0.2034	-5.71	-52.42	0.0041	P06308	Ovulation prohormone	<i>Lymnaea stagnalis</i>	6.70E-10
GSLYST00004147001	2.11	4.32	0.9083	5.45	43.85	0.0237				
GSLYST00004153001	3.52	11.49	0.1875	4.82	28.33	0.0069	W2SH45	UNREVIEWED Cysteine dioxygenase	<i>Necator americanus</i>	2.00E-18
GSLYST00004154001	4.45	21.80	0.0002	5.67	51.05	0.0000	W2SH46	UNREVIEWED Cysteine dioxygenase	<i>Necator americanus</i>	4.70E-25
GSLYST00004174001	-5.36	-41.09	0.0261	-5.06	-33.36	0.0155	P05208	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	<i>Mus musculus</i>	6.43E-36
GSLYST00004175001	-6.57	-94.90	0.0480	-4.98	-31.54	0.0625	P05208	Chymotrypsin-like elastase family member 2A	<i>Mus musculus</i>	2.03E-32
GSLYST00004385001	-4.31	-19.84	0.2778	-6.78	-110.02	0.0089				
GSLYST00004655001	-4.67	-25.39	0.4814	-9.24	-606.54	0.0092				
GSLYST00004656001	-4.91	-30.10	0.5276	-10.44	1387.24	0.0092				
GSLYST00004688001	3.42	10.71	0.0809	4.87	29.30	0.0007	O81025	Immune-associated nucleotide-binding protein 10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.76E-20
GSLYST00004797001	0.44	1.36	0.9551	1.18	2.27	0.0400	Q5ZJL9	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	<i>Gallus gallus</i>	1.96E-93
GSLYST00004951001	5.17	35.97	0.0011	4.83	28.37	0.0014				

ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00005145001	-8.09	-271.89	0.0519	-9.69	-825.30	0.0062	P05450	ATP synthase subunits region ORF 7	<i>Rhodobacter blasticus</i>	7.33E-04
GSLYST00005182001	-1.31	-2.48	0.4769	-2.02	-4.07	0.0171	Q8ROM8	Monocarboxylate transporter 5	<i>Mus musculus</i>	4.39E-30
GSLYST00005274001	-3.57	-11.85	0.6196	-8.11	-276.95	0.0078				
GSLYST00005285001	-3.06	-8.33	0.7255	-5.90	-59.61	0.0453	A0A6P5AEF9	UNREVIEWED proline-rich protein 2-like	<i>Branchiostoma belcheri</i>	3.00E-42
GSLYST00005376001	-1.90	-3.72	0.9551	-9.77	-874.96	0.0103	Q9C8V0	Immune-associated nucleotide-binding protein 6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.47E-24
GSLYST00005571001	2.74	6.70	0.1389	4.81	28.01	0.0000	A0A1S3JMQ2	UNREVIEWED Protein shisa-5-like (Lingula unguis)	<i>Lingula unguis</i>	2.70E-10
GSLYST00005606001	-3.55	-11.75	0.0002	-2.53	-5.79	0.0113	Q9IAT6	Delta-like protein C	<i>Danio rerio</i>	2.83E-24
GSLYST00005797001	-2.70	-6.49	0.1608	-3.04	-8.25	0.0357	G8CYM6	UNREVIEWED G-type lysozyme	<i>Physella acuta</i>	2.50E-86
GSLYST00005882001	-3.86	-14.53	0.3601	-7.06	-133.28	0.0078	A0A2C9L4N4	UNREVIEWED C-type lectin domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	9.80E-18
GSLYST00005889001	1.14	2.20	0.2207	1.45	2.74	0.0154	P16573	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	<i>Rattus norvegicus</i>	1.00E-02
GSLYST00005896001	0.71	1.63	0.9551	2.11	4.32	0.0400	Q8AWW5	Cysteine-rich motor neuron 1 protein	<i>Gallus gallus</i>	6.17E-17
GSLYST00006081001	1.64	3.12	0.3046	2.40	5.26	0.0065				
GSLYST00006344001	-8.96	-498.73	0.0247	-7.26	-153.53	0.0447	Q6YHK3	CD109 antigen	<i>Homo sapiens</i>	0.00E+00
GSLYST00006566001	-1.76	-3.39	0.6552	-3.15	-8.85	0.0237	A0A3S0ZP4	UNREVIEWED Methyltransf_21 domain-containing protein	<i>Elysia chlorotica</i>	2.4e-82
GSLYST00006661001	-8.89	-474.11	0.0853	-8.89	-474.11	0.0236				
GSLYST00006723001	-9.36	-659.01	0.0146	-7.67	-204.19	0.0237				
GSLYST00006852001	1.15	2.21	0.3735	1.49	2.81	0.0445	O15050	TPR and ankyrin repeat-containing protein 1	<i>Homo sapiens</i>	0.00E+00
GSLYST00006914001	1.75	3.37	0.6305	3.02	8.11	0.0293	F4HT21	Immune-associated nucleotide-binding protein 9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.73E-34
GSLYST00006999001	-6.21	-74.12	0.0519	-5.92	-60.52	0.0283	A0A345K580	UNREVIEWED Physalysin	<i>Physella acuta</i>	3.10E-50
GSLYST00007116001	2.33	5.03	0.5987	4.00	16.02	0.0134	ORF70058	UNREVIEWED TNF_2 domain-containing protein	<i>Arion vulgaris</i>	7.00E-14
GSLYST00007117001	1.49	2.80	0.5153	2.29	4.88	0.0242				
GSLYST00007271001	-2.28	-4.87	0.0232	-0.50	-1.41	1.0000	P31320	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	<i>Blastocladiella emersonii</i>	6.94E-07
GSLYST00007297001	1.28	2.43	0.6068	2.10	4.29	0.0237	Q8WTQ4	Uncharacterized protein C16orf78	<i>Homo sapiens</i>	1.00E-03
GSLYST00007399001	1.12	2.18	0.7826	2.29	4.90	0.0279	Q9T0F4	Immune-associated nucleotide-binding protein 13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.37E-19
GSLYST00007412001	2.35	5.11	0.1034	2.87	7.29	0.0092				
GSLYST00007463001	-5.90	-59.78	0.1387	-5.90	-59.78	0.0208	P14756	Elastase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)	2.10E-63
GSLYST00007464001	-5.52	-45.86	0.1513	-5.52	-45.86	0.0205	P24153	Hemagglutinin/proteinase	<i>Vibrio cholerae</i> serotype O1	1.86E-61
GSLYST00007522001	5.32	40.08	0.1989	6.48	89.38	0.0104	K1R6Z9	UNREVIEWED Nck-associated protein 5	<i>Crassostrea gigas</i>	7.20E-16

ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00007538001	1.19	2.29	0.5706	2.02	4.05	0.0167	Q24151	Signal transducer and transcription activator	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.26E-07
GSLYST00007556001	-3.06	-8.36	0.6204	-6.18	-72.26	0.0122	PODN14	U-actitoxin-Avd3m	<i>Anemonia viridis</i>	6.00E-20
GSLYST00007966001	-2.67	-6.37	0.2053	-4.11	-17.25	0.0016	Q9H8V3	Protein ECT2	<i>Homo sapiens</i>	0.00E+00
GSLYST00008079001	1.05	2.07	0.7726	2.25	4.76	0.0065				
GSLYST00008206001	-2.96	-7.77	0.6976	-6.75	-107.84	0.0158	P51942	Cartilage matrix protein	<i>Mus musculus</i>	2.74E-20
GSLYST00008298001 <sup>a</sup>	1.59	3.02	0.3432	2.39	5.24	0.0113	O61309	Nitric oxide synthase	<i>Lymnaea stagnalis</i>	0.00E+00
GSLYST00008409001	-4.61	-24.36	0.0567	-6.10	-68.59	0.0010	B3EWY9	Mucin-like protein (Fragment)	<i>Acropora millepora</i>	7.88E-108
GSLYST00008841001	2.49	5.61	0.5995	4.59	24.09	0.0050	A0A433SY23	UNREVIEWED AIG1-type G domain-containing protein	<i>Elysia chlorotica</i>	2.70E-35
GSLYST00008843001	7.20	146.75	0.0004	8.58	381.46	0.0000				
GSLYST00008863001	0.68	1.60	0.9701	-5.08	-33.85	0.0000				
GSLYST00008893001	2.66	6.34	0.0146	3.20	9.16	0.0005				
GSLYST00008922001	6.45	87.15	0.0130	5.93	61.15	0.0116	Q9P2D7	Dynein heavy chain 1, axonemal	<i>Homo sapiens</i>	1.63E-100
GSLYST00008923001	8.28	311.44	0.0563	8.20	294.18	0.0283	Q63164	Dynein heavy chain 1, axonemal	<i>Rattus norvegicus</i>	4.40E-111
GSLYST00008924001 <sup>a</sup>	8.09	272.50	0.0146	7.57	189.90	0.0135	Q9P2D7	Dynein heavy chain 1, axonemal	<i>Homo sapiens</i>	1.98E-87
GSLYST00008925001	7.67	203.66	0.0617	7.90	239.13	0.0239	E9Q8T7	Dynein heavy chain 1, axonemal	<i>Mus musculus</i>	0.00E+00
GSLYST00009245001	-5.93	-61.08	0.0888	-6.66	-101.04	0.0139				
GSLYST00009248001	-7.78	-220.42	0.0130	-8.70	-416.70	0.0017	Q4A6S2	Protein translocase subunit SecA	<i>Mycoplasma synoviae</i>	2.00E-01
GSLYST00009302001 <sup>a</sup>	4.97	31.31	0.0146	2.19	4.55	0.6175	A0A2C9LAK1	UNREVIEWED Ig-like domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	5.80E-16
GSLYST00009520001	1.22	2.32	0.7470	2.48	5.59	0.0199	Q5M7N8	Cysteine--tRNA ligase, cytoplasmic	<i>Xenopus tropicalis</i>	0.00E+00
GSLYST00009762001	5.35	40.70	0.0867	6.38	83.48	0.0010	Q9NUV9	GTPase IMAP family member 4	<i>Homo sapiens</i>	1.95E-19
GSLYST00009837001	-8.34	-323.42	0.0255	-7.28	-155.84	0.0237	P09167	Aerolysin	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3.73E-13
GSLYST00009927001	0.60	1.52	0.8637	1.26	2.39	0.0430	P48023	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	<i>Homo sapiens</i>	2.72E-07
GSLYST00010337001	-5.52	-45.96	0.0072	-2.88	-7.37	0.2628	A0A151NWQ3	UNREVIEWED ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase	<i>Alligator mississippiensis</i>	9.70E-03
GSLYST00010941001 <sup>a</sup>	-4.49	-22.51	0.6864	-10.38	-	1329.25	0.0210			
GSLYST00010942001	-4.00	-16.04	0.7826	-10.64	-	1590.56	0.0186			
GSLYST00011081001	-3.82	-14.08	0.4751	-8.03	-260.88	0.0041				
GSLYST00011181001	-6.78	-109.75	0.1471	-9.10	-547.05	0.0121				
GSLYST00011365001	-0.79	-1.73	0.8217	-1.98	-3.93	0.0028	Q66H85	Ankyrin repeat and zinc finger domain-containing protein 1	<i>Rattus norvegicus</i>	8.24E-70

## ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00011368001	-2.29	-4.89	0.3046	-3.04	-8.20	0.0237				
GSLYST00011453001 <sup>a</sup>	-4.13	-17.56	0.0642	-3.85	-14.45	0.0410	Q10751	Angiotensin-converting enzyme (Fragment)	<i>Gallus gallus</i>	0.00E+00
GSLYST00011688001	-6.28	-77.78	0.0232	-3.43	-10.78	0.0517				
GSLYST00011689001	6.50	90.20	0.0000	6.32	80.08	0.0000	Q99KW9	T-cell immunomodulatory protein	<i>Mus musculus</i>	8.10E-02
GSLYST00011693001	-7.70	-207.81	0.0929	-7.70	-207.81	0.0211				
GSLYST00011718001	-4.41	-21.31	0.4385	-7.52	-183.88	0.0172	C9S7L1	UNREVIEWED Phosphorylcholine phosphatase	<i>Phosphorylcholine phosphatase</i>	8.50E-03
GSLYST00011865001	4.94	30.63	0.3502	6.71	104.83	0.0081				
GSLYST00011870001	6.53	92.14	0.0236	4.66	25.25	0.2876				
GSLYST00011875001	1.03	2.04	0.6006	1.78	3.44	0.0181	Q60997	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	<i>Mus musculus</i>	2.28E-11
GSLYST00011957001	3.22	9.29	0.0531	3.33	10.07	0.0163	Q9UTC7	Uncharacterized WD repeat-containing protein C227.12	<i>Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843)</i>	2.00E-01
GSLYST00011987001 <sup>a</sup>	-3.27	-9.66	0.5787	-6.62	-98.25	0.0086	A0A1R1Y395	UNREVIEWED Peroxisomal biogenesis factor 3	<i>Smittium culicis</i>	3.60E-03
GSLYST00011994001	4.52	22.98	0.4769	5.74	53.57	0.0400	O94761	ATP-dependent DNA helicase Q4	<i>Homo sapiens</i>	1.48E-103
GSLYST00012049001	-5.79	-55.18	0.0293	-4.23	-18.80	0.0770				
GSLYST00012523001	-6.99	-126.70	0.0515	-7.01	-128.83	0.0214	P50452	Serpin B8	<i>Homo sapiens</i>	9.01E-54
GSLYST00012530001	-6.36	-82.16	0.2713	-8.35	-325.44	0.0306	Q7YTY6	Serine protease inhibitor 42Dd	<i>Drosophila melanogaster</i>	5.59E-55
GSLYST00012707001	-4.10	-17.09	0.3390	-8.66	-403.57	0.0007				
GSLYST00012708001	-3.90	-14.89	0.6132	-7.40	-169.41	0.0286				
GSLYST00012724001	6.83	113.47	0.2304	9.52	732.58	0.0140	G3X987	GTPase IMAP family member 9	<i>Mus musculus</i>	5.79E-19
GSLYST00012762001	-2.96	-7.79	0.4580	-4.91	-29.99	0.0140	A0A4S2KN76	UNREVIEWED LsmAD domain-containing protein	<i>Temnothorax longispinosus</i>	1.20E-03
GSLYST00012763001	-3.99	-15.89	0.6233	-7.64	-199.88	0.0286	A0A2C9LNU4	UNREVIEWED Cystatin	<i>Biomphalaria glabrata</i>	3.80E-22
GSLYST00012882001	-1.74	-3.34	0.8567	-4.17	-18.02	0.0174				
GSLYST00012883001	1.29	2.44	0.9324	3.20	9.20	0.0198	A9ULZ2	Baculoviral IAP repeat-containing protein 7-B	<i>Xenopus laevis</i>	5.27E-19
GSLYST00013214001	-4.05	-16.56	0.4499	-6.28	-77.88	0.0330				
GSLYST00013275001	-4.06	-16.68	0.5495	-8.84	-456.92	0.0084				
GSLYST00013418001	3.55	11.71	0.0261	4.57	23.67	0.0004	Q61315	Adenomatous polyposis coli protein	<i>Mus musculus</i>	6.00E-06
GSLYST00013474001	4.24	18.92	0.0853	5.24	37.92	0.0078	P54120	Immune-associated nucleotide-binding protein 8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.65E-25
GSLYST00013616001	-7.74	-213.17	0.0025	-8.12	-277.82	0.0007	P11418	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Prionace glauca</i>	7.67E-30
GSLYST00013781001	2.04	4.12	0.4893	3.13	8.73	0.0316	P23381	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	<i>Homo sapiens</i>	0.00E+00
GSLYST00013911001	1.25	2.38	0.5145	2.15	4.43	0.0063	Q9ER63	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 23	<i>Mus musculus</i>	1.20E-01
GSLYST00013998001	-6.59	-96.25	0.0142	-7.67	-203.82	0.0012	Q0V9M0	Cartilage acidic protein 1	<i>Xenopus tropicalis</i>	8.99E-124

ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00014017001	-7.89	-237.28	0.0216	-4.90	-29.78	0.0543	Q8N0N3	β-1,3-glucan-binding protein	<i>Penaeus monodon</i>	2.98E-75
GSLYST00014022001	-3.58	-11.98	0.6184	-8.18	-289.98	0.0077	G5EBF1	Protein sax-3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	6.34E-06
GSLYST00014042001	-5.69	-51.51	0.0599	-5.70	-52.08	0.0179	P97435	Enteropeptidase	<i>Mus musculus</i>	8.48E-35
GSLYST00014054001	-5.46	-44.06	0.1013	-5.46	-44.06	0.0116	P97288	5-hydroxytryptamine receptor 4	<i>Mus musculus</i>	2.28E-25
GSLYST00014363001	0.36	1.28	0.9551	1.24	2.37	0.0212	A2RT91	Ankyrin and armadillo repeat-containing protein	<i>Mus musculus</i>	1.96E-94
GSLYST00014549001	2.35	5.11	0.1009	2.94	7.66	0.0069	Q3ZBG9	Phospholipid scramblase 2	<i>Bos taurus</i>	5.91E-61
GSLYST00014627001	-7.02	-130.14	0.0092	-8.35	-326.64	0.0006	O61363	Hemocyanin G-type, units Oda to Odg	<i>Enteractopus dofleini</i>	0.00E+00
GSLYST00014735001	7.85	230.03	0.0216	7.55	187.31	0.0134				
GSLYST00014975001	1.60	3.03	0.0386	0.73	1.65	0.7323	AOA7J7JFH1	UNREVIEWED TMEM33	<i>Bugula neritina</i>	1.80E-21
GSLYST00015091001	-9.32	-639.37	0.0292	-7.19	-145.64	0.0519	Q7M4I1	UNREVIEWED Basic proteinase inhibitor	<i>Lymnaea stagnalis</i>	1.20E-44
GSLYST00015310001	-8.45	-350.24	0.0216	-5.32	-39.91	0.0519	AOA210PVS8	UNREVIEWED Testican-3	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	6.20E-12
GSLYST00015490001	0.89	1.85	0.9324	2.35	5.10	0.0316	Q5ZIJ9	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	<i>Gallus gallus</i>	2.55E-86
GSLYST00015535001	-5.04	-32.99	0.1389	-5.69	-51.52	0.0357				
GSLYST00015746001	1.14	2.20	0.6129	1.91	3.76	0.0237	Q8NFD2	Ankyrin repeat and protein kinase domain-containing protein 1	<i>Homo sapiens</i>	4.75E-20
GSLYST00015861001	-3.59	-12.06	0.4947	-5.99	-63.42	0.0237	Q6IWZ0	L-amino-acid oxidase	<i>Aplysia californica</i>	5.89E-115
GSLYST00015937001	7.31	158.46	0.0563	7.80	223.61	0.0140	Q1KM18	UNREVIEWED Sialic acid binding lectin	<i>Helix pomatia</i>	1.30E-06
GSLYST00015943001	-3.56	-11.80	0.0253	-1.08	-2.12	0.9220	Q8CG64	Fukutin-related protein	<i>Mus musculus</i>	4.61E-06
GSLYST00015964001	2.52	5.74	0.0024	2.16	4.48	0.0086	Q7Q6A7	Kynurenine 3-monooxygenase	<i>Anopheles gambiae</i>	3.38E-103
GSLYST00015978001	-0.03	-1.02	1.0000	-8.53	-369.36	0.0000	Q9C8U7	Immune-associated nucleotide-binding protein 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4.22E-21
GSLYST00015979001	-0.34	-1.27	1.0000	-6.74	-106.87	0.0003	P11047	Laminin subunit gamma-1	<i>Homo sapiens</i>	3.71E-04
GSLYST00015990001	1.82	3.53	0.3969	3.54	11.67	0.0007	O81025	Immune-associated nucleotide-binding protein 10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.30E-27
GSLYST00015991001	1.40	2.63	0.9083	3.86	14.47	0.0016	Q9C8V2	Immune-associated nucleotide-binding protein 7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.01E-15
GSLYST00015992001	5.21	37.03	0.0002	5.61	48.68	0.0000	Q9T0F3	Immune-associated nucleotide-binding protein 12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2.65E-16
GSLYST00015994001	4.69	25.80	0.0896	5.81	56.19	0.0059	Q9C8V2	Immune-associated nucleotide-binding protein 7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.78E-26
GSLYST00015995001	4.11	17.25	0.1071	6.00	64.21	0.0016	O81025	Immune-associated nucleotide-binding protein 10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.67E-29
GSLYST00015996001	4.51	22.74	0.0245	4.87	29.18	0.0058	Q9C8U7	Immune-associated nucleotide-binding protein 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.13E-14
GSLYST00015998001	2.91	7.52	0.1280	3.49	11.26	0.0149	Q9T0F3	Immune-associated nucleotide-binding protein 12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7.73E-17
GSLYST00015999001	2.80	6.99	0.0929	4.58	23.87	0.0003	Q9C8V2	Immune-associated nucleotide-binding protein 7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.13E-30
GSLYST00016255001	0.73	1.66	0.7388	1.53	2.88	0.0092	P48023	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	<i>Homo sapiens</i>	1.03E-05
GSLYST00016256001	1.63	3.09	0.1327	2.53	5.76	0.0005	Q861W5	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	<i>Felis catus</i>	8.71E-04
GSLYST00016660001	0.00	1.00	1.0000	8.34	324.13	0.0112	AOA2C9LF30	UNREVIEWED RING-type domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	3.60E-15
GSLYST00016863001	-5.84	-57.19	0.2029	-7.14	-141.21	0.0347	A5K6M8	UNREVIEWED Transporter, putative	<i>Plasmodium vivax</i>	2.50E-12

ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00016967001	-5.28	-38.98	0.0916	-6.85	-115.40	0.0065	A0A2T7NBPO	UNREVIEWED C1q domain-containing protein	<i>Pomacea canaliculata</i>	1.20E-20
GSLYST00016971001	-3.09	-8.51	0.6552	-6.24	75.76	0.0180	A0A2T7NBPO	UNREVIEWED C1q domain-containing protein	<i>Pomacea canaliculata</i>	5.00E-31
GSLYST00017026001	-4.65	-25.13	0.3221	-10.13	1123.44	0.0010	A0A2R5GHQ3	UNREVIEWED Calmodulin	<i>Hondaia fermentalgiana</i>	7.40E-03
GSLYST00017027001	-5.57	-47.38	0.1824	-6.00	-64.18	0.0445				
GSLYST00017075001	1.10	2.15	0.3000	1.76	3.38	0.0031	Q74FW6	L-threonine ammonia-lyase	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	3.07E-65
GSLYST00017089001	-9.01	-514.63	0.0070	-10.49	1434.11	0.0006	P81139	Pancreatic lipase-related protein 2	<i>Cavia porcellus</i>	8.02E-63
GSLYST00017300001	-4.24	18.96	0.0590	-4.75	-26.96	0.0092				
GSLYST00017385001	2.09	4.27	0.0236	2.37	5.17	0.0024	P49632	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	<i>Caenorhabditis elegans</i>	8.73E-16
GSLYST00017386001 <sup>a</sup>	3.16	8.92	0.0019	4.23	18.78	0.0000	A0A2C9LJ13	UNREVIEWED Ubiquitin-like domain-containing protein	<i>Biomphalaria glabrata</i>	8.80E-23
GSLYST00017417001	-6.86	-116.08	0.0100	-5.22	-37.35	0.0032	P50226	Sulfotransferase 1A2	<i>Homo sapiens</i>	2.48E-21
GSLYST00017534001	-7.31	-159.11	0.0120	-7.98	-251.65	0.0018				
GSLYST00017536001	-8.42	342.69	0.0070	-8.98	-505.67	0.0012	A0A3N0XKN4	UNREVIEWED Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1	<i>Anabarrilius grahmi</i>	2.70E-28
GSLYST00017537001	-7.34	-162.58	0.0626	-8.20	294.54	0.0104	C3ZMU2	UNREVIEWED Delta-like protein	<i>Branchiostoma floridae</i>	8.40E-30
GSLYST00017538001	-6.14	-70.50	0.3243	-8.12	-279.00	0.0392	C3ZMU3	UNREVIEWED Delta-like protein	<i>Branchiostoma floridae</i>	8.40E-30
GSLYST00017544001	-8.09	-272.88	0.0000	-2.97	-7.83	0.0927	Q9GU69	Epidermal growth factor	<i>Lymnaea stagnalis</i>	8.90E-45
GSLYST00017567001	1.10	2.14	0.9551	3.45	10.92	0.0237	A0A1B0CSF6	UNREVIEWED RING-type E3 ubiquitin transferase	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	1.10E-11
GSLYST00017568001	2.44	5.41	0.2327	3.86	14.55	0.0005	Q5ZIJ9	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	<i>Gallus gallus</i>	8.18E-72
GSLYST00017576001	1.61	3.04	0.2304	2.65	6.29	0.0012	Q5ZIJ9	E3 ubiquitin-protein ligase MIB2	<i>Gallus gallus</i>	6.47E-80
GSLYST00017860001 <sup>a</sup>	7.17	143.86	0.0132	7.08	135.70	0.0065	A0A0A1UF70	UNREVIEWED Calponin-homology (CH) domain-containing protein	<i>Entamoeba invadens</i> <i>IP1</i>	7.90E-10
GSLYST00018032001	-3.65	-12.55	0.6068	-7.22	-148.99	0.0203				
GSLYST00018424001	1.60	3.03	0.9551	3.78	13.76	0.0353				
GSLYST00018653001	-4.46	-21.93	0.4067	-8.16	-286.69	0.0092	A0A1J1HV48	UNREVIEWED CLUMA_CG005513, isoform A	<i>Clunio marinus</i>	3.4e-12
GSLYST00018674001	-7.21	-147.70	0.0216	-7.96	-249.40	0.0036	Q2TBI0	Lipopolysaccharide-binding protein	<i>Bos taurus</i>	1.42E-42
GSLYST00018677001	-4.18	-18.10	0.3046	-7.03	-130.32	0.0059	P17213	Bactericidal permeability-increasing protein	<i>Homo sapiens</i>	3.94E-46
GSLYST00018678001	-2.83	-7.09	0.1685	-3.52	-11.48	0.0163	P17213	Bactericidal permeability-increasing protein	<i>Homo sapiens</i>	2.43E-35
GSLYST00018834001	-7.70	-208.22	0.0024	-8.40	-337.58	0.0005	P25304	Agrin	<i>Rattus norvegicus</i>	2.52E-31
GSLYST00018968001	-4.79	-27.61	0.1229	-8.01	-257.92	0.0007	P82198	Transforming growth factor-β-induced protein ig-h3	<i>Mus musculus</i>	1.80E-37



ANNEXE II : Supplementary data article n°2

GSLYST00019248001	-6.51	-91.32	0.0617	-6.23	-75.06	0.0237	AOA0B6YVL8	UNREVIEWED VWFC domain-containing protein	<i>Arion vulgaris</i>	5.10E-41
GSLYST00019480001	1.41	2.65	0.2257	1.75	3.37	0.0210	Q3YJV1	UNREVIEWED Matrilin	<i>Biomphalaria glabrata</i>	1.20E-17
GSLYST00019674001	1.54	2.91	0.5168	2.72	6.59	0.0079	Q9C8U8	Immune-associated nucleotide-binding protein 5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7.08E-24
GSLYST00019693001	0.73	1.66	0.7826	1.42	2.67	0.0373	O81025	Immune-associated nucleotide-binding protein 10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.54E-18
GSLYST00019851001	-6.64	-99.60	0.1664	-6.64	-99.60	0.0348	P08661	Mannose-binding protein C	<i>Rattus norvegicus</i>	9.41E-05
GSLYST00019852001	2.55	5.87	0.3661	3.59	12.02	0.0279	Q99759	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	<i>Homo sapiens</i>	7.05E-48
GSLYST00019864001	2.45	5.45	0.1164	2.82	7.07	0.0208	P39153	Threonylcarbamoyl-AMP synthase	<i>Bacillus subtilis</i>	5.20E-15
GSLYST00019865001	2.45	5.46	0.0631	3.26	9.56	0.0016	P39153	Threonylcarbamoyl-AMP synthase	<i>Bacillus subtilis</i>	1.34E-20
GSLYST00019904001	-6.39	-83.99	0.0563	-9.17	-576.62	0.0014				
GSLYST00019952001	-8.97	-502.89	0.0269	-8.53	-369.43	0.0165	Q27086	Intracellular coagulation inhibitor 2	<i>Tachypleus tridentatus</i>	1.05E-52
GSLYST00019953001	-8.18	-290.37	0.0292	-9.15	-566.23	0.0062	Q5JJ64	Uncharacterized serpin-like protein TK1782	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	1.65E-51
GSLYST00020079001	5.44	43.50	0.0000	3.34	10.09	0.0086	Q26636	Cathepsin L	<i>Sarcophaga peregrina</i>	1.44E-80
GSLYST00020400001	1.67	3.18	0.3728	2.51	5.69	0.0113	AOA0B7A744	UNREVIEWED DUF4430 domain-containing protein	<i>Arion vulgaris</i>	4.50E-18
GSLYST00020414001	6.59	96.64	0.0486	4.92	30.37	0.2575				
GSLYST00020467001	-3.29	-9.79	0.0024	-1.43	-2.69	0.5328	B3EWY9	Mucin-like protein (Fragment)	<i>Acropora millepora</i>	8.25E-74
GSLYST00020589001	-5.10	-34.22	0.0617	-4.76	-27.02	0.0459	Q6YHK3	CD109 antigen	<i>Homo sapiens</i>	0.00E+00
GSLYST00020603001	-1.15	-2.22	0.9551	-5.31	-39.76	0.0136				
GSLYST00020687001	-0.93	-1.90	0.5291	-1.41	-2.66	0.0297	Q7QH73	Chorion peroxidase	<i>Anopheles gambiae</i>	2.24E-96
GSLYST00020690001	1.43	-2.70	0.3502	1.91	3.76	0.0238				
GSLYST00020858001	-7.89	-236.45	0.0070	-8.28	-311.89	0.0017	Q6IWZ0	L-amino-acid oxidase	<i>Aplysia californica</i>	1.07E-115
GSLYST00021126001	-7.53	-184.56	0.0024	-7.53	-184.56	0.0001				
GSLYST00021259001	-6.49	-89.92	0.0809	-6.60	-96.87	0.0283	Q8UWA5	Carbonic anhydrase 2	<i>Tribolodon hakonensis</i>	4.35E-35
GSLYST00021514001	-2.87	-7.32	0.4335	-4.18	-18.09	0.0285	AOA0B6Y459	UNREVIEWED DUF4704 domain-containing protein	<i>Arion vulgaris</i>	1.10E-30
GSLYST00021543001	2.08	4.24	0.5005	3.16	8.92	0.0196	P10716	C-type lectin domain family 4 member F	<i>Rattus norvegicus</i>	2.46E-09
GSLYST00021567001	1.90	3.74	0.0599	2.17	4.50	0.0062	Q2EMV9	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP14	<i>Mus musculus</i>	1.70E-72
GSLYST00021573001	5.52	46.03	0.0000	5.78	54.91	0.0000	AOA2T7NT31	UNREVIEWED Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	<i>Pomacea canaliculata</i>	1.50E-11
GSLYST00021904001	5.06	33.25	0.2304	5.74	53.50	0.0279	AOA0B6ZQ51	UNREVIEWED Poly [ADP-ribose] polymerase	<i>Arion vulgaris</i>	4.60E-37



**Table S-6.** Conserved domain of unreviewed and unknown proteins coded by DEGs

Gene ID	PROSITE ID	Conserved domain
GSLYST00002013001	PS50323	Arginine-rich region profile
GSLYST00002346001	PS50311	Cysteine-rich region profile
GSLYST00005274001	PS50314	Phenylalanine-rich region profile
GSLYST00005285001	PS50099	Proline-rich region profile
	PS50312	Aspartic acid-rich region profile
GSLYST00005882001	PS50041	C-type lectin domain signature and profile
GSLYST00007116001	PS50049	TNF family signature and profile
GSLYST00008841001	PS51720	AIG1-type guanine nucleotide-binding (G) domain profile
GSLYST00008843001	PS50324	Serine-rich region profile
GSLYST00010337001	PS50099	Proline-rich region profile
GSLYST00011081001	PS50222	EF-hand calcium-binding domain signature and profile
GSLYST00012707001	PS50222	EF-hand calcium-binding domain signature and profile (x2)
GSLYST00014975001	PS50311	Cysteine-rich region profile
GSLYST00015091001	PS50279	Pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) family signature and profile
GSLYST00016660001	PS50089	Zinc finger RING-type signature and profile
GSLYST00017026001	PS50222	EF-hand calcium-binding domain signature and profile (x2)
GSLYST00017534001	PS50026	EGF-like domain signatures and profile (x2)
GSLYST00017536001	PS50026	EGF-like domain signatures and profile (x4)
	PS50311	Cysteine-rich region profile
GSLYST00017537001	PS50026	EGF-like domain signatures and profile (x4)
	PS50311	Cysteine-rich region profile
GSLYST00017538001	PS50026	EGF-like domain signatures and profile (x4)
	PS50311	Cysteine-rich region profile
GSLYST00021904001	PS51154	Macro domain profile
GSLYST00003453001	PS50088	Ankyrin repeat and ankyrin repeat region profiles (x4)
GSLYST00009302001	PS50835	Ig-like domain profile
GSLYST00010721001	PS50311	Cysteine-rich region profile
GSLYST00014705001	PS50940	Chitin-binding type-2 domain profile
GSLYST00016343001	PS50097	BTB domain profile
GSLYST00017860001	PS50079	Bipartite nuclear localization signal profile
GSLYST00018033001	PS50270	Nerve growth factor family signature and profile
GSLYST00021755001	PS50835	Ig-like domain profile

**Table S-7.** DEGs discussed in this article associated with their main function based on their GO-term or literature

Function	Other function of interest	Gene ID	Annotation	Uniprot ID	GO Term or Litterature	Reproductive apparatus				Head			
						Ctrl vs 0.1 µg/L		Ctrl vs 10 µg/L		Ctrl vs 0.1 µg/L		Ctrl vs 10 µg/L	
						Fold-change	FDR	Fold-change	FDR	Fold-change	FDR	Fold-change	FDR
Control of development	Neurogenesis	GSLYST00013418001	Adenomatous polyposis coli protein	Q61315	GO:0030335 positive regulation of cell migration GO:0001822 kidney development GO:0008285 negative regulation of cell population proliferation GO:0009798 axis specification GO:0007399 nervous system development	-2.93	0.8595	-19.83	0.5283	11.71	0.0261	23.67	0.0004
	Neurogenesis	GSLYST00018834001	Agtrin	P25304	GO:0007528 neuromuscular junction development GO:0009887 animal organ morphogenesis GO:0009888 tissue development GO:1901216 positive regulation of neuron death	2.09	0.8446	1.11	1.0000	-208.22	0.0024	-337.58	0.0005
		GSLYST00003318001	Dorsal-ventral patterning tolloid-like protein 1	O57460	GO:0009953 dorsal/ventral pattern formation GO:0001885 endothelial cell development	-3064.41	0.0284	-2.18	0.9178	-1127.37	0.0379	-19.14	0.5902
		GSLYST00014705001	UNREVIEWED Chitin-binding type-2 domain-containing protein	A0A4335MH0	Shell formation (Jin et al. 2019)	99.57	0.0174	8.54	0.6867	1.99	0.2032	1.40	1
		GSLYST00017386001	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	P49632	GO:0009949 polarity specification of anterior/posterior axis	17.93	0.0002	17.10	0.0003	8.92	0.0019	18.78	0.0000
Immune response		GSLYST00011875001	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	Q60997	GO:0001833 inner cell mass cell proliferation GO:0006952 defense response	-1.02	1.0000	-1.58	0.7902	2.04	0.6006	3.44	0.0181
		GSLYST00005889001	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	P16573	GO:0001568 blood vessel development GO:0001915 negative regulation of T cell mediated cytotoxicity GO:0001818 negative regulation of cytokine production GO:0032692 negative regulation of interleukin-1 production	1.35	0.9414	1.66	0.7902	2.20	0.2207	2.74	0.0154
		GSLYST00019851001	Mannose-binding protein C	P08661	GO:0002376 immune system process	1.16	0.9846	-1.02	1.0000	-99.60	0.1664	-99.60	0.0348
		GSLYST00018677001	Bactericidal permeability-increasing protein	P17213	GO:0045087 innate immune response	-2.20	0.7185	-3.93	0.2472	-18.10	0.3046	-130.32	0.0059
		GSLYST00021567001	Protein mono-ADP-ribosyltransferase PARP14	Q2EMV9	GO:0002376 immune system process	1.34	0.9679	2.66	0.6762	3.74	0.0599	4.50	0.0062

	GSLYST00018674001	Lipopolysaccharide-binding protein	Q2TBI0	GO:0045087 innate immune response	1.61	0.9281	-1.14	0.9957	-147.70	0.0216	-249.40	0.0036	
	GSLYST00004797001	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	Q5ZJL9	GO:0045088 regulation of innate immune response	2.84	0.3618	3.44	0.1900	1.36	0.9551	2.27	0.0400	
	GSLYST00014017001	Beta-1,3-glucan-binding protein	Q8N0N3	GO:0045087 innate immune response	1.64	0.8446	1.00	1.0000	-237.28	0.0216	-29.78	0.0543	
	GSLYST00001523001	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	Q8TDB6	GO:0045087 innate immune response	23.09	0.2099	17.22	0.3300	19.28	0.0002	22.45	0.0000	
	GSLYST00009927001	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	P48023	GO:0043065 positive regulation of apoptotic process GO:0006955 immune response	1.02	1.0000	1.17	0.9557	1.52	0.8637	2.39	0.0430	
	GSLYST00002087001	Chitotriosidase-1	Q13231	GO:0006955 immune response	-1.41	0.8446	-2.20	0.3414	-5.19	0.4641	-33.32	0.0012	
	GSLYST00016256001	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	Q861W5	GO:0006955 immune response GO:0006915 apoptotic process GO:1901216 positive regulation of neuron death	1.01	1.0000	1.56	0.8650	3.09	0.1327	5.76	0.0005	
Reproduction	GSLYST00011453001	Angiotensin-converting enzyme	Q10751	GO:0008283 cell population proliferation	2.93	0.8595	45.23	0.0474	143.86	0.0132	135.70	0.007	
	GSLYST00006999001	UNREVIEWED Physalysin	A0A345K580	Antimicrobial protein (Schultz et al., 2018)	2.45	0.8446	-1.42	0.9467	-74.12	0.0519	-60.52	0.028	
	GSLYST00007116001	UNREVIEWED TNF_2 domain-containing protein	ORF70058	GO:0006955 immune response	6610.32	0.7432	61.10	1.0000	5.03	0.5987	16.02	0.013	
Metabolic process	GSLYST00015038001	Prostaglandin reductase 1	Q3SZJ4	GO:0006693 prostaglandin metabolic process	4.58	0.0072	2.73	0.2967	2.34	0.7826	1.69	0.9597	
	GSLYST00008298001	Nitric oxide synthase	O61309	GO:0006809 nitric oxide biosynthetic process	3.93	0.0000	7.94	0.0000	3.02	0.0809	5.24	0.0124	
Oxidative stress	GSLYST00013616001	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	P11418	GO:0004784 superoxide dismutase activity GO:0098869 cellular oxidant detoxification	2.29	0.7729	-1.08	1.0000	-213.17	0.0025	-277.82	0.0007	
	GSLYST00003926001	Peroxidase	A4IGL7	GO:0098869 cellular oxidant detoxification GO:0004601 peroxidase activity	6.93	0.7521	6.66	0.7468	-3.46	0.4641	-6.02	0.0328	
	GSLYST00011565001	Dual oxidase 2	Q8HZK2	GO:0098869 cellular oxidant detoxification GO:0004601 peroxidase activity GO:0006979 response to oxidative stress	-1.60	0.8446	-7.18	0.0062	-1.65	0.7509	-2.07	0.1910	
	GSLYST00017668001	Glutathione hydrolase 1 proenzyme	P07314	GO:0034599 cellular response to oxidative stress	0.31	0.9871	6.72	0.0324	1.24	1.0000	1.30	1.0000	
Reproduction	Immune response	GSLYST00012530001	Serine protease inhibitor 42Dd	Q7YTY6	GO:0045751 negative regulation of Toll signaling pathway GO:1905035 negative regulation of antifungal innate immune response	8.48	0.4640	12.16	0.3414	-82.16	0.2713	-325.44	0.0306

				GO:0004867 serine-type endopeptidase inhibitor activity GO:0032504 multicellular organism reproduction								
Immune response Control of development	GSLYST00007 538001	Signal transducer and transcription activator	Q24151	GO:0002230 positive regulation of defense response to virus by host GO:0030720 oocyte localization involved in germarium-derived egg chamber formation GO:0019827 stem cell population maintenance GO:0007526 larval somatic muscle development	1.15	1.0000	1.49	0.8254	2.29	0.5706	4.05	0.0167
Oxidative stress	GSLYST00020 687001	Chorion peroxidase	Q7QH73	GO:0098869 cellular oxidant detoxification GO:0006979 response to oxidative stress GO:0004601 peroxidase activity GO:0048477 oogenesis	-90.37	0.2528	-90.37	0.2217	-1.90	0.5291	-2.66	0.0297
	GSLYST00008 925001	Dynein heavy chain 1, axonemal	E9Q8T7	GO:0030317 flagellated sperm motility GO:0000166 nucleotide binding	47.24	0.4594	62.41	0.4201	203.66	0.0617	239.13	0.0239
	GSLYST00008 923001		Q63164		54.72	0.3507	49.76	0.4016	311.44	0.0563	294.18	0.0283
	GSLYST00008 922001		Q9P2D7		50.85	0.1855	36.67	0.2967	87.15	0.0130	61.15	0.0116
	GSLYST00008 924001		Q9P2D7		1056.86	0.0211	1009.16	0.0262	272.50	0.0146	189.90	0.0135
	GSLYST00003 209001	Protein sneaky	Q9VU52	GO:0035042 fertilization, exchange of chromosomal proteins GO:0035045 sperm plasma membrane disassembly GO:0035041 sperm chromatin decondensation	79.00	0.0000	99.77	0.0000	33.27	0.0809	61.43	0.0124
	GSLYST00004 181001	Fibrous sheath-interacting protein 2	Q5CZC0	GO:0030317 flagellated sperm motility GO:0007288 sperm axoneme assembly	21.80	0.0074	1.15	0.9957	3.87	0.2904	1.12	1.0000
	GSLYST00012 348001	Adhesion G-protein coupled receptor G2	Q8IZP9	GO:0007283 spermatogenesis	6.59	0.0042	9.11	0.0002	-0.96	0.2904	-1.52	0.7186
	GSLYST00003 960001	Ovulation prohormone	P06308	Induction of ovulation (Ebberink et al., 1985)	-1.92	0.4746	-1.71	0.6329	-13.01	0.2034	-52.42	0.004
	GSLYST00013 871001	Cyclic nucleotide-binding domain-containing protein 2	Q96M20	GO:0007283 spermatogenesis GO:0000166 nucleotide binding	2.38	0.1690	2.90	0.0332	0.96	0.9597	1.51	0.8445
Neurogenesis	GSLYST00014 022001	Protein sax-3	G5EBF1	GO:0001764 neuron migration	1.61	0.8446	-1.60	0.7902	-11.98	0.6184	-289.98	0.0077
	GSLYST00007 966001	Protein ECT2	Q9H8V3	GO:0007399 nervous system development	-2.43	0.6513	-1.13	0.9778	-6.37	0.2053	-17.25	0.0016
	GSLYST00005 606001	Delta-like protein C	Q9IAT6	GO:0048666 neuron development	2.11	0.9546	1.13	1.0000	-11.75	0.0002	-5.79	0.0113

ANNEXE II : Supplementary data article n°2

	GSLYST00017 544001	Epidermal growth factor	Q9GU69	Neurotrophic action (Hermann et al., 2000)	2.12	0.7837	1.35	0.9301	-272.88	0	-7.83	0.0927
	GSLYST00002 721001	Ephrin type-B receptor 3 (Fragment)	O13147	GO:0007413 axonal fasciculation	-13.60	0.6677	-13.60	0.6192	-2.41	0.9551	-16.60	0.0237

## References

- Ebberink, R.H.M., van Loenhout, H., Geraerts, W.P.M., Joosse, J., 1985. Purification and amino acid sequence of the ovulation neurohormone of *Lymnaea stagnalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 7767–7771. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.22.7767>
- Hermann, P.M., van Kesteren, R.E., Wildering, W.C., Painter, S.D., Reno, J.M., Smith, J.S., Kumar, S.B., Geraerts, W.P., Ericsson, L.H., Smit, A.B., Bulloch, A.G., Nagle, G.T., 2000. Neurotrophic actions of a novel molluscan epidermal growth factor. *J Neurosci* 20, 6355–6364.
- Jin, C., Zhao, J., Pu, J., Liu, X., Li, J., 2019. Hichin, a chitin binding protein is essential for the self-assembly of organic frameworks and calcium carbonate during shell formation. *International Journal of Biological Macromolecules* 135, 745–751. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.205>
- Lebreton, M., Sire, S., Carayon, J.-L., Malgouyres, J.-M., Vignet, C., Géret, F., Bonnafé, E., 2021. Low concentrations of oxazepam induce feeding and molecular changes in *Radix balthica* juveniles. *Aquatic Toxicology* 230, 105694. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105694>
- Schultz, J.H., Bu, L., Adema, C.M., 2018. Comparative immunological study of the snail *Physella acuta* (Hydrophila, Pulmonata) reveals shared and unique aspects of gastropod immunobiology. *Molecular Immunology* 101, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.029>
- Tufi, Sara, Lamoree, M.H., De Boer, J., Leonards, P.E.G., 2015. Cross-platform metabolic profiling: application to the aquatic model organism *Lymnaea stagnalis*. *Anal Bioanal Chem* 407, 1901–1912. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8431-2>
- Tufi, S., Lamoree, M.H., Kessler, N., Leonards, P.E.G., 2015. A targeted metabolomics pipeline for elucidating imidacloprid sublethal toxicity in the freshwater snail *Lymnaea Stagnalis* central nervous system. Presented at the 11th International Conference of the Metabolomics Society.

## ANNEXE III : Supplementary data article n°3

## Supplementary data

### 1. Survival and DCF concentrations in water

Table S-1- Survival rates in F1 and F2 generations of *L. stagnalis* at 16 weeks post-hatch (mean  $\pm$  SD, n=3)

Group	Ctrl	Ctrl <sub>Low</sub>	Ctrl <sub>Medium,High</sub>	Low	Medium	High
F1 survival rate (%)	/	67.1 $\pm$ 6.7	79.3 $\pm$ 6.1	69.8 $\pm$ 3.8	59.8 $\pm$ 7.1	60.2 $\pm$ 5.8
F2 survival rate (%)	74.9 $\pm$ 2.0	/	/	79.0 $\pm$ 3.5	69.5 $\pm$ 5.1	73.5 $\pm$ 4.2

Table S-2 – Diclofenac concentrations in water after the renewal of the exposure medium (T0) and after 7 days (T7) measured by LC/UV method (mean  $\pm$  SD, n=6)

Nominal concentration	0.1 $\mu$ g/L	2 $\mu$ g/L	10 $\mu$ g/L
T0	0.11 $\pm$ 0.01	2.23 $\pm$ 0.25	12.53 $\pm$ 1.16
T7	0.10 $\pm$ 0.02	1.53 $\pm$ 0.55	10.87 $\pm$ 0.19

### 2. Differences in control levels between generations

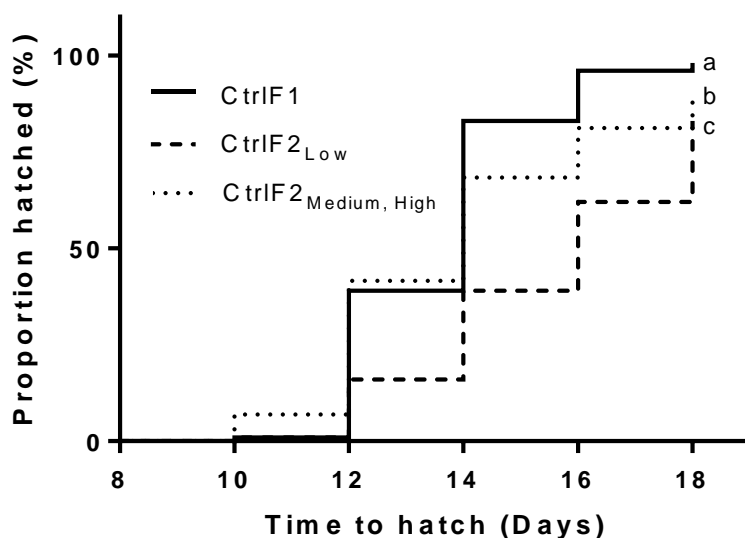


Figure S-1- Time to hatch in controls from generations F1 and F2.

The differences in time to hatch for the CtrlF2<sub>Low</sub> group compared with the other controls could be explained by a slight decrease in chamber temperature (19 °C instead of 21 °C) during the first days of the hatching test for this group (Fig. S-1). The lower temperature could delay hatching. The associated exposed group for this generation showed the same delay, which lead us to consider that DCF impact was correctly assessed.



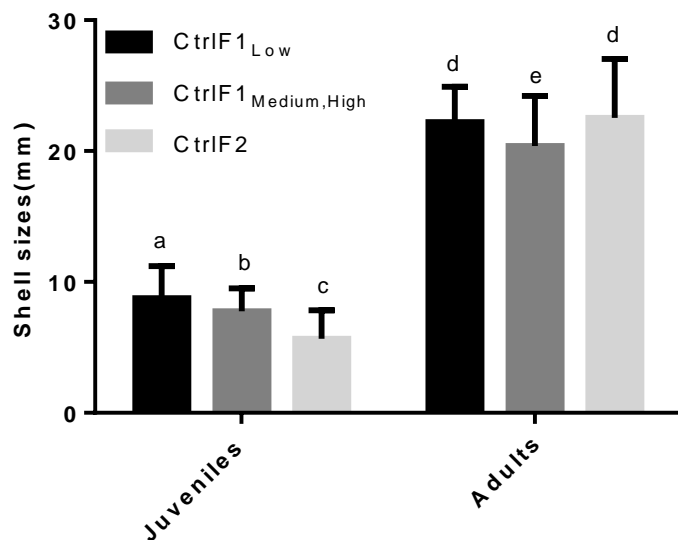


Figure S-2 – Shell sizes (mm) in control snails from generations F1 and F2 at juvenile and adult stages. Errors bars represent standard deviation.

There were statistically significant variations between shell sizes of the snails between controls (Fig S-2).

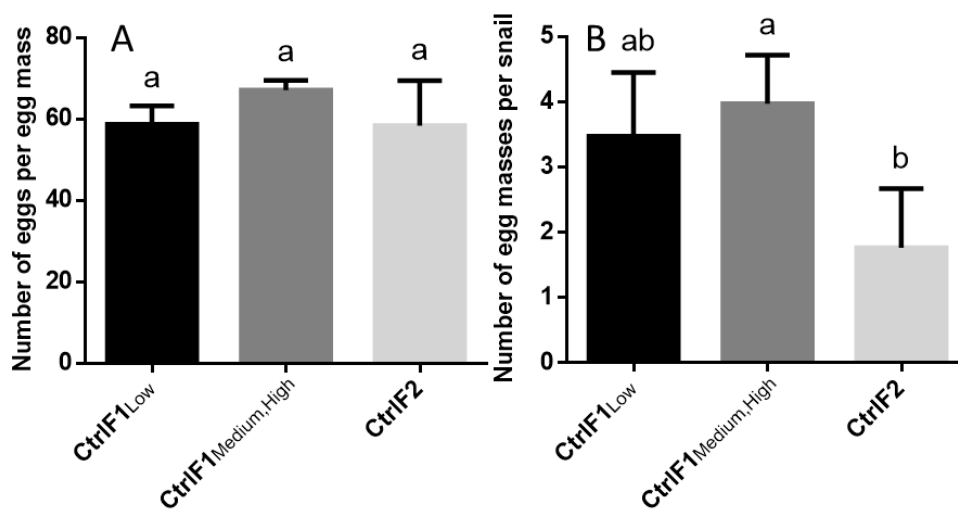


Figure S-3 – Reproductive endpoints in controls from generations F1 and F2. A) Number of eggs per egg mass and B) Number of egg masses per snail. Errors bars represent standard deviation.

The number of eggs per egg mass is related to snail body size (Nakadera et al., 2015). As snails were chosen with homogenate sizes there were no differences in the number of eggs per egg mass across generations (Fig. S-3A). More surprisingly, the number of egg masses per snail was 2-fold lower in the F2 generation control (Fig. S-3B) than in the other controls. In multigenerational study performed in gastropods, natural fluctuations within generations were reported in reproductive endpoints (number of eggs) (Oliveira-Filho et al., 2009; Salice et al., 2009).

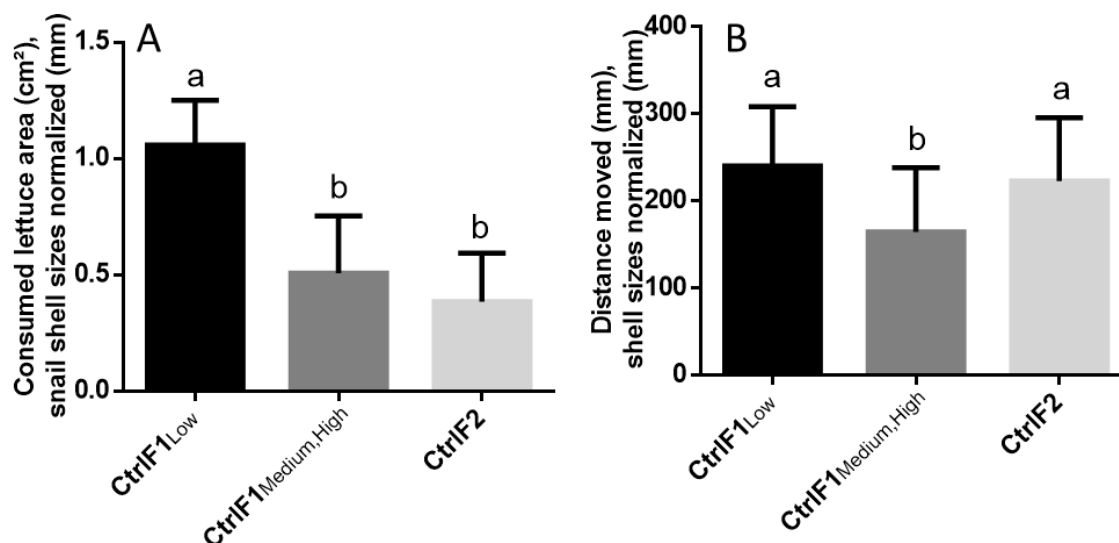


Figure S-4 – Behavioral endpoints in controls from generations F0, F1 and F2. A) Consumed lettuce area (mm) in 6 hours in adults snails, normalized with shell size (mm), and B) distance moved (mm) in two hours, normalized with shell size (mm). Error bars represent standard deviation.

The behavioral endpoints were inconstant across generations. Regarding the feeding test, consumed lettuce area was statistically lowest in the CtrlF1<sub>Medium, High</sub> and in the CtrlF2 groups compared to the CtrlF1<sub>Low</sub> groups (Fig. S-4A). These differences could be explained by the lettuce species used in this test. Indeed, depending on the season, we were limited in the choice of lettuce species, which caused a difference in leaf thickness and consequently a modification of the lettuce areas consumed by snails. The distance covered by snails in 2 hours was also a variable parameter (Fig. S-4B). However, since the associated values measured in exposed groups remain close to the controls, we considered that our test was relevant and that the observed differences were only due to the presence of diclofenac.

### 3. Response to light stress results

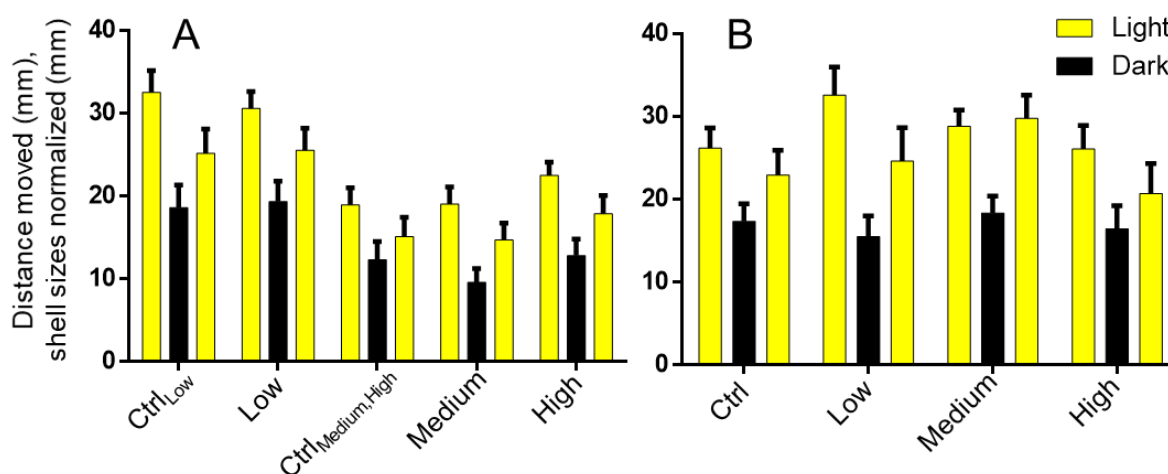


Figure S-5 - Distance moved by snails (mm) during 15 min of light, followed by 15 min of dark and then 15 min light, normalized with shell sizes (mm), for the A) F1 and B) F2 generations. Error bar represent standard deviation.

References

- Nakadera, Y., Swart, E.M., Maas, J.P.A., Montagne-Wajer, K., Ter Maat, A., Koene, J.M., 2015. Effects of age, size, and mating history on sex role decision of a simultaneous hermaphrodite. *Behavioral Ecology* 26, 232–241. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru184>
- Oliveira-Filho, E.C., Grisolia, C.K., Paumgartten, F.J.R., 2009. Effects of endosulfan and ethanol on the reproduction of the snail *Biomphalaria tenagophila*: A multigeneration study. *Chemosphere* 75, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.085>
- Salice, C.J., Miller, T.J., Roesijadi, G., 2009. Demographic Responses to Multigeneration Cadmium Exposure in Two Strains of the Freshwater Gastropod, *Biomphalaria glabrata*. *Arch Environ Contam Toxicol* 56, 785–795. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9203-9>



# ANNEXE IV : Voies métaboliques impactées lors de l'intégration des données métabolomiques et transcriptomiques

# ANNEXE IV : Voies métaboliques impactées lors de l'intégration des données métabolomiques et transcriptomiques

