



HAL
open science

Développement de la planaire comme modèle simplifié d'études *in vivo* du système nerveux en toxicologie et écotoxicologie

Adorée Lucia Rejo Hanitrinirina

► **To cite this version:**

Adorée Lucia Rejo Hanitrinirina. Développement de la planaire comme modèle simplifié d'études *in vivo* du système nerveux en toxicologie et écotoxicologie. Ecotoxicologie. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES049 . tel-04902519

HAL Id: tel-04902519

<https://theses.hal.science/tel-04902519v1>

Submitted on 21 Jan 2025

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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Développement de la planaire comme modèle simplifié
d'études in vivo du système nerveux en toxicologie et
écotoxicologie

Thèse présentée et soutenue, le 19 janvier 2024 par

Adorée Lucia REJO HANITRINIRINA

École 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

Elsa BONNAFE et Caroline VIGNET

Composition du jury

M. Vincent FOURCASSIE, Président, CNRS - CRCA

Mme Marie-Laure BEGOUT, Rapporteuse, Ifremer

Mme Carole COSSU-LEGUILLE, Rapporteuse, Université de Lorraine

M. Hervé CADIOU, Examineur, Université de Strasbourg

Mme Elsa BONNAFE, Directrice de thèse, Institut National Universitaire Jean-François Champollion

Mme Caroline VIGNET, Co-directrice de thèse, Institut National Universitaire Jean-François
Champollion

Membres invités

M. Abel BERNADOU, Université Toulouse III

Thèse

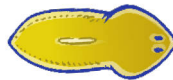
En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Toulouse

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée par

Lucia COLIN-REJO



Développement de la planaire comme modèle simplifié d'études *in vivo* du système nerveux en toxicologie et écotoxicologie

Ecole doctorale :

SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité :

Infectiologie, Physiopathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Unité de recherche :

BTSB - Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives

Thèse dirigée par

Elsa BONNAFE, et Caroline VIGNET

Jury

M. Vincent FOURCASSIE, Président du jury

Mme Marie-Laure BEGOUT, Rapporteur

Mme Carole COSSU-LEGUILLE, Rapporteur

M. Hervé CADIOU, Examineur

Mme Elsa BONNAFE, Directrice de thèse

Mme Caroline VIGNET, Co-directrice de thèse

M. Abel BERNADOU, Invité

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à mes encadrantes de thèse, Elsa Bonnafé et Caroline Vignet. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir suivie durant ces trois années. Je vous suis profondément reconnaissante de m'avoir formée, de m'avoir prodigué vos conseils et de m'avoir toujours exprimé les choses avec justesse, me permettant ainsi d'avancer.

Mes plus vifs remerciements à Marie-Laure Bégout et Carole Cossu-Leguille, mes deux rapporteuses qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie également mes examinateurs Vincent Fourcassié, Hervé Cadiou et Abel Bernadou pour les échanges qualitatifs que nous avons eus lors de ma soutenance.

Je remercie les membres de mon comité de suivi, Xavier Cousin, Frank LeFoll et Messika Revel pour leurs conseils qui m'ont permis de prendre du recul sur mon travail et sur mes objectifs tout au long de ma thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Philippe Rousseau, avec qui j'ai fait mes premiers pas en laboratoire, en M1, et qui m'a encouragée à poursuivre dans la recherche et à ainsi me lancer dans un doctorat.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe BTTB (qui ont accepté, je crois non sans joie, de jouer les goûteurs de mes essais pâtisseries). Merci à Michel Threilhou de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Toute ma gratitude à Jean-Michel Malgouyres, merci pour ta curiosité, ton pragmatisme, tes allers-retours au Biocoop, Leclerc pour que mes planaires ne manquent de rien et pour le transport de mes échantillons jusqu'à Toulouse, merci enfin de t'être occupé des planaires lors de mes congés et surtout d'avoir pris le relais lorsque je les ai lâchement abandonnées pour la rédaction de ce manuscrit. Merci infiniment à Jean-Luc Carayon pour l'énorme travail d'analyse d'échantillons en spectrométrie de masse que tu as réalisé, pour nos discussions « destinations » sur le Portugal, enfin quelqu'un qui partage mon amour et ma fascination pour ce pays ! Merci à Nathan Téné pour sa bonne humeur, pour son aide pour l'analyse d'échantillons en spectrométrie de masse, et pour la gestion des commandes. Merci à Pierre Marty pour son aide précieuse en statistiques et pour ses blagues qui n'ont jamais manqué de mettre l'ambiance à table le midi. Merci à Arnaud Billet et à Sébastien Guiral pour leurs conseils.

Je remercie Delphine Dos Santos pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide pendant les TPs que j'ai encadrés durant mes vacances d'enseignements et de m'avoir permis plus d'une fois d'emprunter du matériel de laboratoire sans lequel je n'aurais pu parachever des manips. Merci également à Jenny Moro qui a toujours répondu à mes sollicitations.

Merci à Marie Lourenço du service com' pour tous ces événements de vulgarisation scientifique auxquels j'ai eu plaisir à participer, et qui ont réellement été formateurs pour la prise de parole en public.

Mes sincères remerciements à l'équipe du service d'appui à la recherche, j'ai nommé Karen Chevalier et Valérie Fernandez pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide précieuse dans cette jungle administrative, mais aussi pour nos discussions, merci d'avoir toujours laissé votre porte ouverte pour moi.

Je voudrais remercier encore une fois Caroline Vignet, véritable *wonder woman* des temps modernes que j'admire beaucoup. Merci pour ta présence, ta sensibilité, pour ta bonne humeur. Je ne te remercierai jamais assez pour toutes les opportunités que tu m'as données durant ma thèse, et parce que tu m'as toujours soutenue, j'ai pu aller jusqu'au bout de cette aventure. Nos discussions vont vraiment me manquer !

When Biology meets IA: merci à Thierry Montaut de nous avoir rejoints, Caroline, Jean-Michel et moi dans le monde merveilleux des planaires, sur le projet PlanarIA, je le remercie pour son enthousiasme, sa pédagogie et son engagement, qui ont fait de ma thèse les prémices d'un nouveau projet.

Je remercie mes stagiaires qui ont effectué de nombreuses manips qui figurent dans ce manuscrit : Mathilde Madre, Florian Chapeau, Judith Lorin, et Marie Ksen. Merci Marie pour cet énorme travail que tu as réalisé en si peu de temps et pour ta bonne humeur.

Merci à mes collègues de bureau, tour à tour doctorants, docteurs, puis postdocs. On a galéré, travaillé, ri et surtout beaucoup discuté, des moments de complicité pour lesquels je vous serai éternellement reconnaissante. Je remercie donc les déjà docteurs Valentine, Lucie, et Steven ; à ceux en devenir, Caroline (*Miss Whatever* !), Guillaume, Stephanie, et le dernier arrivé Valentin. Je vous souhaite le meilleur et j'ai hâte de découvrir vos thèses qui seront, sans aucun doute, très belles. Merci également à Vincent, Ludo, Ibtissam, Tatiana, Abdul, et Pierre pour les discussions et bons moments passés ensemble. Merci à Manon, rencontrée au hasard de repas avec les « docs », que j'apprécie particulièrement, et qui est devenue une amie.

Un grand merci à Christophe Sénégas, qui a réalisé les illustrations de planaires que vous verrez en en-tête dans les pages suivantes de ce manuscrit.

Je prends le temps de remercier ici celles sans qui cette thèse n'aurait pas pu exister : mes incroyables et courageuses planaires, qui ont donné leur vie (si je puis m'exprimer ainsi) pour la Science, je vous ai nettoyées, nourries (au foie de veau bio quand même) choyées, mais surtout manipulées avec respect.

Lorsqu'on arrive au bout d'une thèse, on a tendance à ne mettre en avant que les hauts, pourtant, la vraie force, c'est aussi de savoir demander de l'aide lorsqu'on ne s'y retrouve plus. Alors, je prends ce temps pour remercier Valentin Leblanc, dont le suivi m'a aidé pour me recentrer sur mes forces et mes objectifs, m'ayant ainsi permis sans doute mieux de gérer le stress du « pendant » et de « l'après-thèse ». Toujours dans le volet thérapeutique, *shout out to* Maëliiss Wilga, ma super prof de chant, une personne au grand cœur qui m'a appris à révéler ma voix, mais aussi à avoir confiance en moi et en mes capacités. Jamais je n'aurais cru pouvoir chanter devant du public, ou encore sur le parvis de la cathédrale d'Albi, des concerts et une fête de la musique inoubliables! Pour ces moments et pour tout ce que tu fais avec pédagogie et amour, merci !

Albi, c'est aussi des rencontres et la musique, ça rapproche ! Merci à Anne, Clara et Iannis (coucou le Japon), à nos après-midi et soirées jeux de société, à nos pique-niques sur les berges du Tarn, à tous ces moments de partage qui rendent la vie plus douce.

Je ne saurais oublier ma famille : à mes parents à Madagascar, qui m'ont toujours encouragé et dont les nombreux sacrifices m'ont permis de faire un parcours scolaire brillant. Merci, à mes sœurs, à Roméa, que j'ai rejoint à Toulouse, il y a presque 9 ans de cela, et qui a facilité mon installation en France ; à Lily, et à nos retrouvailles sur Bordeaux, avec ta famille, qui me font toujours du bien. Au petit dernier, Giovanni, maintenant devenu jeune homme, à qui je souhaite un bel avenir. Je n'oublie pas ma deuxième famille, celle du Portugal, à mes beaux-parents Isabel et Christian, qui m'ont toujours chaleureusement accueillie chez eux comme leur propre fille, ainsi que pour leur amour et soutien sans faille. Merci du fond du cœur aux Rejo et Colin de France pour leur amour et leurs encouragements et tous ces merveilleux moments que j'ai passés en leur compagnie.

Merci à ma petite famille : à ma Pétale, pour ses *zoomies* à 1h du mat' qui m'impressionneront toujours, mais surtout pour nos moments câlins et ronrons qui m'ont toujours apaisée et dont je me laisserais jamais. Enfin, merci à mon Alexandre : tu

m'accompagnes depuis la L1, il n'y a donc pas que le doctorat qui fait bac+8 ! Merci pour ton amour, ton soutien, et d'avoir toujours cru en moi. Merci pour tout ce que tu as fait pour m'aider à entreprendre, vivre et finir cette thèse : aux supers macros *Excel* et *FiJi* pour traiter mes données, au logiciel de plan de plaques *LabNarc* que tu as spécialement conçu pour moi, à ces superbes images vectorielles que tu as réalisé sur *Inkscape*, qui m'ont servi de visuels pour toutes mes communications. Je n'oublie pas ces nuits durant lesquelles tu as veillé avec moi, aux séances *TeamViewer* alors que tu étais à l'autre bout de la France, à nos super escapades. Tu as été assez fou pour me demander en mariage pendant ma thèse ! Et j'ai été honorée et heureuse d'avoir porté ton nom lorsque je l'ai défendue. Pour tout cela, il me tient à coeur de te dédier ce manuscrit.

J'en ai oublié, j'en suis sûre ! Alors mille mercis à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à cette aventure et à la réalisation de ce manuscrit.

*À Alex,
pour son soutien inconditionnel.*

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| Liste des travaux | 11 |
| Liste des figures | 14 |
| Liste des abréviations | 15 |
| Introduction générale | 18 |
| Chapitre I: Etat de l'art | 20 |
| 1. La pollution et les polluants organiques persistants | 20 |
| 1.1 La pollution chimique | 20 |
| 1.2 Les polluants organiques persistants (POP) | 22 |
| 1.3 La toxicologie et l'écotoxicologie | 23 |
| 1.4 One environmental health/ One health toxicology | 24 |
| 2. Modèles d'étude en toxicologie et écotoxicologie | 26 |
| 2.1 Modèles animaux vertébrés | 27 |
| 2.1.1 Modèles mammifères | 27 |
| 2.1.2 Poissons | 27 |
| 2.2 Réflexion sur le développement de modèles High Throughput Screening (HTS) | 29 |
| 2.2.1 REACH, ToxCast et 3R | 29 |
| 2.2.2 Modèles de criblage à haut débit: in vitro et in silico | 31 |
| 2.3 Emergence des modèles invertébrés | 33 |
| 2.3.1 Modèles invertébrés classiques | 33 |
| 2.3.2 Modèles invertébrés aquatiques | 34 |
| 3. La planaire d'eau douce | 37 |
| 3.1 Systématique des planaires | 37 |
| 3.2 Caractéristiques morphologiques | 39 |
| 3.3 Mode de reproduction | 40 |
| 3.4 Ecologie des planaires d'eau douce | 41 |
| 3.5 Répartition géographique | 42 |
| 3.6 Régénération | 44 |
| 3.7 Description du système nerveux des planaires | 47 |
| 3.7.1 Anatomie du système nerveux | 47 |
| 3.7.2 Anatomie des neurones | 49 |

| | |
|---|------------|
| 3.7.3 Hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle du système nerveux | 49 |
| 3.7.4 Les mécanismes moléculaires de la régénération du SN | 50 |
| 3.8 La planaire, modèle d'étude en toxicologie | 52 |
| 3.8.1 Modèle pour la Toxicologie dans le développement neuronal | 52 |
| 3.8.2 La planaire: bioindicateur des écosystèmes aquatiques | 53 |
| 3.8.3 Méthodes d'évaluation toxicologique chez les planaires | 54 |
| Objectifs de la thèse | 60 |
| Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux | 61 |
| 1. Synthèse de l'article 1 | 61 |
| 2. Article 1 | 62 |
| 3. Synthèse de l'article 2 | 101 |
| 4. Article 2 | 103 |
| Chapitre III : Etude de l'effet de l'effet de molécules neuroactives sur le comportement des planaires | 136 |
| 1. Synthèse de l'article 3 | 137 |
| 2. Article 3 | 138 |
| Résultats complémentaires | 159 |
| 1. Contexte | 159 |
| 2. Matériel et méthodes | 160 |
| 3. Résultats | 165 |
| Discussion générale | 172 |
| 1. La pertinence des tests comportementaux comme indicateurs toxicologiques | 172 |
| 2. Harmonisation et standardisation d'essais comportementaux chez la planaire | 173 |
| 3. Comportement et mode d'action des substances sur le système nerveux | 179 |
| 4. Les limites du modèle planaire | 180 |
| Perspectives | 181 |
| Références bibliographiques | 183 |
| Annexes | 215 |

| | |
|--|------------|
| Supplementary information – Article 1 | 215 |
| Supplementary information – Article 2 | 223 |
| Supplementary information - Article 3 | 231 |

Liste des travaux

Publications :

- **Rejo**, L., Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. (2023). Optimization and calibration of behavioural tests on different species of planaria for ecotoxicological studies. *Environmental toxicology and pharmacology*, 101, 104189.
- Mathiron, A. G. E., **Rejo**, L., Chapeau, F., Malgouyres, J. M., Silvestre, F., & Vignet, C. (2023). Tools for photomotor response assay standardization in ecotoxicological studies: Example of exposure to gentamicin in the freshwater planaria *Schmidtea mediterranea*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 102, 104242.
- **Rejo**, L., Ksen, M., Carayon, J.L., Marty, P., Malgouyres, J.M., Bonnafé, E., Vignet, C. Effect of acute exposure to two neuroactive compounds, nicotine and imidacloprid, on the behavioural response and expression of nicotinic receptor-encoding genes in planaria *Schmidtea mediterranea*. (En préparation)

Communications orales:

- **Rejo**, L., Chapeau, F., Madre, M., Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. Planaria as a new model for ecotoxicological and neurophysiological studies. *5ème Colloque d'EcoPhysiologie Animale- CEPA 5*. Novembre 2021. Montpellier, France.
- **Rejo**, L., Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. La planaire, le nouvel outil d'étude en écotoxicologie de demain. *17ème colloque annuel EcoBIM*. Mai 2022. Namur, Belgique.
- **Rejo**, L., Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. Screening the effects of Chlorpyrifos and an ant venom peptide with potential bioinsecticide activities on freshwater planaria through behavioural approaches. *Colloque PRIMO21, Pollutant Response in Marine Organisms*. Mai 2022. Göteborg, Suède.
- Vignet, C., **Rejo**, L., Ksen, M., Malgouyres, J.M., Verrier, T., Mouysset, M., Burges G., Schmitt, B., Montaut, T. L'intelligence artificielle: aide à la décision dans la surveillance environnementale du futur ? *Colloque annuel de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA)*. Juillet 2023. Le Havre, France.

Posters:

- **Rejo, L.,** Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. Etude comportementale de l'effet des facteurs d'élevage sur différentes espèces de planaires. *50^{ème} colloque de la Société Française pour l'Etude du Comportement Animal (SFECA)*. Mai 2021. En distanciel.
- **Rejo, L.,** Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. Standardized and reproducible quantitative approaches to screen antibiotics and organophosphates pesticides effects on freshwater planarian: setting the stage for High-throughput screening in (Eco) toxicology. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe*. Mai 2022. Copenhague, Danemark.
- **Rejo, L.,** Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. Screening of Coumaphos, an organophosphate pesticide on freshwater planarian through standardized and reproducible approaches. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe*. Avril 2023
- **Rejo, L.,** Verrier, T., Lorin, J., Malgouyres, J. M., Montaut, T., & Vignet, C. Development of freshwater planaria as a risk-assessment tool: when Biology meets AI. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe*. Avril 2023
- **Rejo, L.,** Ksen, M., Carayon, J.L., Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. Neurotoxicity of a neonicotinoid insecticide, Imidacloprid, to a non-target organism, planarian. *Colloque annuel de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA)*. Juillet 2023. Le Havre, France.
- Ksen, M., **Rejo, L.,** Carayon, J.L., Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. Les stéréotypies chez les planaires: réponses en fonction des molécules. *Colloque annuel de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA)*. Juillet 2023. Le Havre, France.

Vulgarisations scientifiques :

- **Rejo, L.** Freshwater planaria as a model for the valorization of ant bioactive peptides. *Speed-searching virtuel in English, Nuit Européenne des Chercheurs*. Septembre 2021.
- **Rejo, L.** La planaire : un modèle original pour des études toxicologiques, développé à Albi. *Université Pour Tous du Tarn*. Janvier 2022. Albi, France.

- **Rejo**, L. La planaire, modèle animal pour des études toxicologiques. *Flash conf' mystères, Nuit Européenne des Chercheurs*. Septembre 2022. Albi, France. Consultable en ligne : <https://media.univ-jfc.fr/channels/NEC2022/media/MEDIA221011160756634>

Liste des figures

| | |
|---|----|
| <i>Figure 1: Les différentes sources de pollution de l'eau issues de l'activité humaine.</i> | 21 |
| <i>Figure 2: La bioaccumulation et la bioamplification</i> | 22 |
| <i>Figure 3: Le concept One environmental health, une seule santé environnementale</i> | 26 |
| <i>Figure 4: Les cinq étapes de calcul de la dose initiale maximale recommandée dans le cadre des études sur l'homme à partir de données toxicologiques de modèles animaux.</i> | 27 |
| <i>Figure 5: Les trois lacunes des politiques gouvernementales en matière de substances chimiques.</i> | 31 |
| <i>Figure 6: Modèles animaux alternatifs utilisés en toxicologie et écotoxicologie.</i> | 36 |
| <i>Figure 7: Photos d'espèces de planaires communément utilisé en laboratoire.</i> | 37 |
| <i>Figure 8: Phylogénie des planaires sur différents niveaux.</i> | 38 |
| <i>Figure 9: Anatomie de la planaire.</i> | 39 |
| <i>Figure 10: La reproduction asexuée chez la planaire.</i> | 41 |
| <i>Figure 11: Répartition géographique des planaires d'eau douce.</i> | 43 |
| <i>Figure 12: La régénération chez la planaire.</i> | 45 |
| <i>Figure 13: Bases cellulaire et moléculaire de la production de nouveaux tissus dans la régénération des planaires.</i> | 46 |
| <i>Figure 14: Vue d'ensemble de l'anatomie du système nerveux des planaires.</i> | 48 |
| <i>Figure 15: Le système nerveux des planaires est composé de sous-types neuronaux distincts.</i> | 50 |
| <i>Figure 16: Comparaison des deux systèmes de notation de Grebe et Schaeffer (système GS) (Grebe & Schaeffer 1991) et de Wu et al (2014).</i> | 56 |
| <i>Figure 17: Indicateurs comportementaux quantitatifs mesurés chez la planaire</i> | 57 |
| <i>Figure 18: Le gliding et le Scrunching chez la planaire.</i> | 58 |

Liste des abréviations

| | |
|------------------------|---|
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| ARN | acide ribonucléique |
| AOP | <i>adverse outcome pathway</i> |
| BMP | <i>bone morphogenetic protein</i> |
| CL₅₀ | concentration létale 50 |
| CNV | cordons nerveux ventraux |
| CO₂ | dioxyde de carbone |
| COM | <i>center of mass</i> |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DEH | dose équivalente pour l'homme |
| DL₅₀ | dose létale 50 |
| DP | déchlorane plus |
| DDT | dichlorodiphényltrichloroéthane |
| EDPB | ethers diphényliques polybromés |
| EEA | <i>european environment agency</i> |
| EGRF | <i>epithelial growth factor receptor</i> |
| FDA | <i>food and drug administration</i> |
| FGFR | <i>fibroblast growth factor receptors</i> |
| GABA | acide gamma-aminobutyrique |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| HAP | hydrocarbures aromatiques polycycliques |

HCB h xachlorobenz ne

HTS *high-throughput screening*

INERIS institut national de l'environnement industriel et des risques

KE *key events (aop)*

LTS *low-throughput screening*

MIE *molecular initiating event*

MTS *medium-throughput screening*

NOAEL *no observable adverse effect level*

NPC naphtal ne polychlor 

OC organochlor s (pesticides)

OCDE organisation de coop ration et de développement économiques

OFB office français de la biodiversité

OMS organisation mondiale de la santé

PCB polychlorobiph nyle

PCDD/F polychloro-dibenzo dioxine/furane

PFAS *per- and polyfluoroalkyl substances*

PLDT *planarian light dark test*

pLMV *planarian locomotor velocity*

PMR *photomotor response*

POP polluant organique persistant

PPC préférence   la place conditionnée

(Q) SAR *(quantitative) structure-activity relationships*

REACH *registration, evaluation and authorization of chemicals*

RT-PCR *reverse transcription polymerase chain reaction*

SNC système nerveux central

SNP système nerveux périphérique

SRAS syndrome respiratoire aigu sévère

UBA *umweltbundesamt* (agence fédérale allemande de l'environnement)

3R *reduce, refine, replace*

Introduction générale

Des milliers de molécules, médicaments ou produits phytosanitaires tels que les pesticides, sous différentes formulations, sont commercialisées et de nouvelles substances arrivent sur le marché chaque année. L'accès à ces produits a longtemps été synonyme de confort et de développement économique pour la société, mais s'accompagne aujourd'hui d'une prise de conscience face à la pollution chimique et l'impact nocif engendrés, sur la santé des Hommes et des écosystèmes (aquatiques, marins et terrestres). Depuis une vingtaine d'années, l'agence environnementale européenne (*European Environment Agency*) et la *Food and Drug Administration* (FDA), outre Atlantique, ont décidé d'agir face au manque de données toxicologiques disponibles en comparaison du nombre de molécules commercialisées. Malheureusement les tests toxicologiques traditionnels ne sont pas en mesure de répondre à la nécessité croissante de tester tous les composés existants. Ainsi, plusieurs années peuvent s'écouler avant qu'une substance ne soit déclarée toxique ou interdite, comme ce fut le cas avec deux pesticides neurotoxiques : le chlorpyrifos, utilisé à des fins agricole et domestique depuis 1965, et interdit dans l'Union Européenne seulement en 2020 (European Union, 2020), et l'imidaclopride commercialisé depuis 1990 et interdit en 2018 (European Union, 2018). Les bioessais sur les modèles animaux traditionnels tels que les mammifères sont de plus en plus critiqués, car trop coûteux et laborieux. De plus l'usage d'animaux en recherche pose un véritable dilemme éthique. Les directives REACH et Tox21, respectivement européenne et étasunienne, et l'adoption du principe des 3R dans la recherche, ont dans un premier temps encouragé le développement de modèles *in vitro* et *in silico*, dans le but de faire du criblage toxicologique à haut débit. Cependant, le manque de complexité des modèles cellulaires *in vitro* et la nécessité de disposer d'importantes données toxicologiques *in vivo* pour construire des algorithmes prédictifs *in silico*, a amené à reconsidérer l'utilisation de modèles animaux alternatifs (Khabib et al., 2022). Il s'agit alors de réaliser dans un contexte de criblage à moyen débit, des essais toxicologiques sur des modèles non-mammifères, poissons ou invertébrés. Des essais qui doivent alors être plus rapides et moins coûteux, et dont les résultats devraient pouvoir prédire de manière fiable la toxicité des substances sur l'homme et sur les écosystèmes. Il est par conséquent nécessaire de développer de nouveaux outils non seulement plus pertinents, mais qui permettraient un criblage haut ou moyen débit des substances chimiques pour évaluer les effets potentiellement néfastes sur l'homme, mais également ceux sur l'environnement, et

notamment en milieu aquatique. Cette approche globale des enjeux sanitaires est développée depuis le début des années 2000 sous le nom de concept « *One health* », traduit par une « une seule santé » en français. La planaire qui est à la fois un bioindicateur de la santé des écosystèmes d'eau douce (Knakiewicz, 2014), et un modèle pertinent pour évaluer les effets de substances chimiques, notamment neurotoxiques chez l'homme émerge aujourd'hui comme un bon modèle pour des études toxicologiques (Hagstrom et al., 2015; Wu & Li, 2018). L'harmonisation des méthodes recensées dans la littérature, ainsi que le développement d'outils et d'indicateurs sensibles au niveau comportemental mais également mécanistiques pour l'évaluation toxicologique chez la planaire font l'objet de cette thèse.

Cette thèse est divisée en trois chapitres. Le premier chapitre ci-après, est un état de l'art, et traite de la pollution chimique d'origine anthropique, notamment en milieu aquatique, et de ses répercussions sur la santé des écosystèmes, des hommes et des animaux, à travers le concept « *One health* ». Ensuite la nécessité d'évaluer ces risques avec des essais toxicologiques sur des modèles animaux, d'abord vertébrés puis invertébrés seront détaillés. Enfin, cette contextualisation s'achèvera sur la description de l'organisme modèle, la planaire, de l'essor de son usage en toxicologie et écotoxicologie et de la diversité des tests et des paramètres retrouvés dans la littérature qui pose problème dans la comparaison des résultats d'une étude à l'autre.

Le second chapitre s'attèle, au développement, à l'harmonisation et la standardisation de tests comportementaux, basés sur le suivi de la locomotion des planaires, indicateurs pertinents de la neurotoxicité. Ce chapitre comprend deux publications scientifiques.

Dans le troisième chapitre, dans l'article 3, l'analyse de deux indicateurs comportementaux, les stéréotypies et la locomotion sont conjugués à l'analyse de l'expression des gènes en réponse à l'exposition des planaires à deux agonistes des récepteurs nicotiniques à acétylcholine : la nicotine et l'imidaclopride. Les résultats complémentaires traitent de l'effet de molécules neuroactives, qui ciblent le fonctionnement des récepteurs muscariniques et dopaminergiques. Les deux dernières parties de ce manuscrit sont la discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse et la conclusion générale et les perspectives.

Chapitre I: Etat de l'art

1. La pollution et les polluants organiques persistants

1.1 La pollution chimique

La pollution résulte de l'introduction de substances nocives ou de perturbations alors appelées « polluants » dans un milieu. La pollution peut avoir une cause naturelle (rejets de gaz et de cendres suite à une éruption volcanique), mais est le plus souvent d'origine anthropique. Ainsi, la pollution chimique, a été définie comme « de nouvelles substances, de nouvelles formes de substances existantes et de forme de vie modifiées » y compris « des produits chimiques et d'autres nouveaux types de matériaux d'ingénierie ou d'organismes qui n'étaient pas connus du système terrestre, ainsi que des éléments naturels (par exemple les métaux lourds) mobilisées par des activités anthropogéniques ». Les produits chimiques font partie de notre vie quotidienne et des milliers d'entre eux sont utilisés chaque jour. Les polluants chimiques sont issus 1) de l'industrie pharmaceutique : il peut s'agir de médicaments destinés à l'usage humain ou vétérinaire, tels que les antibiotiques ; 2) de l'agroalimentaire, avec les produits phytosanitaires tels que les pesticides ; 3) de produits de consommation, tel que le plastique ; 4) de la combustion du charbon, du pétrole ou encore d'ordures ménagères, ou de certains produits industriels particuliers, dans le cas des métaux lourds (plomb, mercure, arsenic, zinc, cadmium, cuivre, chrome, nickel). Ces polluants chimiques se retrouvent dans l'environnement et contaminent l'air, le sol, et l'eau, notamment les eaux de surface et souterraines (**Figure 1**) ainsi que les océans, et ont des effets néfastes sur la santé humaine, et sur les écosystèmes.

Les écosystèmes aquatiques sont particulièrement concernés car ils sont dans la plupart des cas le réceptacle final des polluants qui y arrivent par rejets ou par ruissellement par exemple. La qualité de l'eau des rivières, lacs, mers et eaux souterraines est influencée par des apports directs issus de l'activité humaine, tels que ceux provenant d'une usine ou d'une station d'épuration, ce que l'on appelle la "pollution ponctuelle". Elle est également influencée par la pollution provenant de sources étendues, telles que les nutriments et les pesticides issus des activités agricoles et les polluants rejetés dans l'air par l'industrie, qui retombent ensuite sur la terre et dans la mer, appelée "pollution diffuse". La principale source ponctuelle de pollution de l'eau est le traitement des eaux usées, tandis que pour la pollution diffuse, les principales sources sont l'agriculture et les centrales électriques à combustibles fossiles (via l'air). La

pollution plastique, les microplastiques provenant des textiles et les polluants chimiques, tels que les PFAS, que l'on trouve dans le sol et dans l'eau, constituent d'autres sources de pollutions.

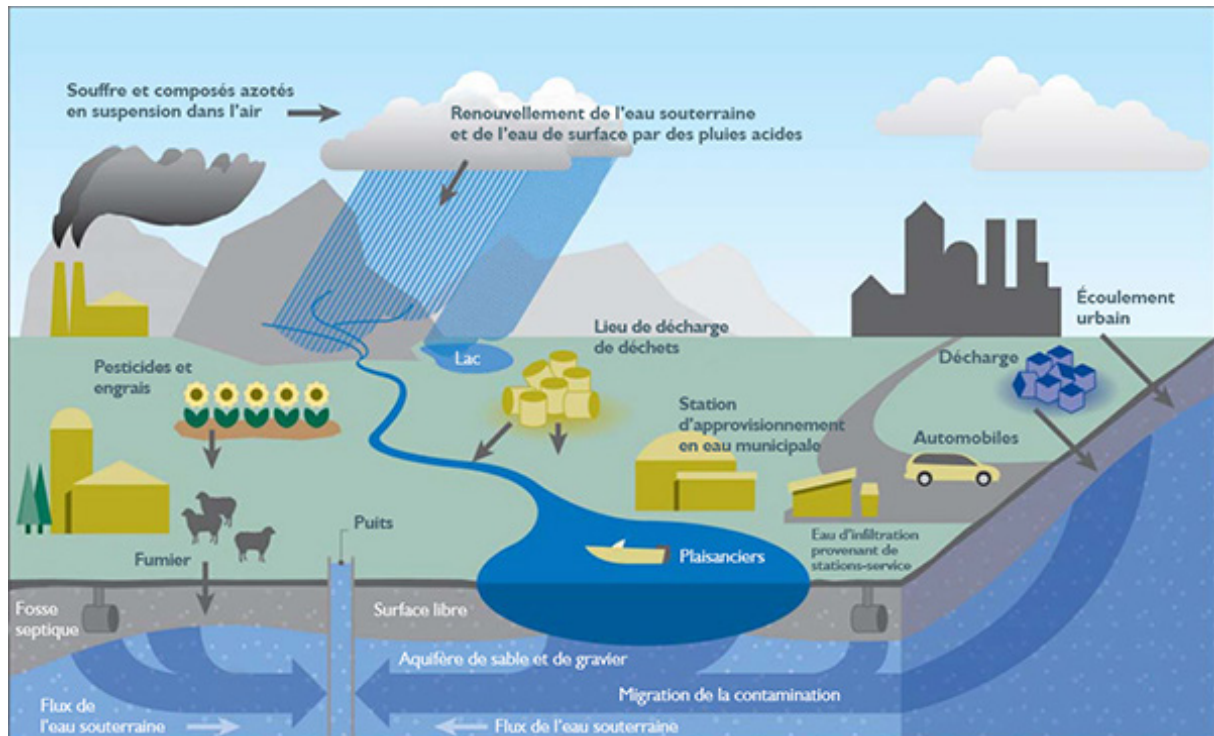


Figure 1: Les différentes sources de pollution de l'eau issues de l'activité humaine. Cette image représente un bassin hydrographique qui comprend des sources d'eau de surface et souterraines et les activités humaines qui contribuent à la contamination des sources d'eau. En arrière-plan à gauche, l'image montre une usine et ses émissions atmosphériques, qui sont captées par des nuages desquels une pluie acide tombe et contamine l'eau. Toujours en arrière-plan, à droite, une ville qui contamine l'eau par le biais d'eaux de ruissellement urbain et d'eau de lixiviation de déchets enfouis. Au centre, des terres agricoles desquelles pesticides et fumier contaminent les sources d'eau, de même qu'un amoncellement de déchets dangereux, une fosse septique et un réservoir d'essence enfouis dans le sol. Représentant les eaux de surface, les cours d'eau qui proviennent de montagnes convergent vers une rivière qui se jette à son tour dans un lac. Les eaux souterraines sont représentées au moyen d'une vue en coupe à travers le sol, les épaisses flèches bleues illustrent les écoulements d'eau et de contaminants, et qui pointent en direction d'un puits. Source de l'image: *Pollution Probe – The Source Eau Protection Primer 2004*

Les hommes, leurs animaux de compagnie et d'élevage sont exposés aux polluants chimiques principalement par leur environnement, et l'alimentation (eau, produit de la mer contaminés). Selon le niveau d'exposition, les effets qui en résultent peuvent conduire à une série de maladies chroniques, telles que le cancer. Ces mêmes polluants perturbent également l'équilibre naturel des écosystèmes, par conséquent sur les organismes qui y résident.

En 2016, 334 millions de tonnes de produits chimiques ont été consommés au sein des pays de l'Union Européenne, dont 62 % et 36 % étaient considérées comme des substances présentant un risque pour la santé et l'environnement respectivement (European Environment Agency, 2017). Il est aujourd'hui admis que les conséquences de l'augmentation de la production et de la diversification des produits chimiques de synthèse sur le réchauffement climatique ont surpassé les facteurs bien connus tels que la hausse des concentrations de CO₂

atmosphérique, la pollution par les nutriments, la destruction des habitats et la perte de biodiversité (Bernhardt et al., 2017).

1.2 Les polluants organiques persistants (POP)

Les POP sont des composés organiques qui s'accumulent dans l'environnement et chez les organismes vivants. En effet, ces contaminants ont une propension à la bioaccumulation - c'est-à-dire qu'ils s'accumulent dans les tissus des organismes qui les ont absorbés- et à la bioamplification sur l'ensemble des niveaux trophiques¹ (**Figure 2**), et sont rémanents dans l'environnement. Les humains et les animaux d'élevage sont ainsi principalement exposés aux POPs par le biais des aliments, de l'eau et de l'air (Guo et al., 2019).

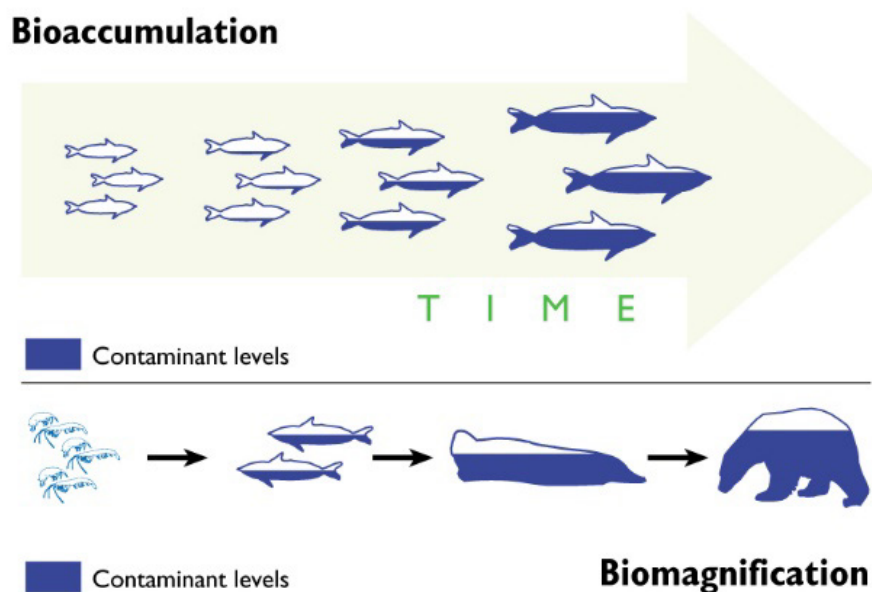


Figure 2: La bioaccumulation et la bioamplification (*biomagnification* en anglais). La bioaccumulation se produit à l'intérieur d'un organisme, lorsqu'une substance s'accumule dans les tissus et est absorbée plus rapidement qu'elle n'est éliminée. La bioamplification consiste en l'augmentation de la concentration de polluants persistants à mesure que l'on remonte la chaîne alimentaire.

Ces composés organiques sont classés en fonction de leur origine et de leur structure chimique : ainsi le furane et la dioxine sont des POPs d'origine naturelle, tandis que les notoires pesticides organochlorés (OC), polychlorobiphényles (PCB), hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), polychloro-dibenzo dioxines/furanes (PCDD/F) mais aussi le naphthalène polychloré (NPC), les éthers diphenyliques polybromés (EDPB), le déchlorane plus (DP), et l'hexachlorobenzène (HCB) constituent des POPs d'origine artificielle. Ces polluants constituent une menace pour les éléments biotiques de tous les niveaux trophiques et ont

¹ Position occupée par un organisme vivant dans la chaîne alimentaire.

tendance à se bioaccumuler à des concentrations élevées dans les organismes vivants présents au niveau trophique le plus élevé de la chaîne alimentaire. Les POPs ont des effets nocifs sur la santé des organismes. Par exemple, Lahouel (2016) a montré que l'exposition chronique par voie orale à un mélange représentatif de POP composé d'endosulfan, de chlorpyrifos, de naphthalène, et de benzopyrane à de très faibles concentrations (0.002 à 6µg/kg selon les composés) induisait chez les rats des déficiences neuro-comportementales (notamment locomotrice) et un état de stress oxydatif dans les mitochondries des cellules du cerveau. On attribue également aux POPs des malformations congénitales, la carcinogenèse, des troubles du système immunitaire et des perturbations endocriniennes (revue dans (Nagar et al., 2023)).

1.3 La toxicologie et l'écotoxicologie

La toxicologie est la discipline qui étudie les effets nocifs (potentiels) des substances chimiques sur les organismes vivants. La toxicité d'un produit chimique dépend de nombreux facteurs : ainsi la voie d'exposition (contact cutané, voie orale ou inhalation), la dose, la fréquence et la durée de l'exposition, la toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme, excrétion), les facteurs biologiques (comme l'âge, une condition pathologique) de l'individu exposé et les propriétés chimiques de la substance toxique doivent être pris en compte lors des essais. On définit deux type de toxicité : 1) la toxicité aigüe qui se manifeste sur une courte durée (24h à 5 jours) souvent par la mortalité des individus exposés au cours d'une exposition unique ; 2) les effets chroniques qui impliquent des expositions de longue durée (au moins 28 jours) avec des doses répétées. Le principal indicateur de la toxicité aigüe est l'estimation de la concentration létale à 50 % (LC₅₀) ou de la dose létale à 50% (DL₅₀) tandis la fécondité, la baisse des taux de croissance ou des changements dans le comportement ou la physiologie de l'organisme sont évalués pour la toxicité chronique (Khabib et al., 2022; Waller & Allen, 2008).

Dans le cas des produits pharmacologiques et phytosanitaires, l'évaluation des risques toxicologiques s'effectue principalement à deux niveaux : dans un premiers temps lors des phases de développement (*drug discovery*), puis après l'autorisation de mise sur le marché, selon des principes de phytopharmacovigilance (Anses, 2023).

La formule "c'est la dose qui fait le poison" résume bien le principe fondamental de la toxicologie selon lequel toutes les substances chimiques peuvent être nocives à partir d'un certain niveau d'exposition. Par conséquent, l'objectif ultime des tests de toxicité est de fournir des données permettant d'établir des concentrations biologiquement sûres pour les substances toxiques et par conséquent de prédire les niveaux d'exposition sans risque.

Le terme "écotoxicologie", quant à lui apparaît pour la première fois en 1969 sous la plume du toxicologue français René Truhaut. L'écotoxicologie est une discipline à l'interface de l'écologie et de la toxicologie, ce qui signifie que les écotoxicologues étudient les polluants et leurs effets sur différents écosystèmes. Ces derniers comprennent les individus, les populations, et leur environnement abiotique (Waller & Allen, 2008). Les objectifs de l'écotoxicologie couvrent à la fois des aspects fondamentaux et appliqués : cette discipline vise à 1) obtenir des données pour l'évaluation des risques et la gestion environnementale ; 2) respecter les exigences légales en matière de développement et de dissémination de nouvelles substances chimiques dans l'environnement ; 3) développer des principes empiriques ou théoriques pour améliorer notre connaissance du comportement et des effets des substances chimiques naturelles ou anthropiques et pour prévoir et évaluer les changements qu'elles provoquent dans les écosystèmes (Migula, 2005). Il existe d'ailleurs, dans certains pays, des établissements publics chargés de l'évaluation et de la prévention des risques environnementaux tels que l'INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) en France et le Centre Ecotox (*Oekotoxzentrum*) en Suisse.

La toxicité sur les mammifères et sur l'environnement (toxicité sur le milieu aquatique (poisson, daphnies), et le devenir de ces substances dans les écosystèmes constituent aujourd'hui un motif sérieux de retrait de substances pharmaceutiques ou agricoles (pesticides) du marché.

1.4 One environmental health/ One health toxicology

La santé des hommes, des animaux et des écosystèmes sont intrinsèquement liés. Le concept d'une seule santé ou « *One health* » n'est pas nouveau; et remonte à au moins deux cents ans, d'abord sous le nom d'une seule médecine et d'un seul monde, puis d'une seule santé, à la suite de l'apparition de la maladie respiratoire aiguë sévère (SRAS) au début de l'année 2003. Il s'agit alors d'un effort de collaboration interdisciplinaire, notamment entre les vétérinaires, les médecins et les écologistes, travaillant au niveau local, national et mondial pour atteindre une santé optimale pour les personnes, les animaux et notre environnement. Ce concept s'est donc historiquement concentré sur les zoonoses, c'est-à-dire les maladies infectieuses (Atlas, 2012).

Le concept « *One environmental health* » (**Figure 3**) est très récent. Il s'agit d'une sous-catégorie du concept *One health* qui se concentre sur les substances chimiques toxiques (Pierce Wise & Pérez, 2018). En effet, on a beaucoup moins porté l'attention aux expositions toxiques chez les animaux, à leur relation avec les maladies humaines associées aux produits chimiques, et à la manière dont le concept *One Health* peut s'appliquer dans ces situations (Buttke, 2011).

Aujourd'hui, dans le cadre de ce concept, on peut citer des études sur les effets de la pollution sur les écosystèmes aquatiques, l'impact des pesticides sur les populations d'abeilles mellifères et d'autres pollinisateurs, et les risques pour la santé associés la consommation d'aliments contaminés par des produits toxiques (Dinis-Oliveira, 2023). En outre, certaines tragédies mettent en lumière le concept d'une seule santé appliqué à la toxicologie. La tragédie de la baie de Minamata (Japon) dans les années 1950, due à l'exposition au mercure, par exemple, a montré comment un polluant industriel peut être bioamplifié dans un écosystème aquatique, depuis les micro-organismes marins jusqu'à l'homme, et comment les poissons flottants empoisonnés et morts, les prédateurs et les charognards auraient dû servir de sentinelles et d'alarme pour cette épidémie de maladie environnementale, avant que ses effets ne soient ressentis par la population humaine. C'est le cas des chats de Minamata, qui au cours des six années précédant l'apparition de l'épidémie de maladie neurologique chez les humains, présentaient déjà un comportement neurologique anormal, se manifestant par de l'ataxie et des convulsions, qui entraînait leur mort (Aronson, 2005). Un autre exemple bien connu concerne le très controversé insecticide organochloré, également POP : le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), qui dès 1946 avait fait l'objet d'une étude rapportant une forte mortalité des oiseaux en milieu agricole et les poissons dans les eaux de surface, mais qui ne sera interdit qu'à partir de 1970. Le DDT est aujourd'hui reconnu pour sa toxicité chez l'homme, et provoquerait entre autre des cancers, est lié à des troubles psychomoteurs, et favoriserait l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Beard, 2006; Jarman & Ballschmiter, 2012). Dans ces deux exemples, les maladies animales apparues bien avant les effets néfastes sur la santé humaine, auraient dû alerter sur l'existence d'une potentielle catastrophe toxicologique, écologique et sanitaire. Ces exemples montrent qu'il existe incontestablement une interdépendance entre les humains et les écosystèmes (Buttke, 2011) et souligne la nécessité de disposer d'outils qui permettrait d'évaluer la toxicité des substances chimiques à la fois sur l'homme mais également sur l'environnement, et notamment en milieu aquatique.

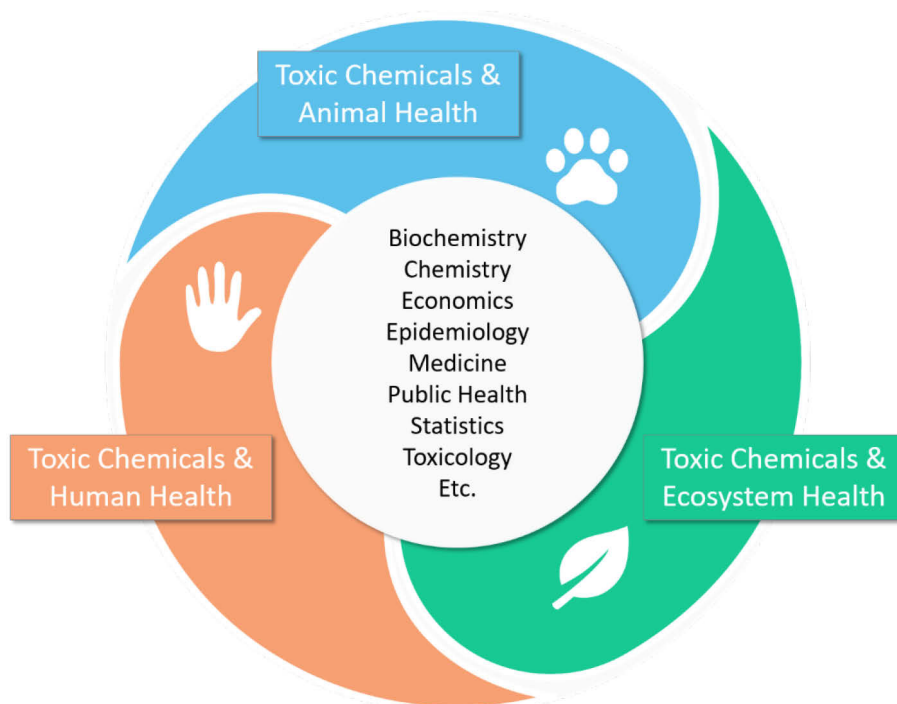


Figure 3: Le concept *One environmental health*, une seule santé environnementale relie la santé humaine, la santé de la faune et la santé des écosystèmes. Figure extraite et adaptée de (Pierce Wise & Pérez, 2018).

2. Modèles d'étude en toxicologie et écotoxicologie

Les essais toxicologiques, qui ont pour but d'évaluer la nocivité des substances chimiques, sont traditionnellement effectués sur des vertébrés, principalement des modèles mammifères à cause de leur proximité évolutive avec l'homme. Cependant, leur usage est de plus en plus critiqué dû au durcissement des règles qui régissent leur utilisation en matière d'éthique, du fait de leur coût élevé, et du caractère faible débit (*low-throughput*) des tests effectués qui ne couvre pas l'ensemble des molécules à tester (Lillicrap et al., 2016). Dans cette partie, nous allons dans un premier temps décrire les modèles animaux vertébrés, autrefois plébiscités en toxicologie. Puis nous allons aborder le changement de paradigme vers des modèles prédictifs dits « haut débit », *in silico* et *in vitro*, encouragés par des programmes intergouvernementaux et le soulèvement de questions éthiques dans l'expérimentation animale. Enfin, nous allons voir comment les limites imposées par ces systèmes ont fait émerger de nouveaux modèles animaux notamment invertébrés qualifiés de « moyen débit » pour évaluer la toxicité d'un grand nombre de molécules.

2.1 Modèles animaux vertébrés

Les tests de toxicité sur les animaux sont largement utilisés dans les industries chimiques et pharmaceutiques mais également dans la recherche, lors de tests non cliniques afin de garantir la sécurité des produits chimiques pour l'homme et pour l'environnement.

2.1.1 Modèles mammifères

Dans le cadre préclinique, par exemple, la toxicité d'un médicament est établie à l'aide de modèles animaux supérieurs tels que les mammifères qui possèdent notamment des gènes homologues à ceux de l'homme (Doke & Dhawale, 2015). L'on se base alors sur la surface corporelle, pharmacocinétique, et considérations physiologiques pour extrapoler les effets observés chez les modèles animaux sur l'humain (**Figure 4**) (Khabib et al., 2022; Nair & Jacob, 2016). Mais les restrictions éthiques ont poussés les chercheurs à se tourner aussi vers d'autres modèles.

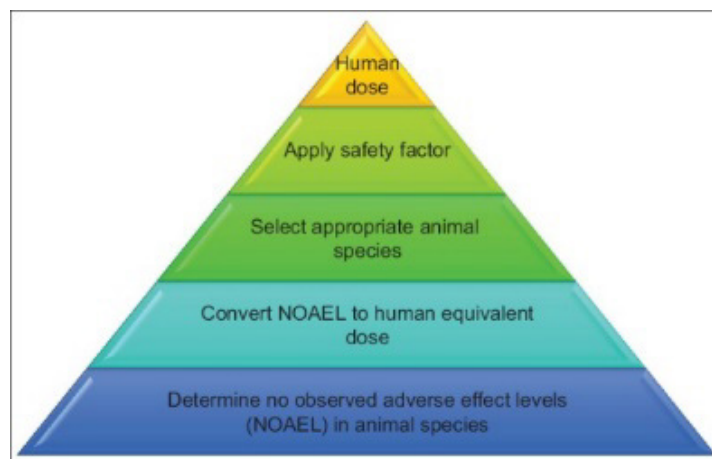


Figure 4: Les cinq étapes de calcul de la dose initiale maximale recommandée dans le cadre des études sur l'homme à partir de données toxicologiques de modèles animaux. La NOAEL, la dose la plus élevée ne provoquant pas d'effets indésirables significatifs, est un indice typique de sécurité obtenu à partir d'expérimentations animales appropriées afin de déterminer une dose de départ sûre. À l'étape 2, la valeur du NOAEL est convertie en dose équivalente pour l'homme (DEH) sur la base du facteur de correction de la surface corporelle (qui dépend du poids de l'animal), en utilisant des facteurs d'échelle appropriés pour les espèces animales. À l'étape 4, la DEH est divisée par un facteur de 10, afin d'accroître la sécurité de la dose initiale administrée à l'homme. Ce facteur de sécurité tient compte des différences de processus physiologiques et biologiques entre l'homme et l'animal. Dans la dernière étape, la valeur obtenue est convertie en dose pharmacologiquement active chez l'homme. *Image tirée de (Nair et al, 2016).*

2.1.2 Poissons

La plupart des poissons utilisés dans les études toxicologiques appartiennent au super-embranchement des *Gnathostomata*, super-classe des *Osteichthyes*, classe des *Actinopterygii*, infra-classe des *Teleostei*, comme le poisson-zèbre (*Danio rerio*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ou le médaka japonais (*Oryzia latipes*).

Au début des poissons juvéniles et adultes étaient utilisés pour évaluer la toxicité aiguë des produits chimiques ainsi que les effets chroniques et sublétaux (survie, croissance, reproduction). L'usage de ces stades a fait l'objet de réglementations éthiques, et a conduit à privilégier les essais toxicologiques aigus et chroniques sur embryons de poissons (Jeffries et al., 2015). En effet, contrairement aux juvéniles et adultes, les embryons de poissons sont considérés dans de nombreuses juridictions comme un stade de vie non protégé (OCDE 236, 2013). Les embryons de poissons ont également le potentiel de devenir des modèles pour les approches AOP (*Adverse Outcome Pathway*) ou chemins menant à des effets néfastes car environ 90 % de leur génome est actif au cours de l'embryogenèse (Lillicrap et al., 2016). Un AOP peut être défini comme « un construit analytique qui vise à décrire une chaîne séquentielle de liens de causalité entre des événements biologiques clés (*Key Event, KE*), depuis un événement initiateur-moléculaire (*Molecular Initiating Event, MIE*) conduisant à un effet indésirable (*Adverse Outcome, AO*) et impliquant plusieurs niveaux d'organisation biologique² (Ankley et al., 2010). Pour l'évaluation de la toxicité chronique, les premiers stades de la vie des poissons (stades embryonnaire à larvaire) (OCDE 210, 2013) sont depuis longtemps reconnus pour leur robustesse dans les études toxicologiques et se sont révélés prédictifs des effets toxiques de substances chimiques dans les tests sur cycle de vie complet (McKim, 1977; Norberg-King, 1989). La plupart des tests de toxicité sur les embryons de poisson ont été réalisés sur le poisson zèbre; cependant, Braunbeck et al. (2005) ont démontré leur applicabilité aux embryons de tête-de-boule (*Pimephale promelas*³) et de médaka. Enfin, le poisson-zèbre semble être un modèle pertinent pour déterminer la toxicité des substances chez l'homme, en effet 70 % des gènes humains ont au moins un orthologue chez le poisson zèbre (Howe et al., 2013).

Malgré la popularité des modèles poissons et notamment du poisson zèbre, les amphibiens constituent également des modèles en écotoxicologie. L'espèce *Xenopus laevis* est la plus utilisée. Les essais réalisés couvrent différents stades de vie. D'abord comme chez les poissons, le test de tératogénèse sur embryon de Xénope est le plus utilisé pour le criblage de molécules, car il a l'avantage d'être rapide (96h) et peu cher nécessitant peu de quantité de composé chimique (Mouche et al., 2017). Ce test est réalisé sur des œufs fécondés, dont on suit l'organogenèse et le développement jusqu'au stade larvaire afin d'évaluer la mortalité et les

² Cette définition très claire des approches APO provient de <https://www.france-exposome.org/toxicologie-predictive>

³ *fathead minnow* en anglais

malformations imputées à l'exposition chimique. Puis, l'essai de métamorphose des amphibiens, réalisés sur des têtards (OCDE 231, 2009) a été mis au point pour identifier des perturbateurs endocriniens, des substances susceptibles d'interférer avec le fonctionnement normal de l'axe thyroïdien. Enfin, l'essai de croissance et de développement des larves d'amphibiens (OCDE 241, 2015) permet d'analyser des indicateurs complets tels que mortalité, le comportement et la croissance (longueur et poids) (Lillicrap et al., 2016).

Dans un but de décryptage plus mécanistique, plusieurs modèles transgéniques de poissons et d'amphibiens axés sur les perturbateurs endocriniens ont été développés en écotoxicologie. Ainsi, deux souches transgéniques de médaka portant le gène de la GFP, sous contrôle de promoteurs *ChgH* et *Spiggin* permettent de visualiser *in vivo* l'activité de l'axe des œstrogènes (Spirhanzlova et al., 2016) et androgénique (Sébillot et al., 2014), respectivement. Et chez les embryons de poisson zèbre, la lignée transgénique *cyp19a1b-GFP*, exprime la GFP sous le contrôle du promoteur *cyp19a1b*, gène exclusivement exprimé dans le cerveau, qui code l'aromatase, une enzyme impliquée dans la production d'œstrogènes et permet d'identifier les perturbateurs de l'axe des œstrogènes (Brion et al., 2012).

Malheureusement, les études conventionnelles sur les poissons et amphibiens en écotoxicologie incluent traditionnellement peu de données mécanistiques sur la toxicité, car elles se focalisent sur les paramètres de survie, de croissance et de reproduction (Lillicrap et al., 2016).

2.2 Réflexion sur le développement de modèles High Throughput Screening (HTS)

2.2.1 REACh, ToxCast et 3R

L'utilisation de mammifères tels que les primates, les rongeurs ou les canidés pour les essais toxicologiques, ont été fortement critiqués et sont devenus une préoccupation pour les comités d'éthique des institutions dans le monde entier. En outre, les tests de toxicité sur des modèles animaux supérieurs sont coûteux -au vu du nombre considérables d'animaux à tester et des grandes quantités de substances utilisées- et laborieux (Zon & Peterson, 2005) ce qui limite la découverte de nouveaux médicaments par exemple, et ne permet pas de couvrir la totalité des molécules pour lesquelles il n'existe pas de données toxicologiques (Khabib et al., 2022).

L'ouvrage de Russell et Burch (1959) sur les principes des techniques expérimentales sans cruauté date maintenant de plus d'un demi-siècle, et est toujours considéré comme le texte fondateur des approches alternatives à l'expérimentation animale. C'est là que l'idée des 3R

(réduire, affiner et remplacer) tient son origine. Ainsi toute étude expérimentale doit envisager de **réduire** le nombre d'animaux utilisés, d'**affiner** (*Refine*) les procédures afin de minimiser la douleur, la souffrance et l'angoisse, et de **remplacer** l'utilisation d'animaux chaque fois que cela est possible. Aujourd'hui, "3R" supplémentaires, s'ajoutent aux premiers, à savoir la reproductibilité, la pertinence écologique (*ecological relevance*) et le respect de la réglementation (Lillicrap et al., 2016). Au cours des quatre dernières décennies, le développement d'approches alternatives basées sur le principe des 3R a été largement motivé par des considérations liées au bien-être des animaux.

Un grand nombre de molécules sont commercialisées et de nouveaux composés arrivent continuellement sur le marché. En 2020, l'étude la plus complète jamais réalisée sur les bases de données publiques de 19 pays, membres ou non de l'OCDE, a identifié plus de 350 000 substances chimiques, individuelles ou en mélange enregistrées, destinées à la production industrielle et à la commercialisation (Z. Wang et al., 2020). Et on estime que la production chimique mondiale ne fera qu'augmenter jusqu'en 2050 (M. P. Wilson & Schwarzman, 2009). Pourtant, au début des années 2000, le constat des institutions de réglementations occidentales est alarmant puisque d'innombrables produits chimiques ont été introduits dans le commerce sans la moindre information toxicologique. Et parmi les nombreux produits chimiques identifiés comme des menaces potentielles pour la santé publique, peu ont été réglementés ou interdits (**Figure 5**), et d'ailleurs plusieurs décennies après les premières études dénonçant leur toxicité comme c'est par exemple le cas pour le Chlorpyrifos (Krimsky, 2017).

Les essais traditionnels, réalisés sur des modèles vertébrés, sont alors jugés inadéquats car trop chers et lents. L'objectif de développer des modèles qui permettraient à la fois le criblage à haut débit de la toxicité des substances chimiques et qui prennent en considération les dilemmes éthiques est alors défini. En Europe, en 2007 et aux Etats-Unis d'Amérique, en 2008, sont lancés les initiatives REACH (*Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals*) et Tox21, respectivement (Hartung, 2011). Ces programmes ont pour but de traiter la question de la sécurité des produits chimiques en développement industriel ou déjà commercialisés, dans le but de protéger la santé humaine et l'environnement. Ils visent à améliorer les performances en analyses toxicologiques, en s'éloignant des modèles mammifères à faible débit (*Low Throughput*) et à coût élevé, pour se tourner vers des systèmes *in vitro* et *in silico* qui se prêtent à un criblage à faible coût et à haut débit (*High Throughput Screening*), centré sur les effets aux niveaux moléculaires et cellulaires, et qui permettrait de prioriser les substances en fonction de leur profil toxicologique (Hagstrom et al., 2016; Judson et al., 2010).

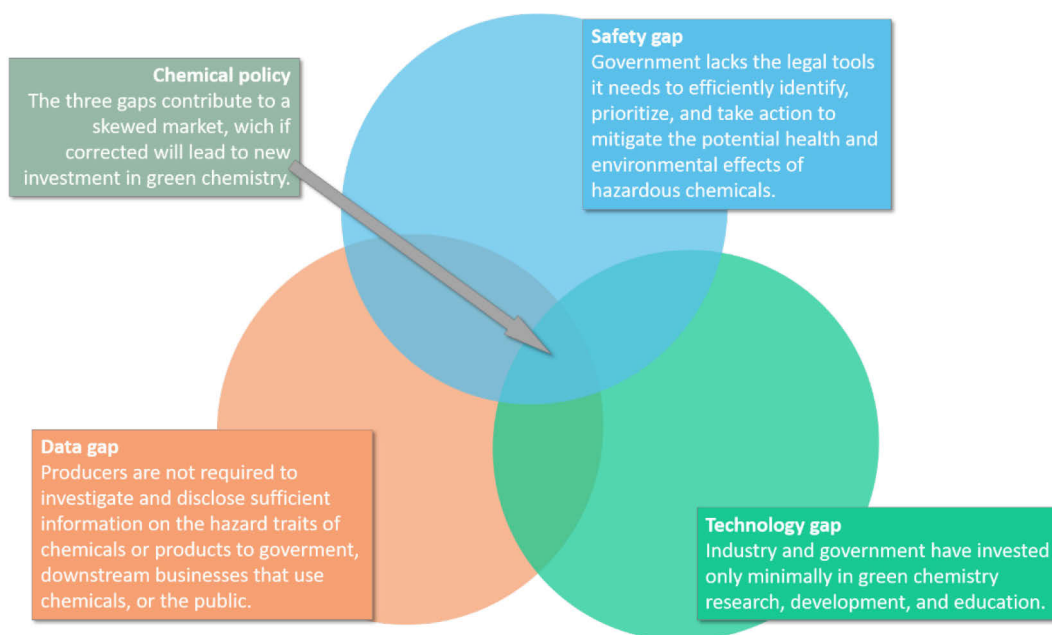


Figure 5: Les trois lacunes des politiques gouvernementales en matière de substances chimiques. Manque de données: Les fabricants ne sont pas tenus de collecter et de divulguer suffisamment d'informations sur les caractéristiques de danger des produits chimiques aux autorités, au public ou aux entreprises qui utilisent ces produits. Lacunes en matière de sécurité : Les pouvoirs publics ne disposent pas des outils juridiques nécessaires pour identifier efficacement les effets potentiels des substances chimiques dangereuses sur la santé et l'environnement, établir des priorités et prendre des mesures pour les limiter. Lacune technologique : L'industrie et les pouvoirs publics n'ont investi que de manière marginale dans la recherche, le développement et l'éducation en matière de chimie verte. *Image reproduite de (Wilson & Schwarzman, 2009)*

2.2.2 Modèles de criblage à haut débit: *in vitro* et *in silico*

L'utilisation de méthodes *in silico* se limite surtout aux industries chimique et pharmaceutique, dans le cadre du développement de médicaments, au cours de l'étape de « *screening* », ou de criblage de banque de molécules. Les modèles les plus connus, appelés (Q) SAR -(*Quantitative*) *Structure-Activity relationships* reposent sur l'analyse de bases de données regroupant les résultats d'études toxicologiques réalisées *in-vivo* et *in-vitro* afin d'établir un lien entre toxicité et informations structurales de la molécule. Cela suppose que des substances analogues auraient des activités biologiques et des modes d'action similaires. Ces méthodes ne jouent alors qu'un rôle d'orientation pour l'évaluation de produits pour lesquels aucune donnée n'est disponible. Grâce aux modèles QSAR, on peut prédire la persistance, la bioaccumulation et la toxicité, les potentiels cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques de nouvelles molécules. Ils sont cependant aujourd'hui remplacés par des systèmes basés sur le mode d'action, qui exploitent la littérature existante, et qui seraient plus fiables (Claude et al., 2009). Des modèles accessibles au plus grand public sont aussi en cours de développement, c'est le cas de FORUM qui a été élaboré à partir de bases de données publiques et qui repose

sur une représentation sémantique des relations entre les substances chimiques et les maladies (Delmas et al., 2021).

Les méthodes *in silico* ont cependant leurs limites puisqu'elles reposent sur la quantité et la qualité des bases de données disponibles, et sont affectées par les déséquilibres thématiques car les sujets les plus en vogue reçoivent plus de financement et seront donc surreprésentées (Claude et al., 2009). En outre, la qualité des prédictions nécessitent de bien comprendre le mode d'action d'une molécule pour être certain que le bon modèle QSAR est utilisé (Lillicrap et al., 2016).

La disponibilité de lignées cellulaires de mammifères cultivables en continu en laboratoire a commencé il y a environ 50 ans. Les tests *in vitro* sont basés sur des cellules primaires, des lignées cellulaires immortalisées, et dérivées du cancer, des cellules souches ou de tissus reconstitués. En écotoxicologie, des lignées cellulaires de poissons ont été utilisées pour étudier les modes d'action des contaminants environnementaux (Dayeh et al., 2003). C'est le cas de la lignée cellulaire RTgill-W1 de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), qui a fait l'objet d'une ligne directrice de l'OCDE (OCDE 249, 2021), et qui par la quantification de la viabilité cellulaire par la mesure par fluorescence de l'activité métabolique et de l'intégrité des membranes cellulaires et lysosomales permettrait de prédire la toxicité aiguë de substances chimiques sur les poissons (Fischer et al., 2019). Ainsi les effets des substances chimiques sur des processus tels que le métabolisme des xénobiotiques, les lésions de l'ADN, le transport membranaire et le stress oxydatif, la phagocytose et la synthèse de protéines, ont tous été évalués à l'aide de lignées cellulaires de poissons (Lillicrap et al., 2016). Cependant, l'environnement intrinsèquement artificiel et le manque de complexité biologique dans les criblages *in vitro* rend l'extrapolation de la toxicité cellulaire à l'organisme (Knight et al., 2009).

Les modèles *in silico* et *in vitro* ont du potentiel mais ont clairement des limites. Et sept ans après de déploiement de la réglementation REACh, il a été constaté (UBA, 2015) que sur 1814 dossiers d'enregistrement examinés soumis à l'Agence européenne des produits chimiques, 58 % des dossiers étaient "non conformes" et les 42 % restants n'étaient pas concluants, en raison de la mauvaise qualité des données toxicologiques (EEA, 2017). L'initiative Tox21 n'a pas obtenu de meilleures statistiques, et lance dans un second temps le programme ToxCast, qui encourage le développement de modèles animaux (*in vivo*) dans un contexte de criblage à moyen débit pour compléter les essais HTS. Les essais sur modèles animaux alternatifs pourraient alors permettre de classer rapidement les composés par ordre de

priorité en vue d'autres essais ciblés sur des modèles animaux traditionnels et de faciliter la prédiction de la toxicité potentielle chez les animaux (F. S. Collins et al., 2008). Des caractéristiques telles qu'une petite taille, un faible coût, la facilité d'élevage et d'entretien, un développement rapide et la facilité d'administration de produits chimiques sont alors établis. Le développement d'organismes modèles tels que le poisson-zèbre, déjà évoqué en amont, mais aussi des organismes invertébrés tels que le nématode *Caenorhabditis elegans* ont émergé de cette initiative (Boyd et al., 2016; Strange, 2007).

2.3 Emergence des modèles invertébrés

Les invertébrés représentent plus de 90 % de toutes les espèces animales et sont beaucoup plus abondants que les vertébrés. Ils sont présents dans quasiment tous les écosystèmes, des grands fonds océaniques, aux sols et autres zones terrestres, en passant par les eaux de surface, y compris dans ceux où les conditions sont les plus difficiles pour la vie biologique. Ils jouent souvent un rôle clé dans les différents niveaux de la chaîne alimentaire, et participent à la bioamplification ascendante des produits chimiques dans les réseaux trophiques (Migula, 2005). Les modèles animaux invertébrés sont idéaux pour le criblage à moyen débit (*Medium Throughput Screening*) car ils ne posent pas de dilemme éthique, ont un cycle de vie assez court, sont souvent de petite taille, faciles à entretenir et se prêtent à l'automatisation, ce qui permet d'augmenter le nombre de criblages à moindre coût. En outre, comme de nombreux gènes et voies principales sont conservés entre ces organismes plus simples et les humains, les études moléculaires peuvent permettre d'obtenir un aperçu mécaniste de la toxicité des composés (Hagstrom et al., 2016; Lein et al., 2005).

D'ailleurs, une méta-étude a suggéré que seulement 43% des effets toxiques chez l'humain étaient correctement prédits à partir d'un seul modèle de rongeur, et 63 % à partir d'autres modèles animaux (Olson et al., 2000). Un constat qui montre l'importance de développer des modèles animaux alternatifs, non mammifères incluant les invertébrés.

2.3.1 Modèles invertébrés classiques

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est l'un des organismes modèles les plus couramment utilisés en sciences. Cet organisme hermaphrodite mesure environ 1 mm de long, a un temps de génération très court avec cycle de vie complet environ 2 à 3 semaines et est facile à maintenir en laboratoire. *C.elegans* est transparent, se prête aux études génétiques et présente une complexité cellulaire simple (Barr, 2003; Strange, 2007). En tant que modèle, il a été utilisé pour étudier divers troubles neurologiques tels que les maladies de Huntington, de Parkinson, d'Alzheimer, divers troubles immunitaires ainsi que le cancer et le diabète et a

permis de développer et de tester des agents thérapeutiques pour le traitement de ces maladies (revue dans (Doke & Dhawale, 2015)). Il est également utilisé en toxicologie. Les essais réalisés sur *C. elegans* analysent l'effet de substances toxiques telles que les pesticides sur la reproduction, la croissance larvaire, l'alimentation, la mobilité, la mortalité, et l'expression des gènes. Il a été démontré que les valeurs de DL_{50} obtenues avec *C. elegans* sont aussi prédictives de la toxicité aiguë chez les mammifères que les celles déterminées chez le rat et la souris. En outre, de nombreux cas de conservation du mode d'action des substances toxiques ont été observés entre *C. elegans* et les mammifères (Hunt, 2017).

Drosophila melanogaster, communément appelée drosophile ou mouche du vinaigre, est aussi l'un des modèles invertébrés phares de la recherche. Son génome a été entièrement séquencé et annoté, et on estime que près de 75 % des gènes impliqués dans les maladies humaines auraient un homologue fonctionnel chez la mouche (Gilbert, 2008; Reiter et al., 2001). Dans les essais toxicologiques, leurs réponses comportementales à de nombreuses substances chimiques agissant sur le système nerveux central (SNC) sont similaires à celles observées chez les mammifères. Le système nerveux des drosophiles comprend 100 000 neurones et gère divers comportements complexes tels que les rythmes circadiens, l'apprentissage et la mémoire, l'alimentation, le sommeil. De nombreux outils moléculaires et génétiques ont été développés. Ainsi, la drosophile a servi de modèle unique et sensible pour l'étude de la génétique et des maladies neurodégénératives humaines (Beckingham et al., 2005; Doke & Dhawale, 2015).

2.3.2 Modèles invertébrés aquatiques

De nombreux modèles d'invertébrés d'eau douce, tels que les annélides, les arthropodes et les bivalves (Koehl-Divo et al., 2018) ont été développés pour évaluer la toxicité et l'impact écologique des substances chimiques présentes dans l'environnement. Dans le réseau trophique, nombre de ces animaux aquatiques sont des décomposeurs ou des consommateurs primaires qui se nourrissent de débris organiques ou d'algues (Wu & Li, 2018).

Les Artémies, petits crustacés marins, sont utilisées en toxicologie, notamment les espèces *Artemia franciscana* et *Artemia salina* (Ruebhart et al., 2008). Elles sont principalement utilisées pour tester la toxicité des extraits de plantes (Aigbe et al., 2019; Sahgal et al., 2010). En écotoxicologie, elles ont permis de mettre en évidence la toxicité des polluants de l'industrie et la toxicité des nanomatériaux dans les environnements marins (Castro et al., 2018; Johari et al., 2018). Les principaux indicateurs étudiés chez les artémies sont la létalité, le taux d'éclosion, le comportement (altération de la vitesse de nage, et 'immobilisation) la

morphologie. Ces filtreurs ont de fortes interactions avec l'environnement aquatique et sont considérées comme un modèle d'organisme marin approprié en écotoxicologie. Cependant, sur les plans phylogénétique et métabolique, les artémies sont considérablement éloignées de l'homme (Freires et al., 2017). Aussi, leur forte sensibilité à des facteurs d'élevage tel que la densité de culture et la salinité pouvant affecter leur développement et la fiabilité des résultats des essais toxicologiques (Neumeyer et al., 2015).

Toujours dans les modèles invertébrés marins, les copépodes, ont été largement utilisés pour évaluer les contaminants aquatiques en écotoxicologie. Ils permettent d'évaluer la toxicité aiguë, chronique et sub-chronique de substances individuelles ou mélangées à travers des effets létaux et sublétaux. Les indicateurs de la toxicité aiguë sont l'immobilisation des nauplius, le succès d'éclosion, les changements dans les marqueurs biochimiques et l'expression des gènes ont été également étudiés (Kusk & Wollenberger, 2007). Pour les tests de toxicité chronique, les critères d'évaluation s'articulent autour de la survie des premiers stades de vie et la mortalité, ainsi que l'analyse morphologique, le ratio de développement larvaire, la longueur du corps et le ratio des sexes (OCDE 79, 2007). Comme les artémies, les copépodes sont sensibles aux variations de facteurs liés à leur environnement tels que l'accès à la nourriture, la température et la salinité : ainsi il a été constaté qu'une salinité élevée pouvait réduire la toxicité du cuivre pour les pupilles *Acartia sinjiensis* (Gissi et al., 2013). Par ailleurs, la toxicité des polluants est différente pour les crustacés d'eau douce et les copépodes marins puisqu'il a été montré que le copépode *Tigriopus japonicus* était moins sensible au cuivre que *Daphnia magna*, avec une EC₅₀ de 0,743 mg/L et 0,022 mg/L respectivement pour la toxicité aiguë (Kang et al., 2011).

La daphnie, crustacé planctonique d'eau douce est reconnue pour sa sensibilité aux polluants aquatiques, et est un modèle invertébré plébiscité en écotoxicologie aquatique. Cet herbivore est un excellent représentant des zooplanctons primaires d'eau douce, et peut affecter les conditions de populations animales de réseaux trophiques supérieurs, et est lors utilisé pour trouver les causes potentielles d'intoxication aiguës chez les mammifères (Martins et al., 2007). Pour étudier la toxicité de polluants, comme les microplastiques, les paramètres tels que la mortalité, la croissance, la fécondité, l'âge de maturation et la taille ont été étudiés chez les juvéniles. Chez les adultes, la reproduction est un critère d'évaluation sensible pour *D. magna*, en particulier si elle est exposée à des substances toxiques depuis l'âge juvénile (Eltemsah & Bøhn, 2019). En effet, *D. magna* par exemple, peut se reproduire de manière asexuée (parthénogénétique) et sexuée et peut croître rapidement dans les 12 jours qui suivent sa naissance, passant d'environ 1mm à 3mm (Khabib et al., 2022). Il existe de nombreuses lignes

directrices standard pour la réalisation d'essais de toxicité avec *D. magna* mais qui prévoient toutefois des méthodologies et des conditions différentes, prêtant à confusion. Aussi, bien que les études toxicologiques aient toujours été réalisées sur cette même espèce, plusieurs souches ont été utilisées et peuvent ainsi répondre différemment de par leur origine géographique, historiques et leurs caractéristiques (Persoone et al., 2009).

La description des modèles d'études en toxicologie et écotoxicologie (**Figure 6**) au sein de cette partie nous permet de souligner l'importance des considérations éthiques sur l'élaboration de modèles, mais surtout la possibilité de réaliser des études toxicologiques pertinentes pour l'homme et pour l'environnement sur des modèles *in vivo*, notamment invertébrés. Les paramètres évalués, les sensibilités aux substances chimiques, et les homologues avec l'homme diffèrent selon les espèces modèles.

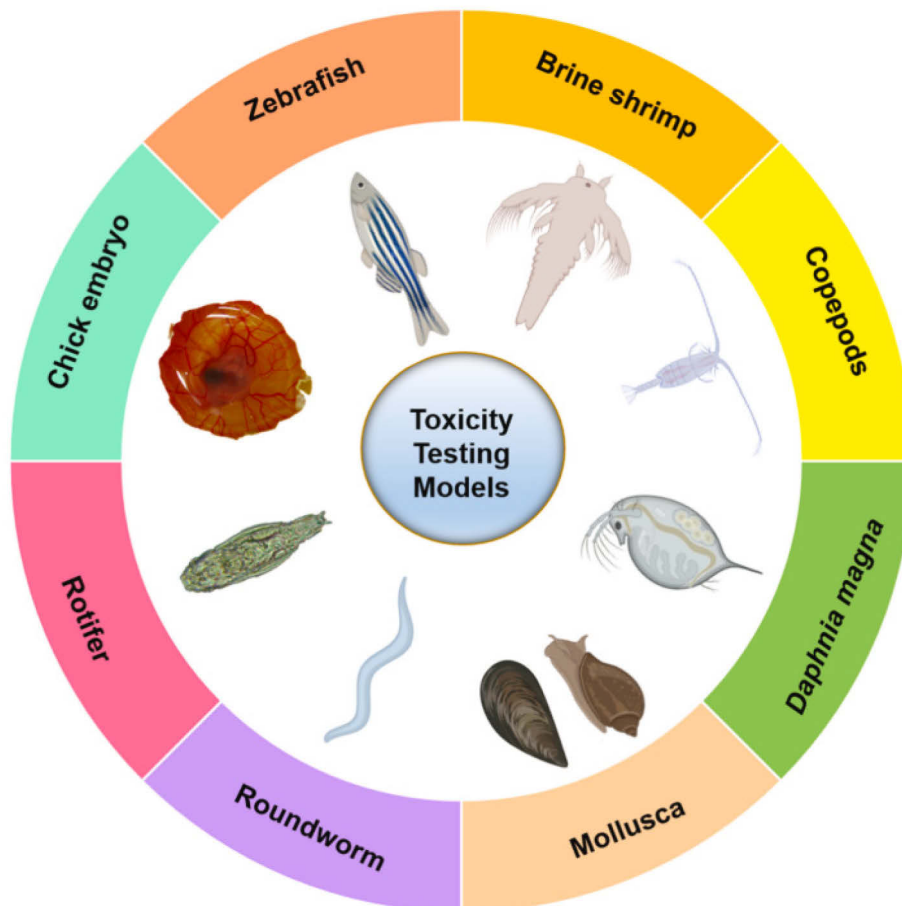


Figure 6: Modèles animaux alternatifs utilisés en toxicologie et écotoxicologie. Le choix d'espèces non mammifères comme modèles prédictifs pour les essais en toxicologie et en écotoxicologie, y compris les embryons d'invertébrés et de vertébrés. *Image tirée de (Khabib et al., 2022)*

3. La planaire d'eau douce

Comme vu précédemment, les invertébrés sont aujourd'hui plébiscités pour les études en Toxicologie. En plus des modèles énoncés précédemment, les planaires (**Figure 7**), plus connues pour leurs capacités régénératrices, sont également utilisées comme modèles d'études dans plusieurs domaines, tels que la pharmacologie, l'écotoxicologie, ou encore l'étude des cancers. L'usage des planaires présente de nombreux avantages. Leur maintien en laboratoire est facile et peu onéreux, et surtout, l'essor de leur utilisation a permis le développement de nombreux outils, aussi bien moléculaires, cellulaires que comportementaux. Dans cette partie, je présenterai la planaire d'eau douce qui est le modèle animal qui fait l'objet de cette thèse. Dans un premier temps, les caractéristiques générales (systématique, répartition géographique, caractéristiques morphologiques) de la planaire seront exposées. Puis ses capacités régénératives, dont a découlé tout un domaine d'étude seront évoquées. Ensuite, leur système nerveux, essentiellement mis au jour grâce à la neuropharmacologie et à des techniques d'immunocytochimie sera décrit. Enfin, l'usage des planaires pour l'évaluation de la toxicité des composés chimiques, et des méthodes actuellement disponibles pour mener ces études seront détaillés.

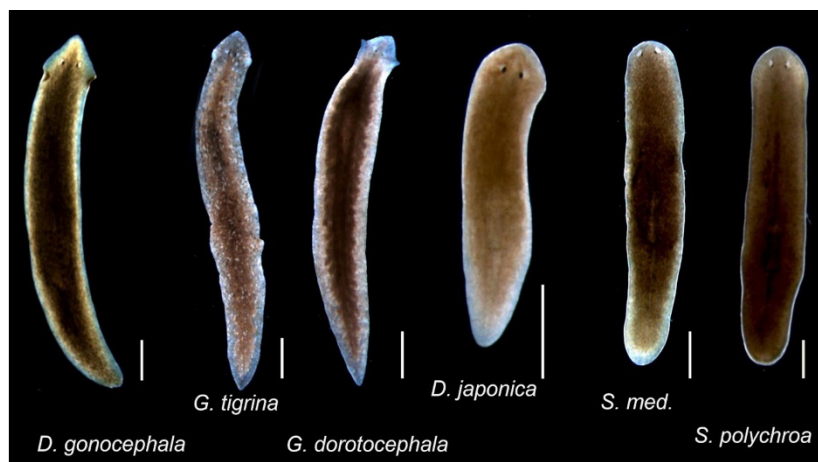


Figure 7: Photos d'espèces de planaires communément utilisées en laboratoire. De gauche à droite, *Dugesia gonocephala*, *Girardia tigrina*, *Girardia dorocephala*, *Dugesia japonica* (échelle : 1 mm), *Schmidtea mediterranea* et *Schmidtea polychroa*. Image tirée de (Reho et al, 2022)

3.1 Systématique des planaires

Les planaires sont des invertébrés. « Planaire » vient du latin *planus* (plat) et fait référence aux membres non parasitaires (classe des Turbellariés) de l'ordre des Tricladés (**Figure 8.B**). Ces derniers sont issus du phylum des Plathelminthes (du grec ancien *platūs* : plat, et *hélmins* : ver) (**Figure 8.A**), qui font partie du superphylum des Spiraliés qui comprend par exemple les sangsues, les vers de terre et les escargots (Noreña et al., 2015; Sluys & Riutort,

2018). Il existe des centaines, voire des milliers d'espèces de planaires, qui vivent dans des habitats marins, terrestres, ou d'eau douce, se répartissant dans les sous-ordres taxonomiques suivants: Maricola, Cavernicola et Continenticola⁴. Cependant, les espèces les plus communément utilisées comme organisme modèle pour la recherche sont les planaires d'eau douce de la famille des Dugesiidae (**Figure 8.C**) *Schmidtea mediterranea* et *Dugesia japonica* (Sluys & Riutort, 2018; Vila-Farré & Rink, 2018). La systématique de ces deux espèces est détaillée dans le **tableau 1**.

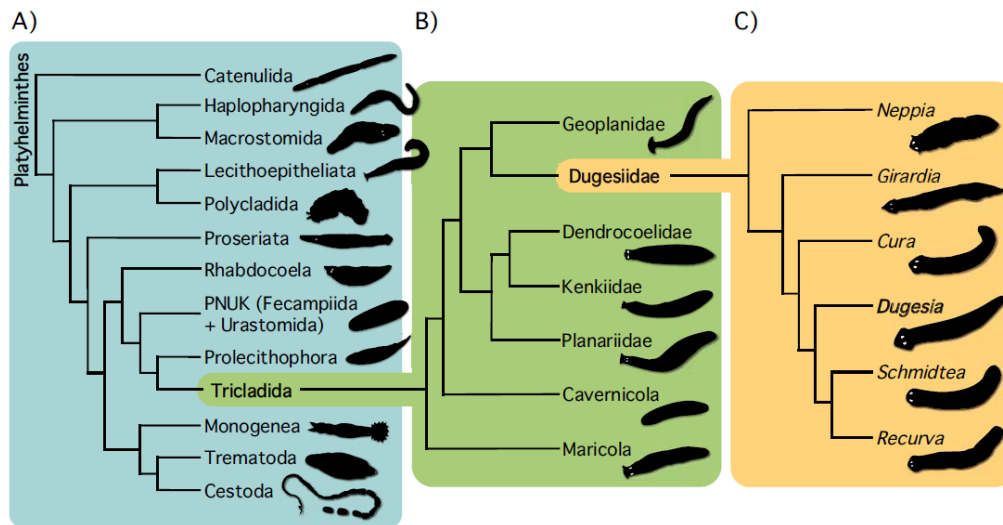


Figure 8: Phylogénie des planaires sur différents niveaux. A) phylogénie du phylum des Plathelminthes ; B) phylogénie de l'ordre des Triclades ; C) : phylogénie de la famille des Dugesiidae. Image tirée du manuscrit de thèse de Solà Vasquez, (2014).

Tableau 1: Systématique des espèces modèles *Schmidtea mediterranea* et *Dugesia japonica*. Selon (Sluys & Riutort, 2018)

| Règne | Animal |
|---------------|---|
| Embranchement | Plathelminthes |
| Classe | Turbellariés |
| Ordre | Triclades |
| Sous-ordre | Continenticola |
| Famille | Dugesiidae |
| Genre | Schmidtea/Dugesia |
| Espèce | <i>Schmidtea mediterranea</i> , <i>Dugesia japonica</i> |

⁴ Des études phylogénétiques basées sur les gènes mitochondriaux 16S et les gènes nucléaires 18S et 28S classe les planaires terrestres (Geoplanidae) et les planaires d'eau douce (Dugesidae) dans le taxon des Continenticola (Sluys & Riutort, 2018).

3.2 Caractéristiques morphologiques

Une planaire présente, en apparence, une morphologie assez simple, pourtant, son corps possède des caractéristiques biologiques uniques. La taille des planaires d'eau douce varie généralement de quelques millimètres à 10 voire 30 mm (Sluys & Riutort, 2018). Ces organismes ont une importante plasticité développementale, ainsi leur taille peut croître et décroître en fonction de leur état nutritionnel : lorsque la nourriture est abondante, les planaires grandissent jusqu'à atteindre une taille maximale. Lors des périodes de famine prolongée, elles peuvent rétrécir jusqu'à ~1 mm (Newmark & Alvarado, 2002).

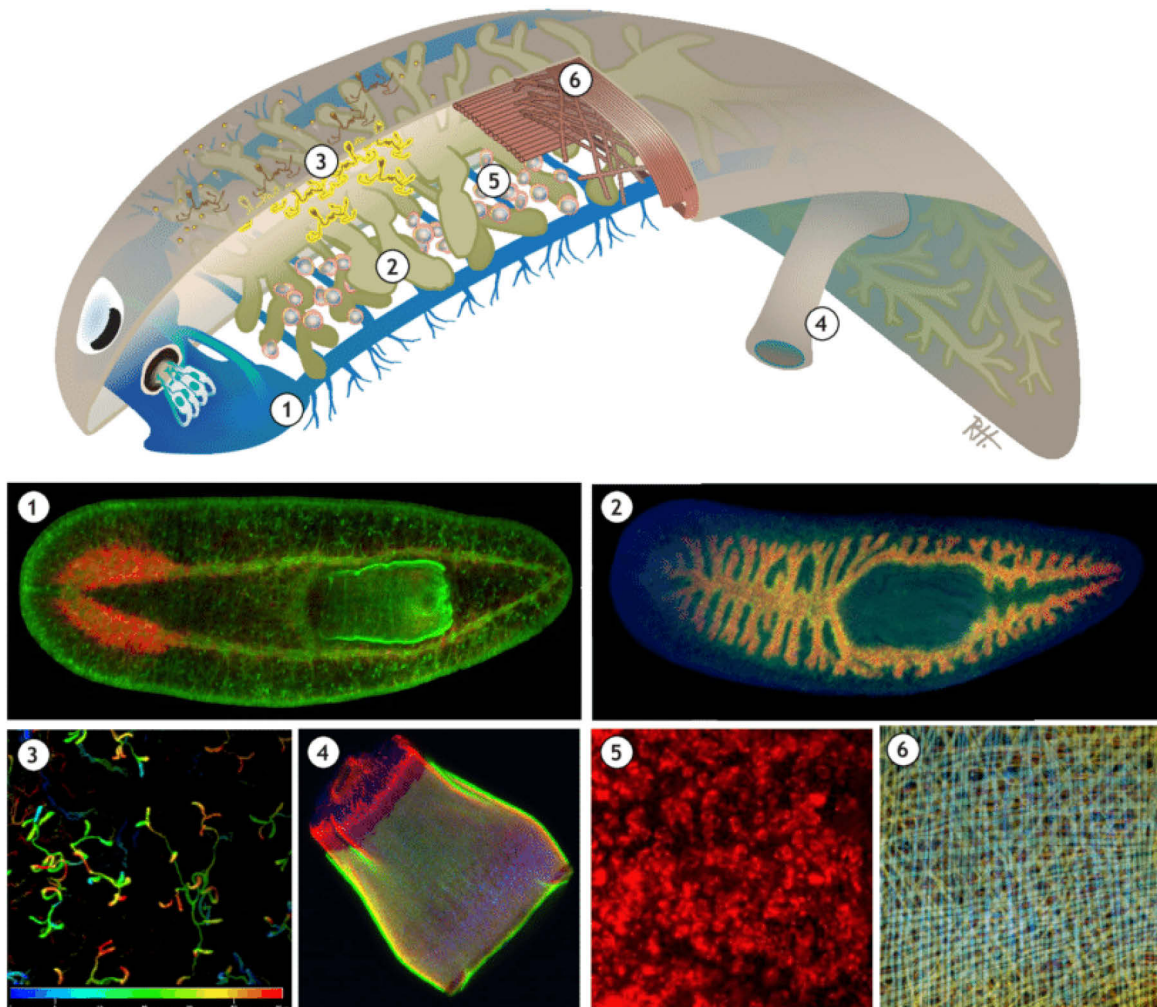


Figure 9: Anatomie de la planaire. Représentation schématisée (en haut) et images au microscope (en bas) des principaux organes de la planaire. (1) Système nerveux (rouge, hybridation *in situ* *Smed-pc2*), Système Nerveux Central et pharynx (tous deux en verts, immunomarquage α -tubuline). (2) Système digestif (rouge, *Smed-porcupine-A*; vert, *Smed-sufu*, hybridation *in situ*). Le marquage des noyaux (bleu, DAPI) révèle la silhouette de l'animal. (3) Protonéphridies. Projection confocale maximale codée en profondeur montrant des unités individuelles de protonéphridies (immunomarquage *acetylated-tubulin*). (4) Pharynx (rouge, coloration à la phalloïdine de l'actine musculaire ; vert, immunomarquage de la tubuline des cils ; bleu, contre-coloration nucléaire). (5) Néoblastes (rouge, projection confocale maximale de l'hybridation *in situ* *piwi-1* dans la zone de la queue). (6) Paroi musculaire (projection confocale maximale codée en profondeur de l'immunomarquage *6G10*. Représentation tirée de (Ivankovic et al, 2019)

Ces animaux triploblastiques possèdent une anatomie interne complexe. En effet, les planaires ont un système digestif très ramifié (**Figure 9.2**), comprenant trois branches principales : une antérieure et deux postérieures (Forsthoefel et al., 2011) ce qui a d'ailleurs donné lieu à la désignation Triclade (tri: trois ; clade: branches) (Noreña et al., 2015; Sluys & Riutort, 2018). Sur la face ventrale, leur système digestif est relié au pharynx (**Figure 9.4**), un tube musculaire très innervé, rétractable et dévaginable, qu'elles utilisent à la fois comme « bouche » pour capturer les aliments, et « anus » pour éliminer leurs excréments. Leur système excréteur est constitué de protonéphridies, des cellules ciliées⁵ reliées par des tubules, qui comme chez les vertébrés, filtrent puis réabsorbent les substances chimiques contenues dans les liquides organiques (Thi-Kim Vu et al., 2015), et assurent l'osmorégulation. Les néphridiopores s'ouvrent sur les faces dorsale et ventrale de l'animal (**Figure 9.3**).

Les planaires étant dépourvues de système respiratoire et circulatoire, l'oxygène pénètre par diffusion à travers l'épiderme (Sluys & Riutort, 2018).

La paroi musculaire du corps la planaire est formée de fibres musculaires longitudinales, diagonales et circulaires (**Figure 9.6**). L'épiderme est monostratifié et contient en position ventrale, des cellules ciliées. Des glandes sous-épithéliales sécrètent du mucus utile à la locomotion, la protection, la prédation et l'adhésion à des surfaces.

La locomotion des planaires repose sur le battement des cils ventraux dans une couche de mucus sécrétée, un mouvement bien caractérisé appelé glissement (*Gliding* en anglais) (Sugimoto, 2010) au cours duquel les cils ventraux battent de façon synchronisée, donnant lieu à des ondes métachrones (Rompolas et al., 2010). Lorsqu'elles glissent, le corps des planaires est parfaitement allongé (Cochet-Escartin et al., 2015).

3.3 Mode de reproduction

Les planaires présentent différents modes de reproduction (sexuée, asexuée ou mixte) en fonction de l'espèce (Stocchino & Manconi, 2013). En effet, certaines espèces de planaires peuvent alterner les modes sexuées et asexuées en fonction des saisons, et d'autres utilisent exclusivement un mode de reproduction. Par exemple, *S. mediterranea* comprend des souches sexuées et asexuées, facilement distinguables par une translocation chromosomique qui n'est présente que chez les asexuées (Baguña et al., 1999). La souche sexuée est hermaphrodite et se reproduit par fécondation croisée, ce qui entraîne le dépôt de "cocons" (capsules d'œufs poly-

⁵ Egalement appelées cellules flammes

embryonnés, **Figure 10.B**) qui se transforment en juvéniles. L'appareil reproducteur de cette souche comprend deux ovaires situés en position antéro-ventrale, de nombreux testicules folliculaires situés sur deux lignes dorso-latérales le long du corps de la planaire et un appareil copulatoire (**Figure 10.A**). La souche asexuée se reproduit uniquement par fission transversale. Dans ce mode de reproduction, la queue adhère fortement au substrat tandis que le ver s'étire, s'allonge et s'amincit, la partie antérieure se détache, et l'individu est finalement divisé en deux morceaux. Chaque fragment régénère alors la partie manquante donnant naissance à deux planaires, qui sont génétiquement des clones (Felix et al., 2019; Sluys & Riutort, 2018). Le déclenchement de la fission transversale dépend de plusieurs facteurs. Elle est stimulée dans des conditions de faible densité de population et inhibée lors de forte densité, ce contrôle social serait médié par les ganglions céphaliques des planaires qui produiraient des signaux inhibiteurs de la fission (Best et al., 1969). Aussi la fission est favorisée par des températures plus élevées, chez les individus de grande taille et se produit principalement dans l'obscurité (Morita & Best, 1984; Newmark & Alvarado, 2002).

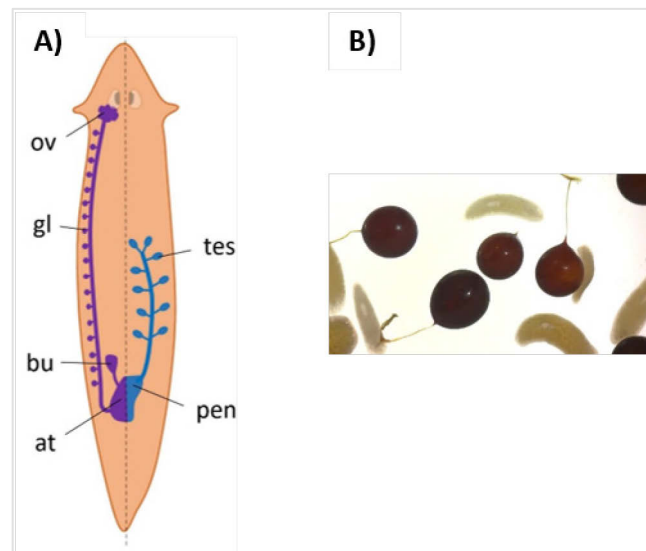


Figure 10: La reproduction asexuée chez la planaire. A) L'appareil reproducteur femelle est représenté à gauche et le mâle à droite, mais les deux sont présents de manière symétrique. ov, ovaire ; gl, glandes vitellines ; bu, bourse copulatrice ; at, atrium génital ; tes, testicule ; pen, pénis ; B) capsules d'œufs produit par les planaires, ici, les « cocons » font entre 3-5mm. Image A tirée de (Reho et al, 2022)

3.4 Ecologie des planaires d'eau douce

De manière générale, les planaires occupent des eaux non polluées (Noreña et al., 2015; Wu & Li, 2018), dans lesquelles les températures varient entre 4 et 25°C. On peut ainsi typiquement les retrouver dans les rivières, ruisseaux, étangs et lacs, et dans une moindre mesure dans des sources, grottes, étangs artificiels et canaux d'irrigation, voire dans des eaux

temporaires comme les flaques d'eau et les fossés remplis d'eau de pluie (Gamo & Noreña-Janssen, 1998; Vila-Farré & Rink, 2018). Ce sont des organismes lucifuges⁶ qui s'abritent généralement sous les rochers ou les troncs tombés (Noreña et al., 2015).

Dans son milieu naturel, la planaire est considérée comme un prédateur secondaire. En effet, ce sont des carnivores qui se nourrissent de divers petits invertébrés, tels que des protozoaires, des rotifères, des larves d'insectes, des moustiques, de petits crustacés, des escargots et de petits annélides. Ils peuvent passer de longues périodes sans nourriture (Knakiewicz, 2014; Reynoldson & Pearce, 2009). La planaire est aussi opportunément un charognard, qui se nourrit de proies blessées ou récemment décédées (Torre & Ghigo, 2015).

La planaire a peu de prédateurs. Les nymphes de libellules et de demoiselles, certains poissons et les tritons adultes et larvaires sont connus pour les consommer. Les nymphes de plécoptères et les larves de trichoptères sont également connues pour les prédateur (Reynoldson & Pearce, 2009; Wright, 1974). Des cas de cannibalisme et d'alimentation d'une espèce de planaire sur l'autre ont déjà été observées (Ball & Reynoldson, 1981 ; British planarians).

3.5 Répartition géographique

Les informations relatives à la répartition des espèces ne reposent souvent que sur un seul enregistrement géographique ou, au mieux, quelques points de données. Sur la base des informations disponibles, il a été établi que les planaires colonisent les milieux d'eau douce du monde entier, à l'exception de l'Antarctique et de quelques îles. Ces organismes sont aujourd'hui étudiés dans des laboratoires du monde entier, et sans surprise, les chercheurs utilisent souvent des espèces natives de leur région, plus facile à acquérir. Cette dépendance géographique permet effectivement de constater leur distribution mondiale (Wu & Li, 2018).

Sur les trois grandes familles de planaires d'eau douce, les Dugesidae sont cosmopolites tandis que les Planariidae et les Dendrocoelidae ont essentiellement une répartition holarctique⁷ (**Figure 11.A**). Le genre bien connu *Dugesia* étend son aire de répartition à une grande partie de l'Ancien Monde, y compris les îles de la région indo-malaise⁸, et le nord-est de l'Australie (**Figure 11.B**) (Sluys & Riutort, 2018).

⁶ Se dit d'un organisme qui fuit naturellement la lumière

⁷ Régions terrestres au nord du tropique du Cancer

⁸ Zone biogéographique qui s'étend du Pakistan à l'ouest, au sud et l'est de la Chine à travers le sous-continent indien, et à l'Indonésie (Java, Bornéo et Bali) jusqu'au Philippines.

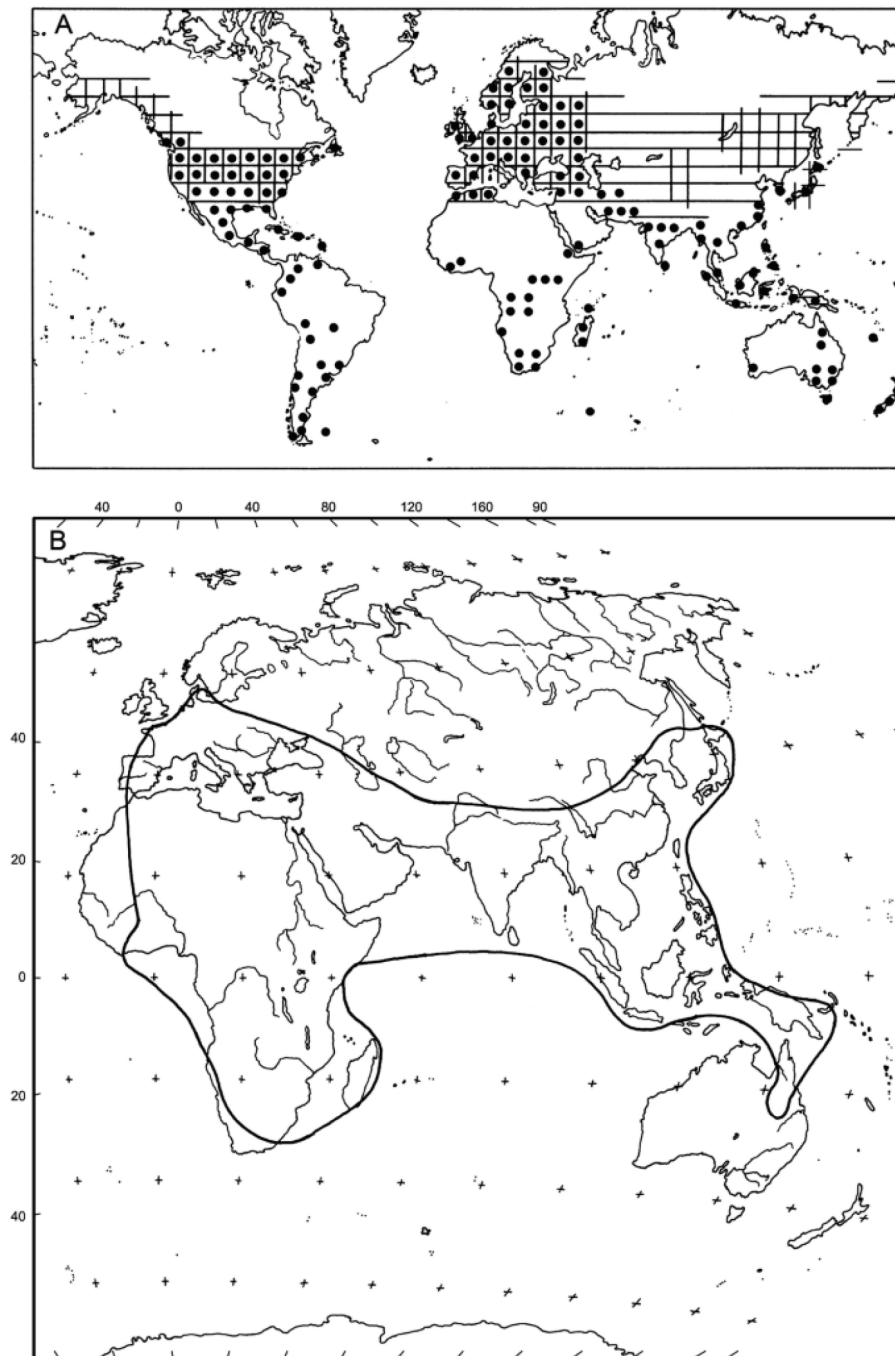


Figure 11: Répartition géographique des planaires d'eau douce. (A) Répartition mondiale des familles d'eau douce DugesIIDae (points noirs), Planariidae (hachures croisées), et Dendrocoelidae (hachures verticales) ; (B) Aire de répartition du genre *Dugesia*. Figure tirée de (Sluys & Ruitort, 2018)

Certaines espèces de planaires ont une distribution transocéanique, c'est-à-dire qu'on les retrouve sur plusieurs continents. Il s'agit pourtant d'animaux qui se déplacent lentement et dont la résistance à la salinité est faible, ce qui rend improbable une telle dispersion (Knakiewicz, 2014). Les cas connus de distribution transocéanique de planaires résultent donc d'une introduction par l'homme. Un exemple bien connu concerne l'espèce *Girardia tigrina* (Girard, 1850), originaire d'Amérique du Nord qui a été introduite par des aquariophiles en

Europe, au Japon et en Australie. Il y a également le cas l'espèce européenne *Schmidtea polychroa* (Schmidt, 1861) dont la présence a été signalée au Canada, mais aussi *Girardia dorocephala* (Woodworth, 1897), originaire d'Amérique du Nord mais retrouvée à Hawaï et au Japon. (Kawakatsu et al., 2012; Sluys & Riutort, 2018; Stocchino et al., 2019).

3.6 Régénération

Les planaires sont connues depuis des siècles pour leur incroyable capacité de régénération. Le biologiste et botaniste allemand Pallas fut le premier à décrire ce phénomène en 1766 (Pallas, 1766). Et en 1814, le naturaliste anglais Dalyell leur consacre sa fameuse expression de « presque immortelles sous la lame du couteau » (Dalyell, 1814). Les planaires sont en effet capables de régénérer n'importe quelle partie de leurs corps à partir d'un simple fragment en quelques semaines (Ivankovic et al., 2019).

Il existe des centaines (voire des milliers) d'espèces de planaires (Sluys & Riutort, 2018; Vila-Farré & Rink, 2018). Cependant les capacités de régénération des espèces varient considérablement, ainsi *S. mediterranea* et *D. japonica* ont bénéficié d'une grande attention dans la recherche et sont devenues des espèces modèles grâce à une capacité de régénération de la totalité du corps robuste et rapide (Ivankovic et al., 2019; Newmark & Alvarado, 2002; Saló & Agata, 2012).

Les planaires sont capables de se régénérer selon l'axe antéro-postérieur (**Figure 12**). Par exemple, si un ver est découpé en deux, chacun des morceaux se régénère en un animal complet et parfaitement proportionné en ~2 semaines. Le morceau préexistant va former *de novo* la partie manquante du corps pour reconstituer un animal entier. Elles sont également capables de régénérer des tissus le long de leur axe médio-latéral et ainsi de restaurer la symétrie bilatérale de l'animal. En outre, les planaires peuvent restaurer des animaux parfaitement proportionnés quels que soient la découpe et la taille du fragment (Ivankovic et al., 2019). Il y a plus de 100 ans, T. H. Morgan a ainsi estimé qu'il était possible de reformer un animal entier à partir d'un morceau correspondant à 1/279^e de l'animal donneur (Morgan, 1898), mais des études ultérieures ont placé la limite inférieure de taille inférieure à 10 000 cellules (Montgomery & Coward, 1974).

Ce processus de régénération a toutefois ses limites. En effet, chez les espèces modèles, choisies précisément pour leur capacité de régénération, la pointe de la tête en avant des ocelles, ainsi que le pharynx sont incapables de se régénérer, ces morceaux de tissus « meurent » s'ils

sont séparés du reste de l'animal. Il s'agit des seules zones « naturellement » dépourvus de néoblastes (Reddien & Sánchez Alvarado, 2004).

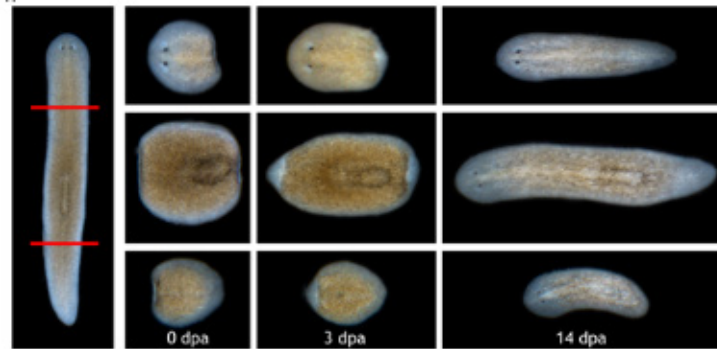


Figure 12: La régénération chez la planaire. Images illustrant la régénération des fragments de tête (en haut), de tronc (au milieu) et de queue (en bas) obtenus par amputation d'un spécimen intact de *Schmidtea mediterranea* (à gauche ; les lignes rouges indiquent les plans de coupe approximatifs). Les dates sont indiquées en jours post-amputation (*day post amputation*, dpa). Tiré de (Ivankovic et al, 2019).

Les capacités de régénération des planaires proviennent d'une population abondante de cellules souches adultes particulières, appelées les néoblastes (**Figure 9.5**). Il s'agit de cellules rondes relativement petites (7-12 μm de diamètre) présentant un volume nucléaire supérieur à celui du cytoplasme. Elles sont réparties dans tout le mésenchyme (parenchyme) des planaires, autour des systèmes digestif et nerveux (Adler & Sánchez Alvarado, 2015; Baguña, 2012). Les néoblastes sont exceptionnellement abondants par rapport aux cellules souches adultes d'autres animaux et on estime qu'ils représentent jusqu'à 20 à 30 % de l'ensemble des cellules de la planaire (Baguña et Romero, 1981).

Ces cellules somatiques constituent en effet la seule source de nouvelles cellules chez les planaires (Baguña, 2012). Les néoblastes comprennent des cellules souches pluripotentes appelée néoblastes clonogéniques et de nombreux néoblastes spécialisés distincts (**Figure 13.B**), peut-être un pour chaque type de cellule de l'organisme (Reddien, 2018). Les néoblastes spécialisés sont distribués beaucoup plus largement que l'emplacement final de leur tissu cible différencié. Par exemple les néoblastes qui donneront des yeux sont uniquement localisés dans la région antérieure au pharynx (Lapan & Reddien, 2012). Ces progéniteurs post-mitotiques vont migrer vers la zone ciblée et se différencier (**Figure 13.A**) (Ivankovic et al., 2019; Reddien, 2018).

Le processus de régénération implique la génération de nouveaux tissus sur le site de la blessure par prolifération cellulaire (formation de blastèmes) et le remodelage des tissus

préexistants, par mort cellulaire, pour restaurer la symétrie et la proportion de l'animal, selon un processus nommé la morphallaxie (Reddien & Sánchez Alvarado, 2004).

Au niveau moléculaire, des profils d'expression géniques ont été établis (**Figure 13.C**), ainsi la voie de signalisation canonique Wnt⁹ contrôlerait la régénération selon l'axe antéro-postérieur lors d'amputation transversale pour régénérer une tête (inhibiteurs de Wnt) ou une queue (ligands de Wnt) (Petersen & Reddien, 2009). Enfin, l'expression des gènes de la voie de signalisation Bmp¹⁰ favorise le maintien et la régénération des tissus de l'axe dorso-ventral de la planaire (Gaviño & Reddien, 2011).

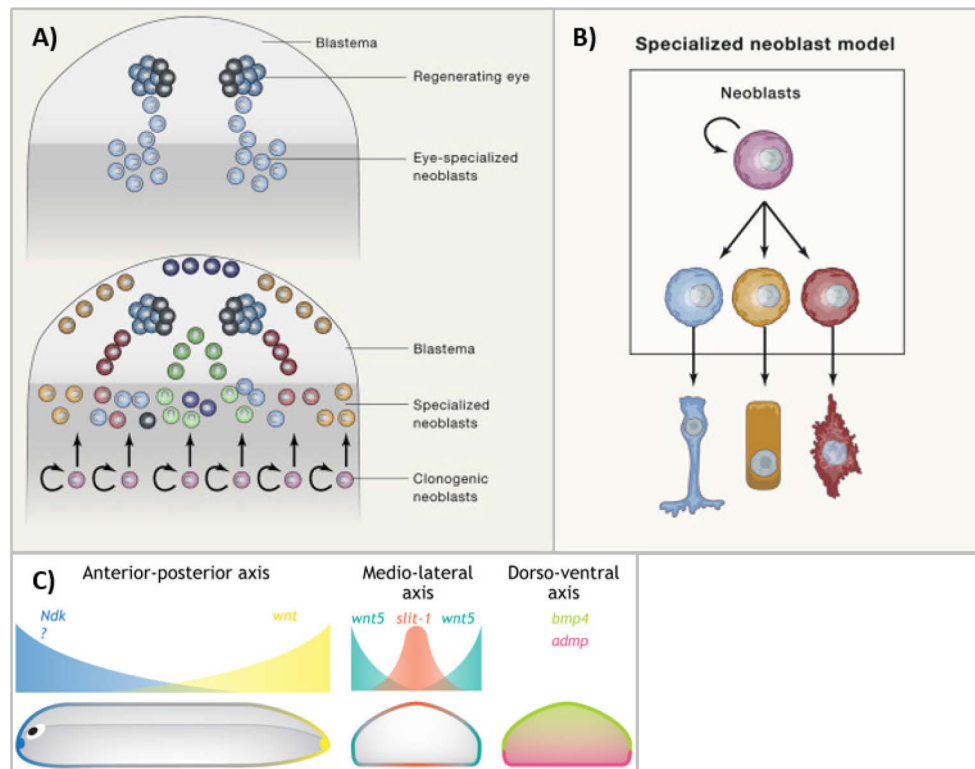


Figure 13: Bases cellulaire et moléculaire de la production de nouveaux tissus dans la régénération des planaires. (A) En haut : les néoblastes spécialisés pour l'œil produisent des progéniteurs qui migrent en deux voies de la plaie vers le blastème de la tête, où ils fusionnent pour former les yeux. En bas : De nombreuses classes de néoblastes spécialisés produisent les cellules différenciées du blastème. Le destin des cellules du blastème est prédéterminé en fonction des néoblastes spécialisés dont elles sont issues. (B) Modèle de néoblaste spécialisé. L'activation de facteurs de transcription distincts dans les néoblastes spécifie leur destin dans le renouvellement et la régénération des tissus. (C) Schéma décrivant les signaux primaires de structuration actuellement connus et leur déploiement le long des axes cardinaux du corps de la planaire. Les gradients de signalisation décrits sont des extrapolations largement hypothétiques à partir des profils d'expression des gènes respectifs, étant donné que seul le gradient de signalisation Wnt canonique a été démontré expérimentalement jusqu'à présent. *Images A et B tirées de (Reddien, 2018) ; C est tiré d' (Ivankovic et al., 2019)*

⁹ *Wingless and INT-1*. Il s'agit d'une des voies majeures de signalisation dans le développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus adultes (Clevers, 2006).

¹⁰ *bone morphogenetic protein*.

3.7 Description du système nerveux des planaires

Le cerveau est l'un des organes les plus complexes et le plus fascinant chez les métazoaires. Le système nerveux des planaires est particulièrement intéressant puisqu'il partage les mêmes sous-populations neuronales et les mêmes neurotransmetteurs que les mammifères mais est cependant plus simple avec approximativement 10 000 neurones comparé aux 86 milliards de neurones estimés chez l'homme (Buttarelli et al., 2008; Cebrià, 2007; Cebrià, Kudome, et al., 2002). On pense d'ailleurs que le cerveau des planaires serait plus similaire à celui des vertébrés qu'à celui des invertébrés supérieurs en termes de structure et de fonction (Buttarelli et al., 2008). Ainsi, Mineta et al. (2003) a montré que 95 % des gènes liés au système nerveux chez l'espèce modèle *D. japonica* ont des homologues chez l'homme. Les gènes neuronaux des planaires comprennent des homologues de facteurs de transcription bien connus et des gènes impliqués dans des maladies humaines, la neurotransmission, le guidage des axones, les voies de signalisation et le métabolisme de l'ARN (Cebrià, 2007). Enfin, le système nerveux régule de nombreux aspects de la physiologie animale et contrôle le comportement.

3.7.1 Anatomie du système nerveux

Comme chez tous les bilatériens, le système nerveux des planaires est compartimentalisé et comprend ainsi un système nerveux central (SNC) et un système nerveux périphérique (SNP) (Hartenstein & Stollewerk, 2015).

Dans la région antéro-dorsale du vers, le SNC se compose principalement de deux ganglions céphaliques (« cerveau »), qui sont reliés par des commissures antérieures (Okamoto et al., 2005), et qui vers l'extérieur, se prolongent par des branches nerveuses, qui relie le cerveau à des organes sensoriels (photorécepteurs, chimiorécepteurs et rhéorécepteurs¹¹), se trouvant aux extrémités antérieures du corps de la planaire (**Figure 14.a et b**) (Cebrià, 2007; Ross et al., 2017)

Ainsi, sur la face dorsale, la tête des planaires abrite deux « yeux » rudimentaires d'aspect croisés, appelées ocelles qui sont constituées de neurones photorécepteurs et d'une monocouche de cellules pigmentaires (Cebrià, 2007; Umesono & Agata, 2009). Dans les neurones photorécepteurs sont exprimées de nombreux gènes, marqueurs oculaires conservés tels que les canaux *TRP*, la *R-Opsine* et les orthologues de la *β -Arrestine* (**Figure 14.c**) (Agata et al., 1998). Des sillons auriculaires (**Figure 14.a**) sensibles aux stimuli chimiques sont

¹¹ Cellules sensorielles appréciant les courants (mouvement du liquide)

également retrouvées sur la partie antérieure de l'animal (MacRae, 1967; Sluys & Riutort, 2018). Les neurones sensoriels ciliés qui les constituent permettent la détection de la nourriture (Almazan et al., 2021; Farnesi & Tei, 1980). Une fonction chemosensorielle similaire a également été attribuée à l'extrémité du pharynx (Ross et al., 2017).

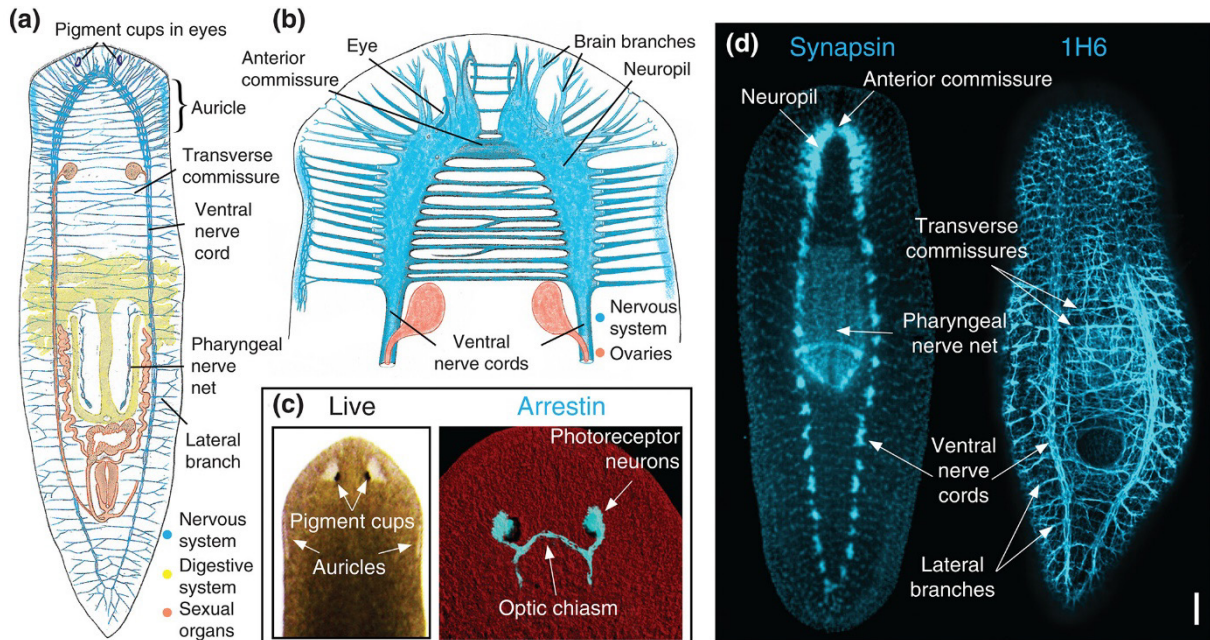


Figure 14: Vue d'ensemble de l'anatomie du système nerveux des planaires.(a) Illustration du système nerveux des planaires. Les tissus neuronaux sont colorés en bleu, les organes reproducteurs en orange et le système digestif en jaune. (b) Les branches cérébrales s'étendent latéralement à partir du neuropil. (c) Les taches oculaires (situées sur la surface dorsale) sont constituées de cupules de pigments ; les neurones photorécepteurs sont situés à l'intérieur d'une zone dépourvue de pigment. L'anticorps *anti-Arrestin* marque les neurones photorécepteurs et leurs axones, ce qui révèle le chiasme optique. Les auricules, denses en neurones sensoriels, sont dépourvues de pigment et sont situées sur les bords latéraux de la tête. (d) L'anticorps *anti-synapsine* marque les synapses des neurones de la planaire, mettant en évidence la commissure antérieure et le neuropil du cerveau, les cordons nerveux ventraux et leurs commissures transversales et branches latérales, ainsi que le réseau nerveux pharyngien. L'anticorps *1H6* marque le système nerveux périphérique, y compris les axones s'étendant à travers les cordons nerveux ventraux. Barre d'échelle = 200 μ m. *Figure tirée de (Ross et al, 2017).*

Vers la région postérieure, les ganglions céphaliques sont prolongés d'une paire de cordons nerveux ventraux (CNV) qui s'étendent sur toute la longueur de l'animal. Le long des CNV, des ganglions neuronaux constituent les points de jonctions des commissures transversales qui relient les deux cordons (**Figure 14.d**) (Agata et al., 1998; Cebrià, Kudome, et al., 2002). Il existe des marqueurs moléculaires pan-neuronaux, qui permettent par immunocytochimie de visualiser l'ensemble du CNS des planaires, tels que la Prohormone Convertase-2 (PC-2) (Okamoto et al., 2005), la Synapsine (**Figure 14.d**) (Cebrià, 2008) ou la Synaptotagmine (Tazaki et al., 1999).

Le SNP est composé de plexus nerveux sous-épidermiques, sous-musculaires et gastro-dermiques. Le plexus sous-épidermique est situé entre l'épiderme et la paroi musculaire et forme

un maillage clairsemé qui pénètre dans l'épithélium, et possède donc des fonctions sensorielles. Sous la paroi musculaire, un réseau nerveux plus épais et plus dense, le plexus sous-musculaire, est formé par des faisceaux de fibres nerveuses. Le pharynx contient des plexus nerveux internes et externes en forme d'anneaux (**Figure 14.d**). Enfin, de nombreuses fibres nerveuses ont été observées dans le parenchyme mais également autour des testicules et des ovaires des planaires sexués matures (Baguña & Ballester, 1978; Ross et al., 2015)

3.7.2 Anatomie des neurones

Les planaires possèdent plusieurs types bien distincts de neurones. Comme d'autres invertébrés, elles possèdent des neurones unipolaires. Des analyses histologiques ont également montré la présence de neurones bipolaires et multipolaires (Schmidt-Rhaesa et al., 2015). Des neurones, qui jouent le rôle d'interneurones, se situent dans les commissures transversales des cordons ventraux. Les neurones sensoriels sont généralement des neurones bipolaires (Cebrià, 2007; Reuter et al., 1995). Les neurones du cerveau des planaires ont des épines dendritiques avec des boutons synaptiques, un seul axone et une activité électrique spontanée relativement lente, similaire aux vertébrés (Sarnat & Netsky, 2002).

3.7.3 Hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle du système nerveux

Des criblages d'expression et fonctionnels à haut débit ont permis d'établir qu'il existait chez les planaires une abondance de populations neuronales distinctes sur le plan moléculaire et fonctionnel. Ainsi, elles possèdent des neurones dopaminergiques (Nishimura et al., 2007a), sérotoninergiques (Nishimura et al., 2007b), GABAergiques (Nishimura et al., 2008a), cholinergiques (Hagstrom et al., 2017; Nishimura et al., 2010) et octopaminergique (Nishimura et al., 2008b). Ces populations neuronales présentent également une compartimentation au sein du cerveau qui peut être définie par l'expression de gènes conservés (Ross et al., 2017; Umesono et al., 1999) comme on peut observer sur la **Figure 15**.

Au niveau moléculaire, des essais fonctionnels basés sur la technique d'ARN interférent, montrent que de nombreux gènes responsables des processus neuronaux chez les vertébrés ont des rôles similaires chez les planaires. Ainsi, la conjugaison d'essais fonctionnels moléculaires (ARN interférent) à des analyses comportementales a permis de déterminer que chez la planaire, les neurones sérotoninergiques coordonnent le battement ciliaire, contrôlent donc la locomotion (« gliding ») (Currie & Pearson, 2013; März et al., 2013) et la thermotaxie (Inoue et al., 2014). Tandis que, les mouvements musculaires autonomes seraient médiés par les neurones dopaminergiques (Nishimura et al., 2007a) et cholinergiques (Cochet-Escartin et al., 2015; Nishimura et al., 2010).

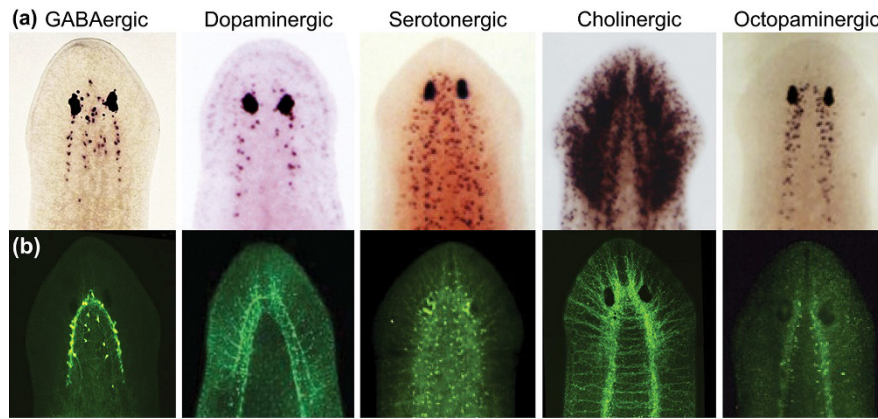


Figure 15: Le système nerveux des planaires est composé de sous-types neuronaux distincts. (a) Marquage par *whole-mount hybridation in situ* des gènes codant pour les enzymes nécessaires à la synthèse des populations de neurotransmetteurs chez *D.japonica*: *Dj-glutamic acid decarboxylase*, neurones GABAergiques ; *Dj-tyrosine hydroxylase*, neurones dopaminergiques ; *Dj-tryptophan hydroxylase*, neurones sérotonergiques ; *Dj-choline acetyl transferase*, neurones cholinergiques ; *Dj-tyramine beta hydroxylase*, neurones octopaminergiques. (b) Immunolabeling des protéines enzymatiques trouvées dans les mêmes populations de neurotransmetteurs qu'en (a). Figure tirée de (Ross et al, 2017).

Ainsi en combinant neuropharmacologie et étude comportementale, Buttarelli et al. (2000) ont montré que la stimulation des neurones cholinergiques produit une hypokinésie tandis que la stimulation de la transmission dopaminergique provoquait une hyperkinésie. Ainsi, le contrôle physiologique de l'activité motrice chez les planaires dépendrait de l'équilibre entre les transmissions cholinergiques et dopaminergiques. La fonction neuronale GABAergique, quant à elle, est impliquée dans la phototaxie (Nishimura et al., 2008a).

Les planaires sécrètent également des hormones peptidiques, ainsi deux familles de neuropeptides, les *FMRF-amide-like* et les neuropeptides *F* qui seraient des homologues invertébrés de la famille des neuropeptides Y des vertébrés. Ils sont produits par des populations très restreintes de neurones (McVeigh et al., 2005) . Des dizaines de gènes codant au moins 140 neuropeptides ont été décrits chez *S. mediterranea* (J. J. Collins et al., 2010) et au moins 21 gènes chez *D. japonica* parmi lesquels au moins cinq sont impliqués dans la dévagination du pharynx (Shimoyama et al., 2016). Chez la souche sexuée de *S. mediterranea*, les cellules neuroendocrines régulent le développement de la lignée germinale (Saberri et al., 2016).

Enfin, le neuropile cérébral des planaires, riche en synapses, contient des cellules gliales (I. E. Wang et al., 2016).

3.7.4 Les mécanismes moléculaires de la régénération du SN

Les planaires ont une capacité remarquable à régénérer tous leurs tissus, y compris le système nerveux central. Une capacité qui suscite beaucoup d'intérêt dans la recherche de

traitements des lésions de la moelle épinière et des maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Poirier et al., 2019).

Après décapitation, les planaires régénèrent un système nerveux entièrement fonctionnel en à peine une semaine (Cebrià, M, et al., 2002; Inoue et al., 2004). Les premiers groupes de neurones dans le blastème antérieur apparaissent dans les 24-48 heures. Ce cerveau naissant se démarque par des cordons nerveux ventraux tronqués dans le tissu préexistant situé sous le blastème, et dans les 36 heures, ces cellules nouvellement spécifiées commencent à exprimer des ARNm limités à des régions distinctes du cerveau. Dans les 2 à 3 jours suivant l'amputation, de nouvelles connexions neuronales se forment, caractérisées par la réapparition de la commissure antérieure entre les deux ganglions céphaliques, la formation du chiasma optique et la connexion entre le nouveau cerveau et les cordons nerveux préexistants. La morphologie du cerveau est restaurée entre 3 et 5 jours après la décapitation, et s'accompagne du rétablissement de comportements simples. Enfin, à sept jours post-amputation, le système nerveux est entièrement reconstitué, et toutes ses fonctions restaurées (Ross et al., 2017).

Au niveau moléculaire, immédiatement après la perte de tissu, un programme de réponse est initié. Chez *S.mediterranea* par exemple, un homologue de la follistatine, *Smed-fst*, est surexprimé après l'amputation, inhibant l'activité du membre de la famille TGF- β *Smed-activin*, et favorisant la régénération normale de la tête (Roberts-Galbraith & Newmark, 2013). Le facteur de transcription de la famille Runx interviendrait également après l'amputation, *Smed-runt-1* est surexprimé dans un sous-ensemble de néoblastes près de la lésion, et va induire l'expression de facteurs de transcription en aval qui sont impliqués dans la différenciation des tissus neuronaux (Sandmann et al., 2011).

La voie de signalisation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) est cruciale pour la régulation de la différenciation des néoblastes en lignée neuronales (Fraguas et al., 2011). Les gènes codant les récepteurs du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) sont également exprimés dans les néoblastes (Wagner et al., 2012). Le gène *nou-darake* (*ndk* ; "cerveau partout" en japonais) semblable au FGFR (*FGFR-like*) contrôle également la neurogenèse (Cebrià, Kobayashi, et al., 2002). La voie de signalisation Hedgehog est l'une des autres voies qui jouerait un rôle dans la différenciation des néoblastes en cellules progénitrices neuronales. Ainsi chez *S.mediterranea*, *Smed-hedgehog*, est exprimé par les neurones cholinergiques, GABAergiques et octopaminergiques (Currie et al., 2016), et comme chez d'autres organismes modèles, cette voie est nécessaire à la régulation de l'expression des gènes des cellules gliales (I. E. Wang et al., 2016).

La régénération des neurones photosensibles est l'exemple le mieux compris au niveau cellulaire et moléculaire. Elle implique les facteurs de transcription conservés *eyes absent*, *sine oculis*, *ovo* et *six-1/2* (Cross et al., 2015; Lapan & Reddien, 2012; Mannini et al., 2004; Pineda et al., 2000).

Un récent criblage fonctionnel a révélé que le gène *Smed-SoxB2-2*, qui est exprimé dans certaines cellules souches et leur cellules filles joue probablement un rôle important dans la neurogenèse au cours de la régénération (Labbé et al., 2012). Or ce gène est également impliqué dans la progression de la neurogenèse suggérant une conservation fonctionnelle des voies de la neurogenèse entre vertébrés et planaire.

Ainsi par l'activation de l'ensemble de ces voies de signalisation, les néoblastes "c" pluripotents, évolueraient en cellules progénitrices de neurones appelées néoblastes "mu" (néoblastes v), qui se différencieront en neurones par la suite (Molinaro & Pearson, 2016).

Les gènes *Dj/Smed-ndk* jouent également un rôle dans la restructuration de la partie antérieure du SNC. Dans la région postérieure, les gènes *wnt11-6* et *Smed-fzd5/8-4*, récepteur Wnt, contrôlent la structuration au niveau postérieur. Le gène *Smed-notum* contrôle le remodelage du SN le long de l'axe antéro-postérieur. Et dans l'axe dorso-ventral, c'est la voie BMP qui contrôle ce remodelage. Enfin, pour recouvrer toutes fonctions neuronales, il faut rétablir les connexions au niveau du CNS, ainsi les protéines *Netrines* et *Slits*, qui sont bien connues pour leur rôle dans le guidage des axones chez *C.elegans* (Killeen & Sybingco, 2008), sont impliquées dans l'orientation des projections axonales et la reconnexion à la machinerie synaptique chez la planaire. Une fois le cerveau régénéré, les planaires sont capables de maintenir un ratio de neurones proportionnel à la taille du corps et à la configuration des organes. On parle ici d'homéostasie neuronale (revue dans (Ross et al., 2017)).

3.8 La planaire, modèle d'étude en toxicologie

3.8.1 Modèle pour la Toxicologie dans le développement neuronal

Nous allons reprendre l'ensemble des informations précédemment évoquées dans cette partie. Les espèces de planaire à reproduction asexuée, se reproduisent par fission transversale, puis la régénération *de novo* des structures corporelles amputées permet de reconstituer deux planaires, génétiquement identiques, en seulement une semaine. La régénération est alors le principal mécanisme de développement neurologique chez la planaire, et implique de nombreux processus similaires à ceux qui se produisent chez les vertébrés comme la migration, la prolifération et la différenciation des cellules souches et le guidage axonal (Cebrià, 2007; Cebrià

& Newmark, 2005; Umesono et al., 2013). Chez la planaire, le développement et la régénération constituent ainsi un seul et même processus. Par conséquent, étudier le processus de régénération d'une planaire artificiellement amputée revient à étudier son développement, à fortiori, son développement neurologique pour le morceau de queue qui doit reconstituer une tête (Sakurai et al., 2012).

Dans le cadre d'études toxicologiques, l'accessibilité à ces populations clonales de planaires permet alors la comparaison directe de l'effet de substances toxiques potentielles sur le cerveau d'individus « adulte » et en développement, sans avoir à se soucier de variabilité de réponses qui pourrait être attribué à des facteurs génétiques. En outre, puisque les vers amputés et intacts sont de taille similaire, des essais comportementaux peuvent être réalisés en parallèle afin de déterminer si les substances chimiques, ou des concentrations particulières, sont spécifiquement toxiques ou s'ils sont plus toxiques sur le cerveau en développement (Hagstrom et al., 2016).

La planaire asexuée *D. japonica* a été décrite comme un modèle animal alternatif, adapté à l'étude de la neurotoxicité sur le développement de l'animal, dans un contexte de criblage à moyen débit (MTS) de banque de molécules (Hagstrom et al., 2019; Ireland et al., 2020; S. Zhang et al., 2019). La planaire constitue un excellent complément aux modèles non-mammifères, mais également un bon compromis entre ces derniers et les modèles alternatifs. En outre, le système nerveux des planaires est plus complexe que celui des nématodes, mais plus simple que celui des poissons-zèbres. Il est facile à suivre/évaluer au niveau cellulaire (~10 000 neurones) et présente en parallèle une complexité et une homologie suffisante avec le cerveau des mammifères (mêmes sous-populations neuronales et neurotransmetteurs) pour que la comparaison avec l'homme soit pertinente (Buttarelli et al., 2008; Cebrià, 2007; Cebrià et al., 2002). Ainsi, en étudiant le développement du cerveau des planaires, nous pouvons avoir un aperçu des mécanismes clés du développement du cerveau humain.

3.8.2 *La planaire: bioindicateur des écosystèmes aquatiques*

Dans l'esprit des approches *one health*, la planaire constitue un double outil, non seulement il peut être employé comme bioindicateur de la santé des écosystèmes, mais permettrait également d'évaluer la toxicité des substances chimiques dans le cadre de criblage à moyen débit.

En effet, la planaire est déjà considérée comme un bioindicateur des écosystèmes aquatiques (Knakievicz, 2014) . Contrairement, à certains modèles d'invertébrés utilisés en

écotoxicologie, tels que les annélides, les arthropodes et les bivalves, qui sont souvent des décomposeurs ou des consommateurs primaires qui se nourrissent de débris organiques ou d'algues ; les planaires, sont des prédateurs qui jouent le rôle de consommateurs secondaires et se nourrissent principalement d'autres invertébrés aquatiques. Ainsi, leur place de choix dans le réseau trophique permet d'évaluer de manière exhaustive l'impact et le risque des polluants environnementaux sur l'écosystème aquatique (Wu & Li, 2018). La sensibilité prouvée des planaires d'eau douce aux substances ajoutées à leur environnement, est alors souvent étudiée pour surveiller la qualité et le niveau de pollution de l'eau dans les études environnementales (Kapu & Schaeffer, 1991). Ainsi, différents marqueurs au niveau moléculaire (Prá et al., 2005) ou à l'échelle de l'organisme (Knakievicz, 2014; Pestana & Ofoegbu, 2021) sont employés en écotoxicologie.

Les planaires présentent de nombreux avantages. Comme le poisson-zèbre et les nématodes, elles sont de petite taille, leur entretien en laboratoire est peu onéreux et facile, elles sont sensibles aux substances chimiques présentes dans l'eau et se développent rapidement. En effet Hagstrom et al., (2015) ont démontré des sensibilités aux solvants, aux pesticides et aux détergents comparables aux autres modèles alternatifs utilisés en toxicologie, tels que les larves de poisson zèbre et les nématodes. En outre, la voie d'administration peut influencer la toxicité des agents (Casarett and Doull, 1993). Le mode d'exposition des planaires aux substances chimiques est simple: pénétration à travers le tégument. La durée et la fréquence des expositions est aussi très importante dans la caractérisation de la toxicité d'un agent chimique. Il a été montré que les planaires étaient adaptées non seulement pour l'évaluation la toxicité chronique d'une substance mais également, sur la toxicité aigüe (Wu & Li, 2018).

Enfin, la planaire offre un répertoire d'indicateurs morphologiques, comportementaux et moléculaires quantifiables permettant d'analyser les effets toxiques sur différents aspects.

3.8.3 Méthodes d'évaluation toxicologique chez les planaires

3.8.3.1 Evaluation de la mortalité: CL₅₀

En toxicologie, la première étape du criblage consiste toujours à déterminer les concentrations létales. Pour ce faire, on procède à la détermination de la CL₅₀, concentration à laquelle 50 % des animaux meurent. Chez la planaire, c'est un paramètre facile à évaluer, car les vers se nécrosent immédiatement après la mort (Buchanan 1935). Ce paramètre a ainsi été largement étudié aussi bien par annotation manuelle (un observateur qui constate la lyse) (Grebe & Schaeffer, 1991) ou de manière automatisée par analyse d'images et usage d'un algorithme

par ordinateur (Hagstrom et al., 2015). Aussi pratique que soit cet indicateur, des limites sont cependant à signaler, puisque certaines substances chimiques pourraient préserver l'intégrité des tissus. Aussi d'autres indicateurs potentiels, moins flagrants, tels que l'absence de mouvement lorsque la planaire est stimulée (piqué avec le cône d'une pipette), et une dévagination prolongée du pharynx sont également considérés, mais sont cependant moins adaptables à l'automatisation.

3.8.3.2 Impact sur la régénération

La formation *de novo* de la tête à partir d'un fragment de queue s'est révélée très utile pour évaluer la tératogénicité des produits chimiques environnementaux. Ainsi, Calevro et al., (1999) avaient montré que des concentrations sublétales d'Aluminium et de Chrome perturbait la régénération de la tête de *Dugesia etrusca*, et Li, (2015) de conclure que le Bisphénol A n'impactait pas la régénération de *D. japonica*. Le processus de formation comporte plusieurs stades identifiables: 1) la blessure ou lésion, 2) formation du blastème, 3) agrandissement du blastème (différenciation), 4) apparition des ocelles, 5) présence d'auricules et 6) observation d'une tête complète. Un suivi quotidien de ces différents stades, entre des individus décapités exposés ou non à des substances chimiques permet quantifier les effets d'activation ou d'inhibition de la régénération des tissus. Enfin, l'observation d'anomalies morphologiques chez l'individu régénéré est également un indicateur de la toxicité.

3.8.3.3 Indicateurs d'effets neurotoxiques

L'organe cible de la toxicité le plus souvent impliqué dans la toxicité systémique est le système nerveux central (Casarett and Doull, 1993). Afin d'évaluer la neurotoxicité du phénol chez les planaires, Grebe & Schaeffer, (1991) ont introduit, dès 1991, le premier système de notation appelé le *GS scoring*. Il consistait en l'évaluation de manière visuelle de critères classés en 5 catégories principales : la locomotion, les réponses morphologiques, neurologiques, la morbidité et les mécanismes de protection. Puis, dans le cadre de l'étude de la toxicité du cadmium chez les planaires, Wu et al., (2014) ont modifié le *GS scoring* en condensant les critères dans trois catégories (morphologique, neurologique et morbidité), apportant aussi une description précise des caractères morphologiques (les stéréotypies). Ce système reste cependant qualitatif et sera par conséquent implémenté par Hagstrom (2016) pour rendre l'évaluation quantitative (**Figure 16**).

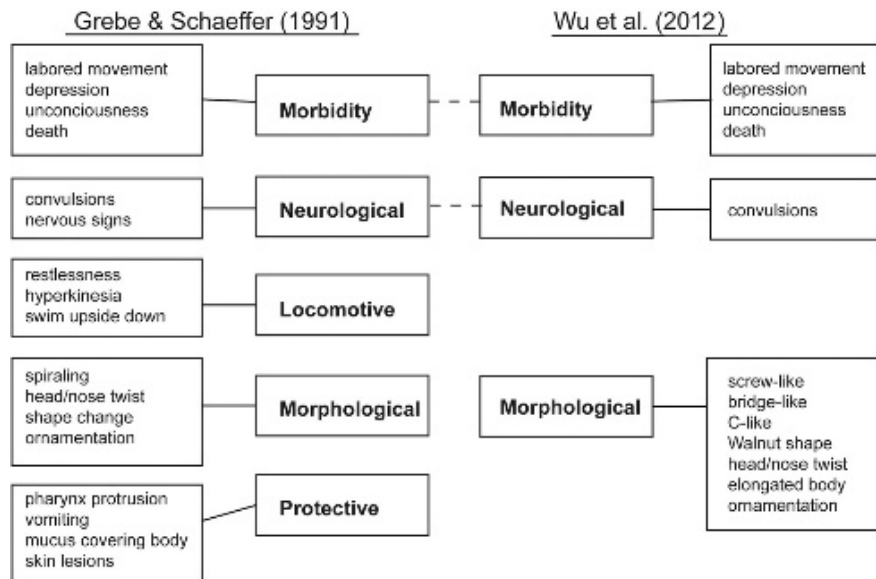


Figure 16: Comparaison des deux systèmes de notation de Grebe et Schaeffer (système GS) (Grebe & Schaeffer 1991) et de Wu et al (2014). Bien qu'il existe un chevauchement substantiel entre les deux systèmes, le système GS fournit plus de relevés (18 contre 13). Le système de Wu a l'avantage de présenter des catégories claires d'indicateurs morphologiques. Tiré de (Hagstrom et al, 2016).

3.8.3.4 Indicateurs posturaux :

Les indications morphologiques constituent une catégorie mixte dans la mesure où certains changements sont le résultat de perturbations de fonctions neuronales, tandis que d'autres ne le sont pas. Les formes spécifiques conséquences d'une altération neuromusculaire (soit d'origine dopaminergique ou cholinergique), sont appelées des stéréotypies motrices ou posturales, et peuvent être réparties en deux catégories : les hypokinésies tels que le *bridge-like* et le *walnut* ; et les hyperkinésies tels que le *C-shape*, le *screw-like*, et le *snake-like* (Buttarelli et al., 2000, 2008; Passarelli et al., 1999). Cependant, les stéréotypies motrices sont actuellement caractérisées de façon manuelle et nécessitent une automatisation grâce à des algorithmes d'apprentissage afin de cribler rapidement les effets de nombreuses molécules, comme c'est le cas chez *Caenorhabditis elegans* (Wählby et al., 2012; Zhan et al., 2015)

3.8.3.5 Indicateurs comportementaux

La locomotion spontanée est probablement le type de comportement le plus accessible chez les planaires : avec des phases de repos et de déplacement par *gliding* (Hagstrom et al. 2015). Il s'agit d'ailleurs, à l'heure actuelle, d'un des rares paramètres que l'on peut mesurer de manière objective et quantitative chez la planaire. L'activité locomotrice a longtemps été mesurée par la méthode pLMV (*planarian Locomotor Velocity*) développée par Raffa et al. (2001). Un seul ver était alors placé dans une boîte de Pétri standard (10 centimètres de

diamètre) posée sur un quadrillage (principalement des carrés de 0,5 cm ou 1 cm de large) ou le pLMV était défini par le nombre de lignes traversées par la planaire sur un intervalle de temps défini et était noté par un observateur (**Figure 17.A**). Bien que le pLMV se soit révélé être une mesure simple, sensible, il présente des inconvénients car le temps d'observation, la méthode de comptage et la taille du quadrillage varient dans la littérature, rendant la comparaison des résultats difficile (Rodrigues et al., 2016). De plus, cette méthode est chronophage puisqu'elle ne permet de tester qu'une planaire à la fois, et n'estime que les vitesses absolues sans prendre en compte la trajectoire du ver, qui pourrait également fournir des informations importantes, sur la fréquence des virages ou le comportement exploratoire. Par conséquent, des laboratoires ont développé des plateformes automatisées qui permettent d'évaluer l'ensemble du comportement locomoteur de la planaire par suivi du centre de masse ou COM (*center of mass tracking*, **Figure 17.B**) (Hagstrom et al., 2015; Talbot & Schötz, 2011). Il s'agit cependant de plateformes sur mesure, dont la reproduction dans d'autres laboratoires reste un challenge et avec le risque de variations entre les installations. Une automatisation et une standardisation du test de locomotion est par conséquent nécessaire pour rendre l'analyse plus fiable et reproductible.

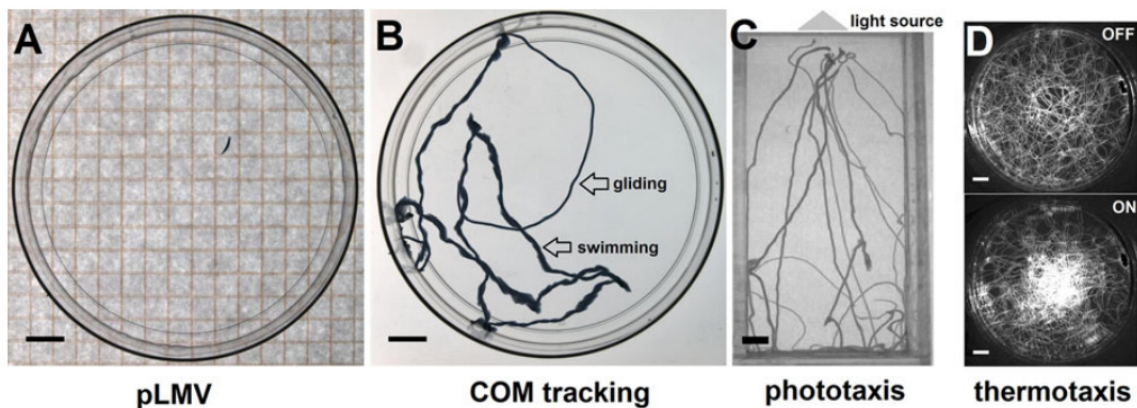


Figure 17: Indicateurs comportementaux quantitatifs mesurés chez la planaire (A) Le pLMV mesure la vitesse des vers en comptant le nombre de lignes de quadrillage traversées par la planaire sur un temps défini. (B) Suivi du centre de masse (Center Of Mass) pour déterminer le type de locomotion, la vitesse du ver et le comportement exploratoire. (C) La phototaxie est généralement testée à l'aide d'un gradient lumineux linéaire. (D) La thermotaxie peut être testée à l'aide d'un élément Peltier pour générer un centre plus froid, ce que les vers préfèrent. Barre d'échelle 1 cm. Tiré de (Hagstrom et al, 2016)

Toujours en lien avec le déplacement, le *scrunching* est induit lors de stimuli nocifs tels que la chaleur, l'amputation, un choc électrique, un pH acide, ou l'exposition à des substances chimiques. Ce mouvement repose sur des contractions musculaires coordonnées et présente un profil de déplacement caractéristique (**Figure 18**) que Cochet-Escartin et al.(2015) ont réussi à

quantifier par analyse d'images (Reho et al., 2022). Sa dimension musculaire en fait un potentiel indicateur de perturbations neuronales.

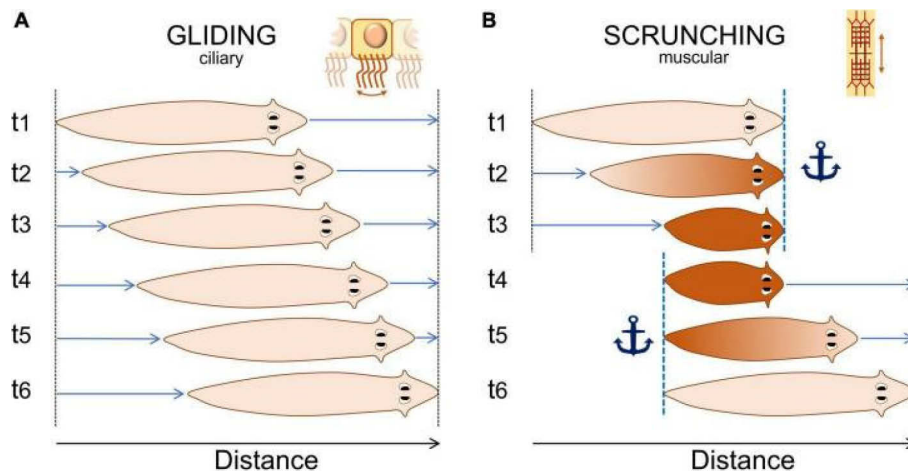


Figure 18: Le *gliding* et le *Scrunching* chez la planaire. A) comportement normal de *gliding* par la planaire. Le ver produit du mucus et glisse à une vitesse constante sur une surface à l'aide de cellules ciliées situées sur leur face ventrale. (B) Réponse aux stimuli nocifs : *scrunching*. Il s'agit d'une atteinte musculaire. La tête est d'abord ancrée à la surface (t1), le corps se contracte (t2), l'ancrage passe de la tête à la queue (t3 à t4), puis le corps s'allonge vers l'avant (t5) et fait une boucle jusqu'au premier pas (t6). Image tirée de (Reho et al., 2022).

Des comportements plus complexes, qui dépendent de l'activité neuronale tels que la thermotaxie (**Figure 17.D**), la chimiotaxie, la phototaxie (**Figure 17.C**) et la thigmotaxie sont également quantifiables chez *D. japonica*, mais dans un contexte de criblage à faible débit (Akiyama et al., 2015; Inoue et al., 2004, 2015).

Enfin dans une moindre mesure la préférence à la place conditionnée (PPC), une méthode initialement développée pour les rongeurs, qui permet d'étudier le comportement d'addiction à une drogue, est également utilisé chez les planaires. Ainsi des études ont montré que le paradigme de conditionnement induisait une dépendance à la cocaïne chez les planaires (O. R. Pagan et al., 2013), favorisant ainsi la rechute après sevrage (Amaning-Kwarteng et al., 2017).

3.8.3.6 Indicateurs moléculaire et cellulaire de la toxicité

La conservation de nombreux mécanismes métaboliques et moléculaires décrit chez les mammifères chez la planaire renforce la pertinence de leur évaluation dans la toxicologie. L'une des forces du modèle « planaire » est la possibilité qu'il offre de relier les effets morphologiques et comportementaux au niveau de l'organisme aux effets aux niveaux moléculaire et cellulaire.

Par ailleurs, il a été montré que diverses substances neurotoxiques affectent d'importantes cibles moléculaires conservées chez les planaires à travers des tests colorimétriques réalisés sur des homogénats de planaires comme par exemple le dosage de

l'activité d'enzymes de type acétylcholinestérase et monoamine oxydase (Wu & Li, 2015) et de ceux impliqués dans le contrôle du stress oxydatif comme la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase (H. C. Zhang et al., 2015). Il n'existe toutefois pas de biomarqueurs facilement quantifiables pour toutes les voies d'exposition aux substances toxiques chez la planaire.

Chez la planaire, les approches basées sur l'expression des gènes, comme l'hybridation *in situ*, la RT-PCR quantitative et l'immunohistochimie, ont permis de caractériser les effets des voies moléculaires impliquées dans le cancer, le développement neurologique et le maintien des cellules souches (Stevens et al., 2015). Pour le moment, les études analysant au niveau moléculaire l'impact des substances toxiques sur le système nerveux de la planaire sont rares (Balestrini et al., 2014).

De l'échelle d'un animal entier (*in-vivo*) aux cibles moléculaires, les planaires offrent un répertoire d'indicateurs morphologiques et comportementaux tout en se prêtant à des études mécanistiques de la toxicité des composés. La conjugaison de plusieurs méthodes est nécessaire à la compréhension de la toxicité des molécules, malheureusement il existe peu d'études qui rentrent dans ce cadre.

Objectifs de la thèse

Le modèle planaire est un complément idéal aux autres modèles animaux alternatifs existants en toxicologie tels que le poisson zèbre et les nématodes, pour lesquels des outils moléculaires plus importants sont disponibles.

Bien que les planaires aient permis des avancées en toxicologie et que de nombreux outils applicables à l'ensemble des domaines de recherche sur la planaire existent, il reste de nombreux challenges à relever pour répondre aux besoins croissants de la neurotoxicologie moderne et c'est dans ce cadre que s'inscrivent mes objectifs de thèse:

1) l'harmonisation et la standardisation de la méthodologie appliquée aux planaires, par rapport aux modèles *in vivo* reconnus pour leur sensibilité aux substances toxiques, mais également par rapport à la diversité d'espèces de planaires utilisées dans les études toxicologiques, qui ne permet pas une comparaison pertinente des effets observés entre des études ;

2) l'automatisation des essais toxicologiques réalisés afin de permettre le criblage à haut et moyen débit des substances chimiques, afin de tester efficacement des bibliothèques importantes de molécules ;

3) la nécessité de conjuguer les études comportementales (macro) à l'analyse des mécanismes moléculaires sous-jacents de la toxicité des composés étudiés pour comprendre leur mode d'action. Ceci est d'autant plus intéressant pour les substances dites neurotoxiques, agissant sur le système nerveux, le comportement étant un indicateur pertinent des atteintes sur SNC.

Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux

Les deux premiers objectifs énoncés dans le précédent chapitre ont été conjointement traités dans cette partie. Il s'agissait d'harmoniser et de standardiser la méthodologie lors de l'évaluation de la toxicité de substances chimiques sur la planaire, et d'automatiser ces essais afin de pouvoir cribler des substances chimiques à haut ou moyen débit.

1. Synthèse de l'article 1

L'article 1, (Mathiron et al., 2023), s'attèle à la standardisation du test PMR (*Photomotor response*). Il s'agit d'un test communément utilisé pour identifier des composés neuroactifs chez le poisson zèbre, qui repose sur l'analyse du profil de l'activité locomotrice, dans le cadre d'un stress, induit par l'alternance de phases sombres et lumineuses. Cet article méthodologique conclut sur une série de recommandations à opérer avant, pendant et après les essais neurotoxicologiques afin d'adapter ce test à d'autres modèles notamment à des invertébrés, tels que 1) la définition de la taille minimale de l'échantillon à tester pour obtenir une puissance suffisante pour le traitement statistique des résultats avec l'utilisation du logiciel G Power ; 2) l'acclimatation préalable des individus au dispositif et la réalisation des tests pendant une période de la journée où l'activité locomotrice de l'espèce modèle est optimale afin de minimiser les effets du rythme circadien sur le comportement ; 3) dans l'alternance des phases de lumière et d'obscurité, de réaliser la phase d'acclimatation dans les mêmes conditions que la première phase du test (dans l'obscurité ou dans la lumière), aussi afin de garantir des réponses comportementales, de soumettre les individus testés à au moins deux cycles de lumière/obscurité mais de ne pas aller au-delà de quatre cycles pour éviter l'habituation ; 4) la considération de la taille de l'individu testé par rapport au paramètre mesuré qui est la distance parcourue dans le cas du PMR ; 5) l'usage de modèles linéaires généralisés (GLM) pour analyser les distances parcourues par les individus testés (variable de comptage, appariées) afin d'évaluer les effets d'au moins deux variables prédictives, que sont la concentration de la substance à laquelle les animaux sont exposés et la condition (lumière ou obscurité) appliquée. Nous avons utilisé l'exposition de la planaire *S.mediterranea* à la gentamicine, un antibiotique à large spectre, comme preuve de concept dans le cadre de la standardisation du test PMR et avons montré que l'exposition à la gentamicine modifiait le profil de réponse des planaires exposées par rapport non exposées.

2. Article 1

Mathiron, A. G. E., Rejo, L., Chapeau, F., Malgouyres, J. M., Silvestre, F., & Vignet, C. (2023). Tools for photomotor response assay standardization in ecotoxicological studies: Example of exposure to gentamicin in the freshwater planaria *Schmidtea mediterranea*. *Environmental toxicology and pharmacology*, *102*, 104242.

Tools for photomotor response assay standardization in ecotoxicological studies: example of exposure to gentamicin in the freshwater planaria *Schmidtea mediterranea*

Anthony G.E. Mathiron^{1,2}, Lucia Rejo³, Florian Chapeau³, Jean-Michel Malgouyres³, Frédéric Silvestre^{1,2} and Caroline Vignet³

¹Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology, University of Namur, 61 Rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

²Institute of Life, Earth, and Environment (ILEE), University of Namur, Rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium

³Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives (BTSB), EA7417, INU Champollion, Place de Verdun, 81000, Albi, France

Corresponding author:

Anthony Mathiron

E-mail: anthony.mathiron@sfr.fr

Abstract:

Photomotor response assay (PMR) is very useful in an ecotoxicological context because it allows evaluation of behavioral response to potential toxic compounds. However, a lack of procedure standardization makes results comparison difficult between labs and organisms. Here, we aimed to propose five different tools to standardize the PMR procedure so that it may be applied to all model species, regarding: (1) the minimum total sample size, (2) the acclimation period, (3) the number and duration of light and dark phases alternation, (4) the measured behavior, and (5) the statistical analysis. As an example of procedure application, we analyzed the effect of an exposure to the antibiotic gentamicin on the locomotion behavior during PMR in an invertebrate species: the asexual freshwater planaria *Schmidtea mediterranea*. We encourage future studies using PMR to follow these five tools to improve data analysis and results comparability.

Key words: behavior – pharmaceuticals – locomotion – invertebrate – R software – linear mixed models

1. Introduction

Environmental impact on non-target organisms of all molecules found in ecosystems (Didas J. Moshi *et al.* 2015; da Silva Freitas *et al.* 2022; Robles-Jimenez *et al.* 2022) has increased during the past few years. Ecotoxicological studies and techniques are in place for many animal organisms, both vertebrates and invertebrates. The most common one is the survival test with LC50 levels calculation (vertebrates (Marchini *et al.* 1992; Wiegand *et al.* 2000; Agbohessi *et al.* 2013; OECD 2013; Scarlett *et al.* 2013) and invertebrates (Cold and Forbes 2004; Zhang *et al.* 2014; Li 2019; Ofoegbu *et al.* 2019). Even if LC50 used to be the main indicator, it is now criticized by the scientific community (Jager 2011; Kooijman 2016) because effects are often detected at lower concentrations: LOEC and NOEC indicators appeared accordingly (Oviedo *et al.* 2008; Stoddard and Huggett 2014; Chiffre *et al.* 2016). Nowadays, other indicators such as behavioral analysis are also pertinent for ecotoxicological studies. Behavior is integrative, relatively easy to analyze and non lethal for organisms. Many tests can be done during behavioral experiments (d'Isa and Gerlai. 2023), depending on the organisms. One very common example, exploration behavior, is assessed by analyzing the locomotion of the organism during a few minutes (Palanza *et al.* 2008; Adamatzky *et al.* 2014; Crosby *et al.* 2015; Wolf and Heuschele 2018; Martinez *et al.* 2020). Exploration tests are relatively easy to set up, realized and analyzed in a standardized manner.

Another behavioral test that has been used since the last decade is the photomotor response assay (PMR) or light stress assay (Bownik and Wlodkowic 2021). This test consists, after acclimation, of an alternation of repeated light and dark short periods during the day. This test is very common in fish larvae (Chiffre *et al.* 2016), especially in zebrafish (Kirla *et al.* 2016; Basnet *et al.* 2019) and daily used in some laboratories. The aim of this test is to increase the stress in order to evaluate the behavioral response to different molecules. Different commercial solutions already exist to facilitate the implementation of PMR for researchers (e.g., Xzantiks®, Noldus®, Viewpoint®), but a lack of procedure standardization between lab and organisms is a reality. The lack of standardization is at different levels, even when the same species was used. Regardless of the organisms studied, the identified points that can be improved are the minimum total sample size, the acclimation period, the number of light and dark phases alternation, the measured behaviors and the statistical analysis method (Table 1).

Here, we propose tools for standardizing procedure and statistical analysis of the PMR in organisms. Actually, most of the studies using this test have focused on zebrafish larvae (Table

1). However, researchers are using PMR with various model organisms, including vertebrates and invertebrates. In the present study, an invertebrate model organism was chosen to prove that this test could be used and standardized in the same way no matter the tested organisms: the planaria *Schmidtea mediterranea*. There are several advantages of using planaria for ecotoxicological tests: they are known to be reliable organism for environmental biomonitoring (Knakievicz 2014), can regenerate their brain (Ross *et al.* 2017), are easy and cheap to maintain and raise (Merryman *et al.* 2018).

We set up an experiment to analyze the effect of the antibiotic gentamicin on the behavior of sexual *S. mediterranea* during PMR. Gentamicin is a well-established antibiotic which is still is commonly used especially in the treatment of life-threatening infections caused by Gram negative and Gram-positive bacilli (Mingeot-Leclercq *et al.* 1999), but its therapeutic efficacy is mainly limited by its nephrotoxicity in vertebrates (Quiros *et al.* 2011). A standardized method will be proposed for every identified point that can be improved during the experimental procedure (the minimum total sample size, the acclimation period, the number of light and dark phases alternation, the measured behavior and the statistical analysis behind).

Table 1: Photomotor response assay protocols used by various ecotoxicological studies. In all listed studies, each individual was tested alone. D: Dark; L: Light


| species | studied molecules | sample size / treatment | acclimation condition | 1 st phase condition | number and duration of L/D phases | behavior analysis software | main analyzed behaviors | statistical analysis software | statistical tests | test name | references |
|----------------------|---|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---|-------------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|
| Invertebrates | | | | | | | | | | | |
| <i>Daphnia magna</i> | Diazepam Propranolol carbamazepine fluoxetine | N = 10 | D | D | two 5 min/5 min D/L cycles | Ethovision | Total distance moved (cm) | ? | two-way ANOVA | temporal tracking responses | Simão et al. 2019 |
| | Tebuconazole difenoconazole dimethomorph imidaclopr tolfenpyrad fipronil dinotefuran chlorantranilprole carbaryl cypermethrin fenpropathrin | N = 48 | ? | L | four 10 min / 10 min L/D cycles | Viewpoint | Total distance traveled (mm) burst count rotation count | GraphPad Prism | two-way ANOVA | locomotor activity | Hussain et al. 2020 |

acetamiprid


| | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|------------|--------|---|---|--|------------|-------------------------------|----------------|---------------------------------|--|------------------------|
| <i>Lymnaea stagnalis</i> | Diclofenac | N = 24 | ? | L | one 15 min/15 min L/D cycle + one 15 min L phase | EthoVision | Distance moved (mm/mg) | R | one-way ANOVA Kruskal-Wallis | L stress | Bouly et al.2022 |
| <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | Copper | N = 40 | D | L | four 10 min/10 min L/D cycles | Viewpoint | Total distances traveled (cm) | GraphPad Prism | two-way ANOVA | photo-dependent swimming responses (PDR) | Colón-Cruz et al. 2018 |
| <i>Macrobrachium carcinus</i> | Copper | N = 40 | D | L | four 10 min/10 min L/D cycles | Viewpoint | Total distances traveled (cm) | GraphPad Prism | two-way ANOVA | PDR | Colón-Cruz et al. 2018 |

Vertebrates

| species | studied molecules | sample size / treatment | acclimation condition | 1 st phase condition | number and duration of L/D phases | behavior analysis software | main analyzed behaviors | statistical analysis software | statistical tests | test name | references |
|----------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--|-------------------------------|-------------------|-----------|------------------------|
| <i>Pimephales promelas</i> | Copper | N = 40 | D | L | four 10 min/10 min L/D cycles | Viewpoint | Total distances traveled (cm) | GraphPad Prism | two-way ANOVA | PDR | Colón-Cruz et al. 2018 |
| | caffeine | N = 12 - 24 | D | L | two 10 min/10 min L/D cycles | ViewPoint | distance traveled (mm) change in distance traveled (mm) | Sigma Plot | one-way ANOVA | PMR | Steele et al. 2018a |


 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|--------|---|---|---|------------|---|------------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| <i>Oryzias latipes</i> | Benzo[a]pyrene | N = 30 | D | D | two 10 min/10 min L/D cycles | Ethovision | distance moved (mm) | Statistica | one-way ANOVA | PMR | Perrichon et al. 2014 |
| | benzocaine | | | | | | | | | | |
| | fluoranthene | | | | | | | | | | |
| <i>Oryzias latipes</i> | three PAHs mixtures | N = 36 | D | D | two 20 min / 10 min L/D cycles + one 20 min D phase | Ethovision | velocity (mm/s) | Statistica | one-way ANOVA | PMR | Le Bihanic et al. 2014 |
| | citalopram | N = 30 | D | D | two 10 min /10 min L/D cycles | Ethovision | Distance traveled (mm) time in peripheral zone (s) | Statistica | one-way ANOVA | PMR | Chiffre et al. 2016 |
| | cyamenazine | | | | | | | | | | |
| | fluoxetine | | | | | | velocity (mm/s) | | | | |
| | sertraline valproate | | | | | | | | | | |
| <i>Danio rerio</i> | ethanol | N = 24 | D | D | one 10 min D phase + two 10 min/20 min L/D cycles | Ethovision | total distance moved (cm) | Statview | repeated measures ANOVA | alternating L and D periods | MacPhail et al. 2009 |
| | PFOS | N = 15 | L | L | three 20 min/20 min L/D cycles | ViewPoint | swimming speed (mm/s) | SPSS | one-way ANOVA | response to D-to- L transition | Huang et al. 2010 |
| | ethanol d-amphetamine cocaine | N = 24 | D | D | three 10 min/10 min D/L cycles + one 10 min D phase | Ethovision | distance moved (cm) | Statview | repeated measures ANOVA | locomotor activity | Irons et al. 2010 |

 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | |
|---------|--------|---|---|--|-----------|--|-----|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| ethanol | N = 25 | D | D | one 15 min/15 min D/L cycle + one 15 min D phase | ViewPoint | distance moved (mm/min) duration of movements (s/min) velocity of movements (mm/s) | SAS | repeated Measures ANOVA | locomotor activity assay | de Esch et al. 2012 |
|---------|--------|---|---|--|-----------|--|-----|-------------------------|--------------------------|---------------------|

| species | studied molecule | sample size / treatment | acclimation condition | 1 st phase condition | number and duration of L/D phases | behavior analysis software | main analyzed behaviors | statistical analysis software | statistical tests | test name | references |
|--------------------|--|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|---|----------------------------|---|-------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Danio rerio</i> | BDE-47 | N = 126 | L | L | three 10 min/10 min L/D cycles + one 10 min L phase | ViewPoint | average speed (mm/s) net speed change (mm/s) | SPSS | one-way ANOVA | L stimulation test | Chen et al. 2012 |
| | pentylentetrazole aconitine 4-aminopyridine | N = 36 | D | L | four 10 min/10 min L/D cycles | ViewPoint | distance traveled (cm) | GraphPad Prism | one-way ANOVA | L/D transition | Ellis et al. 2012 |
| | ethanol | N = 11 - 15 | bright L | dim L | one 15 min/5 min dim L/ bright L cycle | ? | response latency (ms) escape response | ? | t test | motor activity | Ramcharit & Ibrahim 2013 |
| | apomorphine SKF-38393 Quinpirole butaclamol | N = 24 - 48 | D | D | one 10 min D phase + two 10 min/20 min L/D cycles | Ethovision | Distance moved (cm) | Statview | repeated measures ANOVA | locomotor activity | Irons et al. 2013 |


 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

SCH-23390
haloperidol

| | | | | | | | | | | |
|--|----------------|---|---|--|------------|--|----------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| Benzo[a]pyrene | N = 30 | D | D | two 10 min/10 min L/D cycles | Ethovision | distance moved (mm) | Statistica | one-way ANOVA | PMR | Perrichon et al. 2014 |
| benzocaine | | | | | | | | | | |
| fluoranthene | | | | | | | | | | |
| PFOS | N = 35 - 46 | L | L | one 10 min/10 min L/D cycle | Matlab | bout frequency (min ⁻¹) distance moved (mm) | Statistica | repeated measures ANOVA | visual motor response (VMR) | Spulber et al. 2014 |
| Halogenated and prganophosphate flame retardants | N = 6 - 32 | ? | L | one 5 min/5 min L/D cycle + one 5 min/5 min D/L cycle | ViewPoint | total movement (mm) | R | Kruskal-Wallis | PMR | Noyes et al. 2015 |
| Chlorpyrifos 6-OH-BDE-47 | N = 34 - 46 | D | L | two 10 min/10 min L/D cycles | Ethovision | mean distance traveled (mm) | Superanova | repeated measures ANOVA | alternating periods of L and D | Macaulay et al. 2015 |
| Chlorpyrifos | N = 40 | L | D | two 10 min/10 min D/L cycles | ViewPoint | distance (mm) | StatView | ANOVA | L change stimulus | Jin et al. 2015 |
| Yohimbine | N = 32 | L | L | one 40 min L phase + three 10 min/5 min | ViewPoint | total distance moved (mm) | GraphPad Prism | one-way ANOVA t tests | VMR | Li et al. 2015 |


L/D cycles

| species | studied molecules | sample size / treatment | acclimation condition | 1 st phase condition | number and duration of L/D phases | behavior analysis software | main analyzed behaviors | statistical analysis software | statistical tests | test name | references |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|--|----------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------|---|-----------------------|
| <i>Danio rerio</i> | Ethanol | N = 32 | L | L | three 10 min/5 min L/D cycles | ViewPoint | distance moved (mm/min) | GraphPad Prism | repeated-measures two-way ANOVA | Locomotor activities in response to L changes | Guo et al. 2015 |
| | cocaine | N = 24 | ? | D | three 10 min/5 min L/D cycles + one 10 min D phase | ViewPoint | duration of the movement distances traveled (mm) | R | repeated measures ANOVA | Locomotor activity | Kirla et al. 2016 |
| | Diphenylhydantoin | N = 32 | L | L | one 30 min/5 min L/D cycle | ViewPoint | distance moved (mm/min) | GraphPad Prism | one-way ANOVA t tests | illumination challenge from L to D | Liu et al. 2016 |
| | Ag ⁺ AgNPs | N = 30 | L | D | nine 5 min/5 min D/L cycles | ViewPoint | continuous movements non-ambulatory movements inactivity | SPSS | one-way ANOVA | PMR | Asmonaite et al. 2016 |


 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|---|---|---------------------|------------|------------------------------|----------------|---------------------------------|---|--------------------|
| Pentylentetrazole | N = 32 | L | L | three 10 min/5 min | ViewPoint | total distance moved (mm) | GraphPad Prism | two-way repeated measures ANOVA | L-D transitions | Peng et al. 2016 |
| γ -aminobutyrate | | | | L/D cycles | | | | | | |
| Diazinon | N = 20 | D | L | two 4 min/4 min | EthoVision | total distance moved (mm) | R | Kruskal-Wallis | light-dark transition (LDT) test | Velki et al. 2017 |
| diuron | | | | L/D cycles | | | | | | |
| Menadione | N = 32 - 64 | L | D | nine 5 min/5min | ViewPoint | total distance traveled (mm) | SYSTAT | one-way ANOVA | swimming activity during L and D cycles | Thit et al. 2017 |
| Copper ions | | | | D/L cycles | | | | Kruskal-Wallis | | |
| copper nanoparticles | | | | | | | | | | |
| TBBPA | N = 48 - 96 | D | L | one 20 min L phase | ViewPoint | Total distance traveled (mm) | R | Linear mixed effect models | locomotor activity | Fraser et al. 2017 |
| BPA | | | | + one 10 min/10 min | | time active (s) | | | | |
| fluvestrant | | | | D/L cycle | | | | | | |
| flutamide | | | | | | | | | | |
| fadrozole | | | | | | | | | | |
| EE2 | | | | | | | | | | |

| species | studied molecules | sample size / treatment | acclimation condition | 1 st phase condition | number and duration of L/D phases | behavior analysis software | main analyzed behaviors | statistical analysis software | statistical tests | test name | references |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------|
| <i>Danio rerio</i> | pentylentetrazole Picrotoxin | N = 32 | L | L | one 5 min/5 min L/D cycle | ViewPoint | distance moved (mm) | GraphPad Prism | two-way repeated measures ANOVA | transition from L to D | Yang et al. 2017 |


 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------------|---|---|--|------------|--|----------------|--------------------------------|---|-------------------------|
| Tributyltin | N = 16 - 20 | D | D | two 10 min/10 min D/L cycle + one 10 min D phase | Ethovision | Total distance moved (mm) Velocity (mm/s) Activity (%) Turn angle (deg) | SPSS | one-way ANOVA | locomotor activity | Liang et al. 2017 |
| ethosuximide | N = 32 | ? | L | one 50 min L phase + three 10 min/5 min L/D cycles | ViewPoint | distance traveled (mm/min) | GraphPad Prism | two-way ANOVA | alternating light/dark illumination | Ji et al. 2017 |
| Venlafaxine | N = 103- 107 | D | L | eight 7.5/7.5 min L/D cycles | ViewPoint | Total distance moved (mm) | GraphPad Prism | one-way ANOVA two-way ANOVA | alternating cycles of light and dark | Thompson et al. 2017 |
| 1-heptanol phenol R-(-)-carvone citalopram diazinon pentylentetrazole xylazine | N = 12 - 24 | D | L | two 10 min/10 min L/D cycles | ViewPoint | distance traveled (mm) change in distance traveled (mm) | Sigma Plot | one-way ANOVA | PMR | Steele et al. 2018b |
| 6-OH-BDE-47 6-MeO-BDE-47 | N = 19 - 20 | L | D | two 10 min/10 min D/L cycles | ViewPoint | total locomotion distance (cm/10 min) | GraphPad Prism | repeated-measures ANOVA | locomotion test | Zhang et al.2018 |
| arsenic | N = 25 | D | D | two 10 min/10 min D/L cycles + one 10 min D phase | LoliTrack | total distance (cm) | StatView | repeated-measures ANOVA | motor activity | Dipp et al.2018 |


 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | | |
|--|--|----------------|---|---|-----------------------------------|-----------|---|----------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| | MK-801 pentylentetrazole valproic acid yohimbine hydrochloride diphenylhydantoin sulpiride | N = 32 | L | L | one 10 min/5 min L/D cycle | ViewPoint | distance moved (mm) | GraphPad Prism | two-way repeated measures ANOVA | locomotor activity | Li et al. 2018 |
| | Caffeine | N = 12 - 24 | D | L | two 10 min/10 min L/D cycles | ViewPoint | distance traveled (mm) change in distance traveled (mm) | Sigma Plot | one-way ANOVA | PMR | Steele et al. 2018a |

| species | studied molecules | sample size / treatment | acclimation condition | 1st phase condition | number and duration of L/D phases | behavior analysis software | main analyzed behaviors | statistical analysis software | statistical tests | test name | references |
|--------------------|--|--|--------------------------------|---------------------------------------|--|--|--|--|--|---|--|
| <i>Danio rerio</i> | 1-heptanol phenol R-(-)-carvone citalopram diazinon pentylentetrazole xylazine polystyrene microplastics | N = 12 - 24 N = 32 | D D | L L | two 10 min/10 min L/D cycles three 10 min/10 min L/D cycles | ViewPoint ViewPoint | distance traveled (mm) change in distance traveled (mm) distances traveled (cm) average speed (mm/s) | Sigma Plot GraphPad Prism | one-way ANOVA one-way ANOVA | PMR L-to-D photoperiod stimulation assay | Steele et al. 2018b Qiang & Chen 2019 |


 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------|-----------|---|---|------------|--|----------------|---------------------------------|---|----------------------|
| Nicotine | N = 16 | D/L cycle | D | two 20 min/10 min D/L cycles | ViewPoint | total distance moved (mm) per min | R | overlap of Confidence Intervals | L-D transition locomotor response (LMR) | Leuthold et al. 2019 |
| dichloroaniline | | | | | | | | | | |
| bisphenol A | | | | | | | | | | |
| cyprodinil | | | | | | | | | | |
| diclofenac sodium | | | | | | | | | | |
| endosulfan | | | | | | | | | | |
| fipronil | | | | | | | | | | |
| naproxen sodium | | | | | | | | | | |
| triphenylphosphate | | | | | | | | | | |
| diazinon | | | | | | | | | | |
| diuron | | | | | | | | | | |
| imidacloprid | | | | | | | | | | |
| isoproturon | | | | | | | | | | |
| pyrimethanil | | | | | | | | | | |
| nonylphenol | | | | | | | | | | |
| citalopram hydrobromide | | | | | | | | | | |
| venlafaxine | | | | | | | | | | |
| fluoxetine | N = 19 | L | L | six 10 min/10min L/D cycles + one 10 min L phase | Ethovision | total distance moved (cm/min) maximum velocity | GraphPad Prism | Kruskal-Wallis | VMR | Zindler et al. 2020 |
| citalopram | | | | | | | | | | |

 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*


| | | | | | | | | | | |
|---------------------|-------------|---|---|------------------|------------|--------------------------|----------------|---------------|----------|--------------------|
| naphthenic | N = 16 - 20 | L | D | two 4 min/10 min | Ethovision | mean distance moved (mm) | GraphPad Prism | one-way ANOVA | LDT test | Johann et al. 2020 |
| North Sea crude oil | | | | D/L cycles | | | | | | |
| marine gas oil | | | | | | | | | | |
| Finasol | | | | | | | | | | |

| species | studied molecules | sample size / treatment | acclimation condition | 1 st phase condition | number and duration of L/D phases | behavior analysis software | main analyzed behaviors | statistical analysis software | statistical tests | test name | references |
|--------------------|--|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---|-------------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| <i>Danio rerio</i> | Tebuconazole difenoconazole dimethomorph imidaclopr tolfenpyrad fipronil dinotefuran chlorantranilprole carbaryl cypermethrin fenpropathrin acetamiprid | N = 48 | ? | L | four 10 min / 10 min L/D cycles | Viewpoint | Total distance traveled (mm) burst count rotation count | GraphPad Prism | two-way ANOVA | Locomotor activity | Hussain et al. 2020 |


 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | | |
|--|---|-------------|---|---|-------------------------------|-----------|--|----------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| | 2,4-D | N = 20 | L | L | four 2 min/2min L/D cycles | ViewPoint | swimming distance (mm) relative small distance (%) relative large distance (%) relative swimming time (%) | SPSS | one-way ANOVA | Locomotor activity | Gaaied et al. 2020 |
| | Propamocarb | N = 30 | L | D | two 10 min/10 min D/L cycles | ViewPoint | swimming distance (mm) | StatView | ANOVA | L-to-D photoperiod stimulation assay | Liu et al. 2020 |
| | PFOS | N = 6 - 32 | L | L | one 10 min/10 min L/D cycle | ViewPoint | cumulative time spent active (s) | R | linear mixed effect | LDT test | Christou et al. 2020b |
| | pollutants mixture dantrolene caffeine | | | | | | cumulative distance traveled (mm) average swimming speed (mm/s) | | | | |
| | dimethyl sulfoxide methanol | N = 32 - 47 | L | L | one 10 min/10 min L/D cycle | ViewPoint | cumulative time spent active (s) | R | linear mixed effect | LDT test | Christou et al. 2020a |
| | methylene blue flutamide citalopram diazinon PFOS | | | | | | cumulative distance traveled (mm) average swimming speed (mm/s) | | | | |

| species | studied molecules | sample size / treatment | acclimation condition | 1 st phase condition | number and duration of L/D phases | behavior analysis software | main analyzed behaviors | statistical analysis software | statistical tests | test name | references |
|---------|-------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------|-----------|------------|
|---------|-------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------|-----------|------------|

 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|--------|---|---|--------------------------------|--|-----------------------|------------------------------------|---|-------------------------|---------------------|
| Danio rerio | Acetylsalicylic acid | N = 30 | L | D | five 1 min/1 min D/L cycles | EthoVision | swimming speed (cm/s) | SPSS | unpaired t-test Mann–Whitney test | LMR | Hong et al. 2021 |
| | Ibuprofen | | | | | | | | | | |
| | Naproxen | | | | | | | | | | |
| | Bezafibrate | | | | | | | | | | |
| | Clofibrate | | | | | | | | | | |
| | Gemfibrozil | | | | | | | | | | |
| | Fluoxetine | | | | | | | | | | |
| | Citalopram | | | | | | | | | | |
| | Venlafaxine | | | | | | | | | | |
| | Amitriptyline | | | | | | | | | | |
| | Sertraline | | | | | | | | | | |
| | Vortioxetine | | | | | | | | | | |
| | Paroxetine | | | | | | | | | | |
| | Fluvoxamine maleate | | | | | | | | | | |
| MPTP | N = 24 | D | L | three 3 min/3 min L/D cycles | ViewPoint | distance traveled (mm) swimming speed (mm/s) activity time (%) | GraphPad Prism | two-way repeated measures ANOVA | L/D locomotor response assay | Dong et al. 2022 | |
| Diazinon dimethoate methomyl | N = 48 | L | L | two 10 min/10 min L/D cycles + one 10 min L phase | EthoVision | distance moved (mm) | GraphPad Prism | one-way ANOVA Kruskal–Wallis | LDT test | Könemann et al. 2022 | |

 *Chapitre II : Développement et harmonisation d'indicateurs comportementaux*

| | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------|-----------|---|-------------------|-----------|----------------------------------|---|----------------|----------|-----------------------|
| pirimicarb | | | | | | | | | | |
| imidacloprid | | | | | | | | | | |
| thiacloprid | | | | | | | | | | |
| Diazinon | N = 12 | L/D cycle | L | one 10 min/10 min | ViewPoint | total distance moved (cm/min) | R | one-way ANOVA | LDT test | Haigis et al. 2022 |
| aldicarb | | | | L/D cycle | | | | Kruskal-Wallis | | |
| paraoxon-ethyl | | | | | | time moved (s/min) | | | | |
| dichlorvos | | | | | | | | | | |
| paraoxon-methyl | | | | | | | | | | |
| DEHP | | | | | | | | | | |
| MEHP | | | | | | | | | | |
| TDCPP | | | | | | | | | | |
| 4-NP | | | | | | | | | | |

2. Materials and Methods

2.1. Planarian care

Asexual strain of *Schmidtea mediterranea* was obtained from Max Planck Institute for biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany) and was kept in 400mL in 1X Montjuïc salts water (1.6 mM NaCl, 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM KCl, 1.2 mM NaHCO₃ in deionized water, pH~7.5) in glass Tupperware containers, and raised in a Lovibond® Thermostatic Cabinet Model TC 140 G, 135 L, permanently set at 20°C, in the dark. Worms were exposed to light only when fed or cleaned in a room permanently set at 20°C. Planaria were fed once a week with organic calf liver paste (Merryman *et al.* 2018) and washed twice a week. Worms were starved for at least 5 days prior to use in experiments in order to be in a homogeneous metabolic state. For all experiments, fully regenerated planarians found gliding normally in the container were randomly selected and checked for abnormality on a Leica S8 APO, *Greenough stereo microscope*.

2.2. Exposure to chemical compound

2.2.1. Standardization method n°1: define minimum total sample size

When the sample size is small, biologically interesting phenomena may be missed because statistical tests are unlikely to yield statistically significant results (Thomas & Juanes 1996). Before starting an experiment, it is important to plan the number of tested individuals that enables enough statistical power analysis. To define the minimum total sample size that allows satisfying power for statistical analysis of the PMR (minimum power = 0.8; (Cohen 1988)), we propose to use *a priori* power analysis tests. Different open alternatives exist, such as R packages like the SIMR package (Green and MacLeod 2016) or the MBESS package (Kelley 2007). Here, we chose the G Power software. This type of software is recommended for sample size and power calculations for various statistical methods (Kang 2021). Briefly, the process consists in selecting appropriate family and statistical tests, selecting *a priori* power analysis method, inputting different parameters for analysis (effect size, α -error, statistical power, number of groups, number of measurements) and selecting the ‘calculate’ button (Fig. 1).

In the present study, linear mixed models (LMMs) were performed to investigate the effect of gentamicin exposure (categorical variable) and light/dark conditions (categorical variable) on total distance traveled by asexual planarians (see section 2.4.1.). As LMM cannot be chosen

in statistical test options, we selected repeated measures ANOVA with within-between interaction (family test: F). We chose an α -error = 0.05, a medium effect size $f = 0.8$ (Cohen 1988), three groups (i.e., gentamicin treatment; see section 2.2.2), four measurements (i.e., light/dark cycles; see section 2.3.2.), and we supposed a correlation among repeated measures $\rho = 0.5$ and nonsphericity correction $\epsilon = 1$ (default software parameters). The resulting total sample size given by the software (version 3.1.9.6) was $N = 30$ (Fig. 1). We increased total sample size by 20% to consider a possible lethal effect of gentamicin on planarians. Final total sample size was $N = 36$ (i.e., $N = 12$ individuals per treatment).

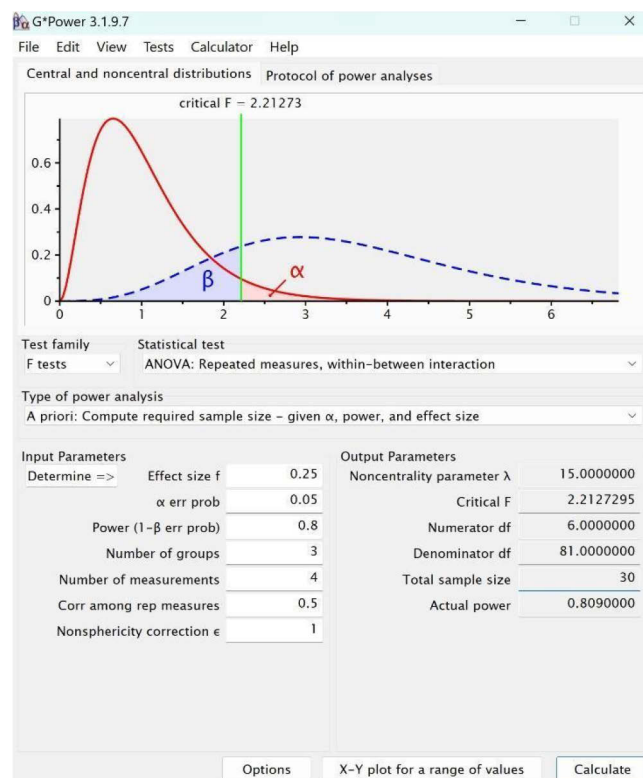


Figure 1: Main window of G*Power software that was used to calculate *a priori* total sample size with medium effect size ($f = 0.25$), α error = 0.05, medium statistical power ($1 - \beta = 0.8$), three groups (control group and two gentamicin concentrations), four measurements (two light/dark cycles), correlation among repeated measures ($\rho = 0.5$) and nonsphericity correction ($\epsilon = 1$).

2.2.2. Exposure to gentamicin

To investigate the influence of exposure to gentamicin on planaria locomotion behavior during PMR, asexual worms were transferred into 1 L beakers and were randomly assigned to one of the three following treatments: individuals ($N = 36$) were exposed either to 0 mg.L^{-1} (control; $N = 12$), 12.5 mg.L^{-1} ($N = 12$) or 25 mg.L^{-1} ($N = 12$) of gentamicin (purchased from

Sigma-Aldrich, Inc., reference number: 45614). Individuals were exposed for three weeks before performing behavioral observations and water was renewed once a week. Literature about bioavailability of gentamicin is scarce, but this it was previously referred to be stable upon different environmental conditions (light, humidity, oxidation and heat) for 30 days (Mullins et al. 2016). We considered that our exposure protocol allows our real concentrations to be close to the nominal concentration. Planarians were not fed during the entire experiment.

2.3. PMR

2.3.1. Standardization method n°2: assay acclimation

All behavioral tests were performed in a dedicated chamber with controlled temperature (20 °C) and day: night parameters (same as in the raising room). For behavioral experiments, planarians were transferred into the behavioral room at least one hour before the test in a beaker, placed into the experimental set up and were allowed to acclimate for 3 minutes before recording.

We first advise that behavioral observations take place during the optimum locomotor activity of the model species to minimize potential effect of circadian rhythm on behavior. Here, all tests were performed from 8:30 am to 1:00 pm according to planarian locomotor activity over 24h (Martinez *et al.* 2020).

We then recommend setting up the acclimation period under the lighting conditions preferred by the study model. As planarians are insensitive to infra-red light (Marriott 1958, Paskin *et al.* 2014), the animals were placed on an infra-red floor (80 × 80 × 15 cm) built in PVC with infra-red and visible light emitted from below (Marriott 1958, Paskin *et al.* 2014) with four infrared spot (48 LED each for security camera) and four LED spot spots (LED 6 W RGB 27,000 K). This enables the camera to track the individuals' location at any time (light and dark conditions) without interfering with their behavior.

2.3.2. Standardization method n°3: number and duration of light/dark cycles

We recommend setting up the first phase to the same conditions as the acclimation period to record baseline locomotor behavior. It obviously depends on the model species that is used for the experiment. Here, phase 1 was a light condition (Light 1) as planarians were acclimated

under light. Some organisms could acclimate in the dark, but the first phase must also take place in the darkness.

We also advise setting up at least two light/dark cycles to ensure repeatable behavior responses during tests but avoid more than four cycles to minimize habituation phenomenon (Grissom and Bhatnagar 2009). Duration of each phase should be equivalent but can vary depending on the species. Planaria locomotion behavior was individually recorded for 20 min in plastic Petri dishes (d x H: 100 x 15 mm; 20 ml) with two light /dark phases alternation every 5 min: a first light/dark cycle (referred to as Light 1: 'L1' and Dark 1: 'D1') followed by a second light/dark cycle (referred to as Light 2: 'L2' and Dark 2: 'D2').

2.3.3. Standardization method n°4: recorded data

The video tracking software EthoVision XT™ (Wageningen, the Netherlands) was used to automatically calculate locomotion behavior of each animal (12 Petri dishes containing one individual were observed at the same time). Distance traveled by individuals was continuously recorded in mm/10s and then summed across each of the 5 min phases for analysis. In species in which individuals' body size can be easily measured (i.e., non soft-bodied animals), we recommend to convert total distance traveled by animals in units of body length (calculated as 'total distance traveled / body length'). In the present study, the particularly elastic morphology of planaria makes it difficult to measure its exact body length. Nonetheless, only individuals around 10 mm size were collected to minimize size variation between treatments.

2.4. Statistical analysis: linear mixed models (LMM)

2.4.1. Standardization method n°5: choose the right statistical test

One main difference that makes results from PMR difficult to be compared between studies is the software and the statistical test used (see Table 1). During these tests, the behavior of animals recorded during sequential light/dark phases is not independent from each other. We therefore recommend performing LMM to investigate the effect of treatment (exposure to chemical), light/dark condition and their interaction on locomotion behavior, using individual identity as a random factor (Wang and Goonewardene 2004).

We used this procedure to explore the effect of gentamicin treatment, light/dark condition and their interaction on total distance traveled by planarians, using individual identity as a random factor. Statistical data analyses were performed with the software R (version 4.2.1; R core team 2022), using $\alpha = 0.05$; Supplementary material).

2.4.2. Data transformation (if needed)

Because the response variable (i.e., total distance traveled) was not normally distributed in the present study, data was transformed to meet standard assumptions. To find the best transformation to apply, we used the ‘bestNormalize’ function (R package ‘bestNormalize’): the ordered quantile normalization transformation (‘orderNorm’ function) was chosen (Supplementary material). When data transformation does not allow normalization of residuals (e.g., data with a lot of zeros), we advised to use generalized linear mixed model (GLMM) by choosing the distribution that fit residuals of the selected model (e.g., GLMM with zero/one-inflated beta distribution in the case of data with a lot of zeros).

2.4.3. Model selection

For all analyses, we started with the maximal model and removed nonsignificant interaction to test the significance of main effects. Chi-square statistics were calculated using the ‘Anova’ function (package car), which performs type 2 analysis of variance for LMM, that is, invariant to the order in which effects are entered into the model (Fox and Weisberg 2019; Supplementary material). Note that other methods exist to select the best model, such as model selection based on the Akaike Information Criterion (Portet 2020).

2.4.4. Post hoc analysis

When significant effects were found, post hoc multiple comparison tests were run thanks to the ‘emmeans’ function (R package ‘emmeans’) to establish which modalities significantly differed from each other (Supplementary material).

2.4.5. Reporting statistical results

For better accessibility to statistical information and easier comparison of results between studies, we recommend reporting the means and standard errors or confidence intervals for each tested group at least in the text, and reporting the values of the estimates in a table summarizing the results of the best selected model.

3. Results

Table 2: Effect of exposure to gentamicin and light/dark condition on distance traveled by asexual *S. mediterranea* during photomotor response assay. P values of significant explanatory variables are highlighted in bold font.

| Factors affecting locomotion behavior | Estimates | SE | df | χ^2 | P |
|---------------------------------------|-----------|------|----|----------|-------------------|
| Intercept (D1; 0 mg.L ⁻¹) | -0.5703 | 0.27 | | | |
| | | 33 | | | |
| Light/dark condition | | | 3 | 22.0 | < 0.001 |
| | | | | 4 | |
| D2 | -0.1732 | 0.18 | | | |
| L1 | 0.6903 | 0.18 | | | |
| L2 | 0.1163 | 0.18 | | | |
| | | 95 | | | |
| | | 95 | | | |
| Treatment | | | 2 | 4.26 | 0.12 |
| 12.5 mg.L ⁻¹ | 0.7128 | 0.38 | | | |
| 25 mg.L ⁻¹ | 0.5496 | 0.38 | | | |
| | | 65 | | | |
| | | 65 | | | |
| Light/dark condition * Treatment | | | 6 | 15.7 | 0.015 |
| | | | | 8 | |

| | | | |
|--------------------|-----------|---------|------|
| | D2 * 12.5 | 0.2267 | 0.26 |
| mg.L ⁻¹ | | -0.6889 | 79 |
| | L1 * 12.5 | 0.1158 | 0.26 |
| mg.L ⁻¹ | | | 79 |
| | L2 * 12.5 | 0.1690 | 0.26 |
| mg.L ⁻¹ | | -0.2005 | 79 |
| | D2 * 25 | 0.3322 | 0.26 |
| mg.L ⁻¹ | | | 79 |
| | L1 * 25 | | 0.26 |
| mg.L ⁻¹ | | | 79 |
| | L2 * 25 | | 0.26 |
| mg.L ⁻¹ | | | 79 |
| Residuals | | | 24 |
| Total | | | 35 |

Locomotion behavior of asexual planarians was significantly influenced by interaction between light/dark condition and gentamicin treatment (Table 2). Worms traveled the same distance whatever the light/dark condition when they were exposed to gentamicin at both 12.5 mg.L⁻¹ (mean ± SE = 406.30 ± 16.62 mm; all P > 0.05) and 25 mg.L⁻¹ (399.74 ± 19.09 mm; all P > 0.05; Fig. 2). However, control individuals traveled significantly more distance at L1 condition (334.81 ± 65.53 mm) compared to D1 (228.58 ± 57.03 mm; P < 0.1), L2 (229.33 ± 72.88 mm; P = 0.02) and D2 conditions (192.40 ± 66.02 mm; P < 0.001), whereas no significant difference was found between D1, L2 and D2 conditions (all P > 0.05; Fig. 2).

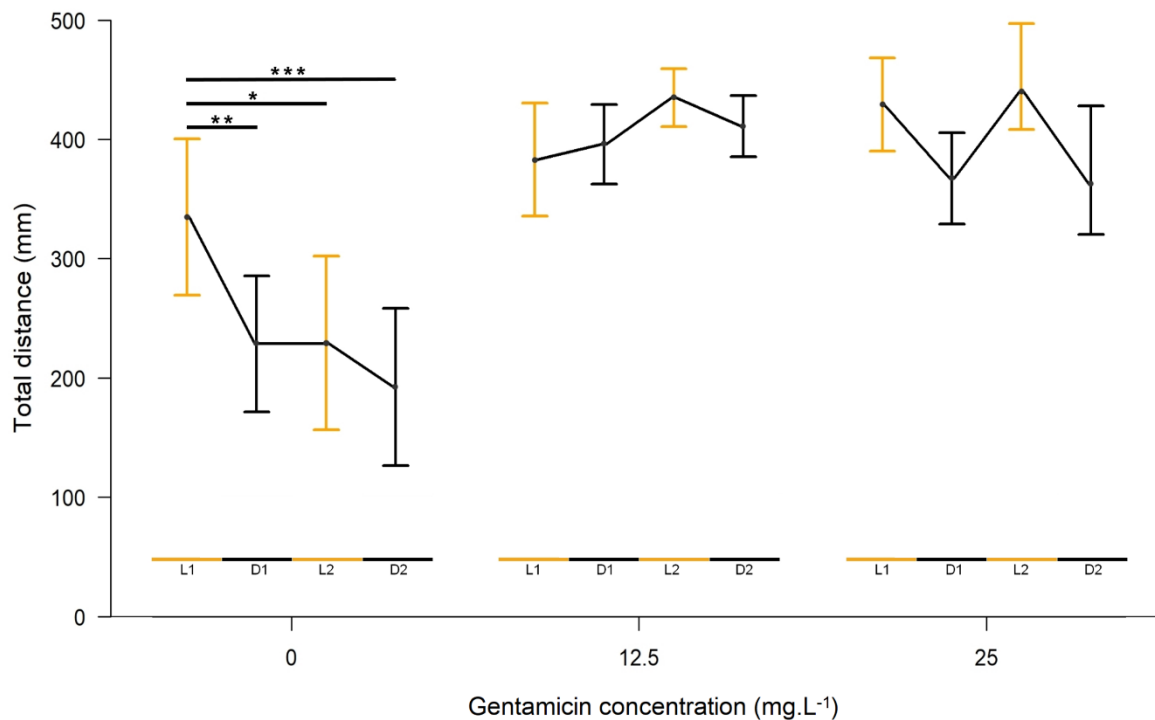


Figure 2: Mean (\pm SE) total distance traveled by asexual *S. mediterranea* during photomotor response assay according to gentamicin concentration (N = 12 for 0, 12.5 and 25 mg.L⁻¹) and light (yellow lines)/dark (black lines) condition (L1, D1, L2, D2). *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

4. Discussion

PMR is commonly used in ecotoxicological studies as behavioral assessment of animals' response to specific molecules, especially with zebrafish because it has been demonstrated that photic input directly modulates activity levels in larvae (Burgess and Granato 2007). The alternation of light and dark phases leads to reproducible sinusoidal curves response in locomotion. The same pattern of response is observed in other vertebrate species such as *Pimephales promelas* (Colón-Cruz et al. 2018, Steele et al. 2018), *Oryzias latipes* (Le Bihanic et al. 2014, Perrichon et al. 2014, Chiffre et al. 2016) but also in invertebrates such as snails (Bouly et al. 2022), shrimps (Colón-Cruz et al. 2018) or daphnia (Simão et al. 2019, Hussain et al. 2020). Nevertheless, the great variability in the experimental methods used makes results comparison difficult both between and within species. By studying the effects of the antibiotic gentamicin on the behavioral response to light/dark stimulus in the asexual planaria *Schmidtea mediterranea*, our work aimed to propose different tools to standardize PMR procedure.

Standardization processes are very important and are fast growing, especially with OECD guidelines including guidelines for the testing of chemicals (OECD 2013). In different fields,

work has started to be done for standardization in addition to OECD guidelines (Wahlsten 2001; Grebe and Schaeffer 1991) and sometimes also for behavioral tests (Neuwirth *et al.* 2022) even if some studies related that too much standardization is not always an answer. Two studies recommended “the use of systematic heterogenization of study samples and conditions by actively incorporating biological variation into study design, through diversifying study samples and conditions.” (Richter *et al.* 2009; Voelkl *et al.* 2020). In the case of ecotoxicological studies involving PMR, the standardization is relevant to i) improve the analysis of the data, ii) make the results easier to compare both between and within species, and iii) find it more easily in databases like pubmed or web of sciences (Hanson *et al.* 2017). In addition, awareness of animal experimentation has increased over the last decade and the 3R principle (Replace, Reduce, Refine; and sometimes 4R rules including Recycle) are now very important to take into account. That is why we proposed to calculate *a priori* the total sample size; **Standardization method n°1**). It is also a good argument to justify the choice of total sample size to an animal ethics committee when planning an experiment.

In the present work, we highlighted the lack of standardization of the PMR procedure. We made an inventory of 55 ecotoxicological publications using this test and we combined all the data we found, including all species, methods and statistical analysis (Table 1). Most studies concern vertebrates (93%, 51 studies) and especially zebrafish (82%, 45 studies), but only 7% (4 studies) involved invertebrates. **If PMR may be a suitable test for many species, this shows an important bias toward fish models in the literature.**

Regarding the behavioral analysis software, 65% (N = 36 studies) were realized with Viewpoint, 29% (N = 16) with Ethovision and 6% left used lolitrack, matlab or unspecified program. **Authors can choose any of these solutions as soon as they are able to accurately estimate the distance moved (Standardization method n°4)**. The methods followed during the test are also very different between studies, with 45% (N = 25) setting up the same acclimation phase and first phase (for example light for acclimation and light for the first phase) whereas 38% (N =21) used a first phase different from acclimation period (for example light during acclimation and dark during the first phase). In addition, in 16% (N = 9) of the studies, we were not able to identify that specific point. **We recommend using the same light condition for both acclimation and first phase (Standardization method n°2) to ensure that behavior recorded during the first phase is not a reaction to change in light condition. Then, the impact of this change can be evaluated with the first light/dark transition.** Similar analyses were shown regarding the number of light/dark alternation and also the

duration of each period. For example, we found 52 publications in zebrafish with 9 different time intervals ranging between 1 and 20 min (e.g., (Huang *et al.* 2010; de Esch *et al.* 2012; Thompson *et al.* 2017; Yang *et al.* 2017; Gaaied *et al.* 2020; Hussain *et al.* 2020; Hong *et al.* 2021; Dong *et al.* 2022) and repeated light/dark alternation range between 1 and 9 times (e.g., MacPhail *et al.* 2009; Chen *et al.* 2012; Thit *et al.* 2017; Thompson *et al.* 2017; Dipp *et al.* 2018; Gaaied *et al.* 2020; Zindler *et al.* 2020; Hong *et al.* 2021). In some studies, intervals were not similar in each period (MacPhail *et al.* 2009; Irons *et al.* 2013; Ramcharitar and Ibrahim 2013; Guo *et al.* 2015; Li *et al.* 2015; Kirla *et al.* 2016; Liu *et al.* 2016; Peng *et al.* 2016; Fraser *et al.* 2017; Ji *et al.* 2017; Li *et al.* 2018; Leuthold *et al.* 2019) with usually a longer period at the first phase. **We do not suggest a specific interval of time between two periods because it might be too much species-dependent, but we encourage authors to keep similar intervals of time for similar species. However, we recommend to repeat light/dark alternation at least 2 times (Standardization method n°3).**

The software and the statistical test performed for statistical analysis are also very different between studies. The main software used for PMR was GraphPad Prism (36%, N = 20 studies) followed by R (16%, N = 9), SPSS and Statview (11% each, N = 6), Statistica (9%, N = 5), Sigma Plot (7%, N = 4) and the rest used SAS, Superanova, Systat or an unspecified software (10 % in total, N_{tot} = 5). **We advise using R as it is an open-source software and we suggest a standardized R script that describes data analysis procedure (Standardization method n°5).** Moreover, of 55 studies, we counted 8 different statistical tests that were used but only 30% of them considered the light/dark phases alternation as non-independent measures (repeated measures ANOVA: 25%, N = 14; LMM: 5%, N = 3). **These tests should be used to take into account the repeated measures for each individual (considered as a random factor; Standardization method n°5).**

Finally, even the name of the test is not clear in publications. We found more than 12 names for the same test. The most common only referred to “locomotor activity” in 15 studies (27%) because the test has no specific name. We noted L/D transition test (LDT) or similar words in 14 studies (25%), PMR for photomotor response assay in 10 studies (18%), and we also noticed VMR for visual motor response in 3 studies (5%). **We recommend using PMR in the future** because LDT might be mixed up with the light/dark preference test that consists in measuring animal preference for a dark or a light zone in the same experimental arena (Steenbergen *et al.* 2011, Banasikowski *et al.* 2015).

Following our proposition of PMR procedure standardization, we investigated the impact of gentamicin on locomotion behavior in response to light/dark conditions in the asexual planaria *Schmidtea mediterranea* as a proof of concept. Gentamicin is an effective antibiotic (Pormohammad *et al.* 2022) commonly used for treating infection in organisms including humans, but is sometimes associated with antibioresistance problems (Gaman *et al.* 1976). Gentamicin presence has been reported in the environment (e.g. Elliott *et al.* 2017) but its effects on non-target organisms are not very well known. In invertebrates, Beier *et al.* (1994) showed that concentrations of gentamicin above 0.1% had deleterious effects on survival and ability to digest blood meals in mosquitoes. In addition, Lomba *et al.* (Lomba *et al.* 2019, 2020) found little evidence of gentamicin toxicity in *D. magna* as well as in the vertebrate *D. rerio*. In the case of planaria, gentamicin is sometimes diluted in the water to prevent planaria disease. Here, we demonstrated that gentamicin exposure negatively affected behavioral responses of *S. mediterranea* to light/dark stimuli. The mechanisms behind gentamicin effect in planaria needs more investigations, but a previous study found that sensorimotor deficiencies and reduced locomotor activity after gentamicin administration in rats were associated with the disruption of gamma-aminobutyric acid (GABA; Abd-Elhakim *et al.* 2021), an inhibitory neurotransmitter that is conserved between planaria and vertebrates (Eriksson *et al.* 1995; Rawls *et al.* 2007). We encourage further studies to explore the molecular mechanisms underlying the influence of gentamicin on behavioral response to light/dark stress. Overall, our study showed that PMR is a useful test to detect potential negative effects of specific molecules on invertebrate species.

5. Conclusion

Based on the review of the literature in ecotoxicology, we proposed five different tools to fill the lack of PMR standardization. Following this procedure, we found that exposure to antibiotic gentamicin impaired locomotion behavior response to change in light/dark condition in asexual planaria *Schmidtea mediterranea*. Our experiment showed that standardized PMR is suitable for testing potential negative effects of specific molecules in invertebrate species. Future research would benefit to follow this standardization procedure to facilitate results comparisons between experimental works and to improve the quality of ecotoxicology studies (Hanson *et al.* 2017).

Acknowledgements: This work was supported by Region Occitanie FRANCE who provided a PhD grant to L.R. and the Foundation Fyssen (FR), which provided a postdoctoral grant to A.M.

References

- Abd-Elhakim, Y. M., *et al.* (2021). "Curcumin mitigates neurotoxic and neurobehavioral changes of gentamicin and sodium salicylate in rats by adjusting oxidative stress and apoptosis." Life Sci **265**: 118824 DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118824.
- Adamatzky, A., *et al.* (2014). "Slime mould analogue models of space exploration and planet colonisation." JBIS - Journal of the British Interplanetary Society **67**: 290-304.
- Agbohessi, P. T., *et al.* (2013). "Acute toxicity of agricultural pesticides to embryo-larval and juvenile African catfish *Clarias gariepinus*." Arch Environ Contam Toxicol **64**(4): 692-700 DOI: 10.1007/s00244-012-9871-3.
- Banasikowski, T. J., *et al.* (2015). "Repeated exposure of male mice to low doses of lipopolysaccharide: dose and time dependent development of behavioral sensitization and tolerance in an automated light-dark anxiety test." Behav Brain Res **286**: 241-248 DOI: 10.1016/j.bbr.2015.03.004.
- Basnet, R. M., *et al.* (2019). "Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology." Biomedicines **7**(1) DOI: 10.3390/biomedicines7010023.
- Beier, M. S., *et al.* (1994). "Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae)." J Med Entomol **31**(4): 561-565 DOI: 10.1093/jmedent/31.4.561.
- Bouly, L., *et al.* (2022). "Long-term exposure to environmental diclofenac concentrations impairs growth and induces molecular changes in *Lymnaea stagnalis* freshwater snails." Chemosphere **291**(Pt 3): 133065 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.133065.
- Bownik, A. and Wlodkowic, D. (2021). "Applications of advanced neuro-behavioral analysis strategies in aquatic ecotoxicology." Science of The Total Environment **772**: 145577 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145577>.

- Burgess, H. A. and Granato, M. (2007). "Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation." Journal of Experimental Biology **210**(14): 2526-2539 DOI: 10.1242/jeb.003939.
- Chen, X., *et al.* (2012). "BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish." Aquat Toxicol **120-121**: 35-44 DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.04.014.
- Chiffre, A., *et al.* (2016). "Psychotropic drugs in mixture alter swimming behaviour of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) larvae above environmental concentrations." Environ Sci Pollut Res Int **23**(6): 4964-4977 DOI: 10.1007/s11356-014-3477-4.
- Cohen, J. (1988). Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, Academic Press.
- Cold, A. and Forbes, V. E. (2004). "Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*." Aquatic Toxicology **67**(3): 287-299 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.015>.
- Colón-Cruz, L., *et al.* (2018). "Alterations of larval photo-dependent swimming responses (PDR): New endpoints for rapid and diagnostic screening of aquatic contamination." Ecotoxicol Environ Saf **147**: 670-680 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.018.
- Crosby, E. B., *et al.* (2015). "Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish." Neurotoxicology and Teratology(0) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2015.04.006>.
- d'Isa, R. and Gerlai, R. (2023). "Designing animal-friendly behavioral tests for neuroscience research: The importance of an ethological approach." **16** DOI: 10.3389/fnbeh.2022.1090248.
- da Silva Freitas, L., *et al.* (2022). "Antibiotics in the Environment: Prescribing Risks to Non-Target Organisms." **2**(4): 435-443.
- de Esch, C., *et al.* (2012). "Locomotor activity assay in zebrafish larvae: Influence of age, strain and ethanol." Neurotoxicology and Teratology **34**(4): 425-433 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2012.03.002>.
- Didas J. Moshi, *et al.* (2015). "Health risks of pesticides to non target species and ecosystem due to control of migrant pests in Tanzania." Journal of Research in Environmental Science and Toxicology **Vol. 4**(2) 020-027, DOI: DOI: <http://dx.doi.org/10.14303/jrest.2015.131>.

- Dipp, V. R., *et al.* (2018). "Neurobehavioral Alterations in Zebrafish Due to Long-Term Exposure to Low Doses of Inorganic Arsenic." Zebrafish **15**(6): 575-585 DOI: 10.1089/zeb.2018.1627.
- Dong, H., *et al.* (2022). "Characterization of Developmental Neurobehavioral Toxicity in a Zebrafish MPTP-Induced Model: A Novel Mechanism Involving Anemia." ACS Chemical Neuroscience **13**(13): 1877-1890 DOI: 10.1021/acscemneuro.2c00089.
- Elliott, S. M., *et al.* (2017). "Contaminants of emerging concern in tributaries to the Laurentian Great Lakes: I. Patterns of occurrence." PLoS One **12**(9): e0182868 DOI: 10.1371/journal.pone.0182868.
- Eriksson, K. S., *et al.* (1995). "GABA in the nervous system of parasitic flatworms." Parasitology **110 (Pt 3)**: 339-346 DOI: 10.1017/s0031182000080926.
- Fox, J. and Weisberg, S. (2019). Using car and effects Functions in Other Functions. Using Car Eff. Funct. Other Funct **3**: 1-5.
- Fraser, T. W. K., *et al.* (2017). "Toxicant induced behavioural aberrations in larval zebrafish are dependent on minor methodological alterations." Toxicol Lett **276**: 62-68 DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.05.021.
- Gaaied, S., *et al.* (2020). "2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints." Environ Sci Pollut Res Int **27**(4): 3686-3696 DOI: 10.1007/s11356-019-04488-5.
- Gaman, W., *et al.* (1976). "Emergence of gentamicin- and carbenicillin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment." Antimicrob Agents Chemother **9**(3): 474-480 DOI: 10.1128/aac.9.3.474.
- Grebe, E. and Schaeffer, D. J. (1991). "Planarians in toxicology, standardization of a rapid neurobehavioral toxicity test using phenol in a crossover study." Bull Environ Contam Toxicol **46**(6): 866-870 DOI: 10.1007/bf01689731.
- Green, P. and MacLeod, C. J. (2016). SIMR: An R package for power analysis of generalized linear mixed models by simulation. Methods in Ecology and Evolution, **7**(4), 493-498.
- Grissom, N. and Bhatnagar, S. (2009). "Habituation to repeated stress: get used to it." Neurobiol Learn Mem **92**(2): 215-224 DOI: 10.1016/j.nlm.2008.07.001.

- Guo, N., *et al.* (2015). "Influences of acute ethanol exposure on locomotor activities of zebrafish larvae under different illumination." Alcohol **49**(7): 727-737 DOI: 10.1016/j.alcohol.2015.08.003.
- Hanson, M. L., *et al.* (2017). "How we can make ecotoxicology more valuable to environmental protection." Sci Total Environ **578**: 228-235 DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.160.
- Hong, X., *et al.* (2021). "Risks to aquatic environments posed by 14 pharmaceuticals as illustrated by their effects on zebrafish behaviour." Science of The Total Environment **771**: 145450 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145450>.
- Huang, H., *et al.* (2010). "Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonicacid (PFOS)." Aquat Toxicol **98**(2): 139-147 DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.02.003.
- Hussain, A., *et al.* (2020). "Multiple Screening of Pesticides Toxicity in Zebrafish and Daphnia Based on Locomotor Activity Alterations." **10**(9): 1224.
- Irons, T. D., *et al.* (2013). "Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish." Pharmacology Biochemistry and Behavior **103**(4): 792-813 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2012.12.010>.
- Jager, T. (2011). Some good reasons to Ban EC x and related concepts in ecotoxicology. Environ. Sci. Technol. **45**, 8180-8181. DOI: 10.1021/es2030559.
- Ji, Y., *et al.* (2017). "Behavioural responses of zebrafish larvae to acute ethosuximide exposure." Behav Pharmacol **28**(6): 428-440 DOI: 10.1097/fbp.0000000000000312.
- Kang, H. (2021). "Sample size determination and power analysis using the G*Power software." J Educ Eval Health Prof **18**: 17 DOI: 10.3352/jeehp.2021.18.17.
- Kelley, K. (2007). Methods for the behavioral, educational, and social sciences: An R package. Behavior Research Methods, **39**, 979-984.
- Kirla, K. T., *et al.* (2016). "From the Cover: Zebrafish Larvae Are Insensitive to Stimulation by Cocaine: Importance of Exposure Route and Toxicokinetics." Toxicol Sci **154**(1): 183-193 DOI: 10.1093/toxsci/kfw156.

- Knakievicz, T. (2014). Planarians as invertebrate bioindicators in freshwater environmental quality: the biomarkers approach. Ecotoxicology and Environmental Contamination, **9**(1), 1-12. .
- Kooijman, S.A.L.M. (1996). An alternative for NOEC exists, but the standard model has to be abandoned first. Oikos **75**, 310. DOI: 10.2307/3546255.
- Le Bihanic, F., *et al.* (2014). "Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II: adverse effects in Japanese medaka." Environmental science pollution research.
- Leuthold, D., *et al.* (2019). "Can Environmentally Relevant Neuroactive Chemicals Specifically Be Detected with the Locomotor Response Test in Zebrafish Embryos?" Environmental Science & Technology **53**(1): 482-493 DOI: 10.1021/acs.est.8b04327.
- Li, F., *et al.* (2018). "Characterization of the locomotor activities of zebrafish larvae under the influence of various neuroactive drugs." Ann Transl Med **6**(10): 173 DOI: 10.21037/atm.2018.04.25.
- Li, M.-H. (2019). "Comparative toxicities of 10 widely used biocides in three freshwater invertebrate species." Chemistry and Ecology **35**: 472-482 DOI: 10.1080/02757540.2019.1579311.
- Li, Q., *et al.* (2015). "Differential behavioral responses of zebrafish larvae to yohimbine treatment." Psychopharmacology (Berl) **232**(1): 197-208 DOI: 10.1007/s00213-014-3656-5.
- Liu, X., *et al.* (2016). "Effects of diphenylhydantoin on locomotion and thigmotaxis of larval zebrafish." Neurotoxicol Teratol **53**: 41-47 DOI: 10.1016/j.ntt.2015.11.008.
- Lomba, L., *et al.* (2020). "Ecotoxicological study of six drugs in *Aliivibrio fischeri*, *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*." Environ Sci Pollut Res Int **27**(9): 9891-9900 DOI: 10.1007/s11356-019-07592-8.
- Lomba, L., *et al.* (2019). "Acute and subacute effects of drugs in embryos of *Danio rerio*. QSAR grouping and modelling." Ecotoxicol Environ Saf **172**: 232-239 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.081.
- MacPhail, R. C., *et al.* (2009). "Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol." NeuroToxicology **30**(1): 52-58.

- Marchini, S., *et al.* (1992). "Lethal and sublethal toxicity of benzene derivatives to the fathead minnow, using a short-term test." Environmental Toxicology and Chemistry **11**(2): 187-195 DOI: 10.1002/etc.5620110208.
- Marriott, F. H. (1958). "The absolute light-sensitivity and spectral threshold curve of the aquatic flatworm *Dendrocoelum lacteum*." The Journal of physiology **143**(2): 369-379 DOI: 10.1113/jphysiol.1958.sp006065.
- Martinez, O., *et al.* (2020). "Behavioral responses of three freshwater planaria species to light, visual and olfactory stimuli: setting the stage for further ecotoxicological studies." Behavioural Processes: 104295 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104295>.
- Merryman, M. S., *et al.* (2018). "Culturing Planarians in the Laboratory." Methods Mol Biol **1774**: 241-258 DOI: 10.1007/978-1-4939-7802-1_5.
- Mingeot-Leclercq, M. P., *et al.* (1999). "Aminoglycosides: activity and resistance." Antimicrob Agents Chemother **43**(4): 727-737 DOI: 10.1128/aac.43.4.727.
- Mullins, N. D., *et al.* (2016). The impact of storage conditions upon gentamicin coated antimicrobial implants. Journal of Pharmaceutical Analysis, **6**(6), 374-381. DOI: 10.1016/j.jpha.2016.05.002
- Neuwirth, L. S., *et al.* (2022). "Under or Absent Reporting of Light Stimuli in Testing of Anxiety-Like Behaviors in Rodents: The Need for Standardization." Front Mol Neurosci **15**: 912146 DOI: 10.3389/fnmol.2022.912146.
- OECD (2013). "OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS." OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 Effects on Biotic Systems: 22 DOI: 10.1787/9789264203709-en.
- Ofoegbu, P. U., *et al.* (2019). "Effects of low concentrations of psychiatric drugs (carbamazepine and fluoxetine) on the freshwater planarian, *Schmidtea mediterranea*." Chemosphere **217**: 542-549 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.198>.
- Oviedo, N. J., *et al.* (2008). "Gene knockdown in planarians using RNA interference." CSH Protoc **2008**: pdb.prot5054 DOI: 10.1101/pdb.prot5054.
- Palanza, P., *et al.* (2008). "Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice." Environmental Research **108**(2): 150-157 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.023>.

- Paskin, T. R., *et al.* (2014). "Planarian Phototactic Assay Reveals Differential Behavioral Responses Based on Wavelength." *PLOS ONE* **9**(12): e114708 DOI: 10.1371/journal.pone.0114708.
- Peng, X., *et al.* (2016). "Anxiety-related behavioral responses of pentylentetrazole-treated zebrafish larvae to light-dark transitions." *Pharmacol Biochem Behav* **145**: 55-65 DOI: 10.1016/j.pbb.2016.03.010.
- Perrichon, P., *et al.* (2014). "Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo-larval assays." *Environmental sciences pollution research*.
- Pormohammad, A., *et al.* (2022). "Antibacterial, Antibiofilm, and Antioxidant Activity of 15 Different Plant-Based Natural Compounds in Comparison with Ciprofloxacin and Gentamicin." *Antibiotics (Basel)* **11**(8) DOI: 10.3390/antibiotics11081099.
- Portet, S. (2020). A primer on model selection using the Akaike Information Criterion. *Infectious Disease Modelling*, **5**, 111-128. DOI: 10.1016/j.idm.2019.12.010
- Quiros, Y., *et al.* (2011). "An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin." *Toxicol Sci* **119**(2): 245-256 DOI: 10.1093/toxsci/kfq267.
- Ramcharitar, J. and Ibrahim, R. M. (2013). "Ethanol modifies zebrafish responses to abrupt changes in light intensity." *J Clin Neurosci* **20**(3): 476-477 DOI: 10.1016/j.jocn.2012.09.010.
- Rawls, S., *et al.* (2007). "Measurement of GABA and glycine in planarians." *Pharmacologyonline* **1**.
- Richter, S. H., *et al.* (2009). "Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments?" *Nat Methods* **6**(4): 257-261 DOI: 10.1038/nmeth.1312.
- Robles-Jimenez, L. E., *et al.* (2022). "Worldwide Traceability of Antibiotic Residues from Livestock in Wastewater and Soil: A Systematic Review." **12**(1): 60.
- Ross, K. G., *et al.* (2017). "Nervous system development and regeneration in freshwater planarians." **6**(3): e266 DOI: doi:10.1002/wdev.266.

- Scarlett, A. G., *et al.* (2013). "Acute toxicity of aromatic and non-aromatic fractions of naphthenic acids extracted from oil sands process-affected water to larval zebrafish." Chemosphere **93**(2): 415-420 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.020.
- Simão, F. C. P., *et al.* (2019). "Using a new high-throughput video-tracking platform to assess behavioural changes in *Daphnia magna* exposed to neuro-active drugs." Science of The Total Environment **662**: 160-167 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.187>.
- Steele, W. B., *et al.* (2018). "Experimental Protocol for Examining Behavioral Response Profiles in Larval Fish: Application to the Neuro-stimulant Caffeine." J Vis Exp(137) DOI: 10.3791/57938.
- Steenbergen, P. J., *et al.* (2011). "Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: A pharmacological study." Behavioural Brain Research **222**(1): 15-25.
- Stoddard, K. I. and Huggett, D. B. (2014). "Early Life Stage (ELS) Toxicity of Sucralose to Fathead Minnows, *Pimephales promelas*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **93**(4): 383-387 DOI: 10.1007/s00128-014-1348-9.
- Thit, A., *et al.* (2017). "Effects of copper oxide nanoparticles and copper ions to zebrafish (*Danio rerio*) cells, embryos and fry." Toxicol In Vitro **45**(Pt 1): 89-100 DOI: 10.1016/j.tiv.2017.08.010.
- Thomas, L. and Juanes, F. (1996). The importance of statistical power analysis: an example from Animal Behaviour. Animal Behaviour, **52**(4), 856-859.
- Thompson, W. A., *et al.* (2017). "Venlafaxine in Embryos Stimulates Neurogenesis and Disrupts Larval Behavior in Zebrafish." Environ Sci Technol **51**(21): 12889-12897 DOI: 10.1021/acs.est.7b04099.
- Voelkl, B., *et al.* (2020). "Reproducibility of animal research in light of biological variation." Nature Reviews Neuroscience **21**(7): 384-393 DOI: 10.1038/s41583-020-0313-3.
- Wahlsten, D. (2001). "Standardizing tests of mouse behavior: Reasons, recommendations, and reality." Physiology & Behavior **73**(5): 695-704 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00527-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00527-3).

- Wang, Z. and Goonewardene, L. A. (2004). "The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data." Canadian Journal of Animal Science **84**: 1-11.
- Wiegand, C., *et al.* (2000). "Uptake, Toxicity, and Effects on Detoxication Enzymes of Atrazine and Trifluoroacetate in Embryos of Zebrafish." Ecotoxicology and Environmental Safety **45**(2): 122-131.
- Wolf, R. and Heuschele, J. (2018). "Water Browning Influences the Behavioral Effects of Ultraviolet Radiation on Zooplankton." **6**(26) DOI: 10.3389/fevo.2018.00026.
- Yang, X., *et al.* (2017). "Effects of picrotoxin on zebrafish larvae behaviors: A comparison study with PTZ." Epilepsy Behav **70**(Pt A): 224-231 DOI: 10.1016/j.yebeh.2017.03.023.
- Zhang, X., *et al.* (2014). "Mortality and antioxidant responses in the planarian (*Dugesia japonica*) after exposure to copper." **30**(2): 123-131 DOI: 10.1177/0748233712452600.
- Zindler, F., *et al.* (2020). "Do environmentally relevant concentrations of fluoxetine and citalopram impair stress-related behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryos?" Chemosphere **261**: 127753 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127753>.

3. Synthèse de l'article 2

L'évaluation d'indicateurs comportementaux fait aujourd'hui émerger la planaire d'eau douce comme un modèle *in-vivo* d'étude en neurotoxicologie et écotoxicologie (Hagstrom et al., 2015; Wu & Li, 2018).

Cependant, les pratiques expérimentales diffèrent dans la littérature. Ainsi, Hagstrom et al., (2016) ont établis trois défis à relever pour un usage pertinent des planaires dans les études toxicologiques : 1) l'absence d'essais automatisés ; 2) la nécessité d'avoir une batterie de tests standardisés et de travailler avec une ou deux espèces pour mener des études toxicologiques ; et 3) la nécessité de relier les effets comportementaux observés et les mécanismes moléculaires cellulaires qui sont à l'origine de ces réponses. En accord avec les deux premiers défis à relever, l'article 2 s'attèle alors à l'harmonisation des paramètres d'élevage des planaires en s'intéressant aux modifications comportementales engendrées par le cycle de photopériode choisi, au traitement à la gentamicine, un antibiotique à large spectre ; puis à l'harmonisation des paramètres des tests comportementaux réalisés en étudiant la taille des puits (plaque de 24 ou 48 puits), l'intensité lumineuse utilisée, la toxicité de deux solvants couramment utilisés en laboratoire (Ethanol et Diméthylsulfoxyde). Il s'agit aussi d'optimiser et d'harmoniser les paramètres des tests d'exploration, du PMR, et du Planarian Light Dark Test (PLDT), trois tests basés sur le suivi de la locomotion des planaires (Martinez et al., 2020) et de développer un autre test, le *Tapping*, basé sur la sensibilité des planaires aux vibrations (Nicolas et al., 2008). Dans une optique de standardisation et d'automatisation des essais, nous avons opté pour l'usage d'un équipement commercial, utilisé pour l'analyse du comportement des poissons zèbres, la DanioVision (Noldus) accompagné du logiciel EthoVision. Un équipement compatible avec une analyse à moyen et haut débit du comportement des planaires.

Dans la littérature, quatre espèces de planaire sont utilisées pour les études toxicologiques : *Schmidtea mediterranea*, *Dugesia japonica*, *Girardia tigrina* et *Schmidtea polychroa*. Cependant, différentes espèces de planaires ont montré des niveaux de sensibilité différents aux mêmes substances (Ireland et al., 2020). L'étude de l'effet de la photopériode a été réalisée pour évaluer la sensibilité de chaque espèce de planaire au cycle de photopériode (12h à la lumière suivies de 12h dans l'obscurité totale), afin de ne garder que les espèces ayant des réponses comportementales stables dans les deux conditions décrites dans la littérature. A l'issue de cette première étude nous avons éliminé *D. tigrina* et *S. polychroa* car elles présentaient respectivement une grande variabilité dans leur réponses lors des tests d'exploration et du

PMR ; et lors du PMR uniquement. Aussi ces deux espèces présentaient une mobilité significativement réduite lors de l'application d'un cycle 12h *Light*/12 *Dark*.

Puis nous avons mis en œuvre les quatre tests mentionnés ci-dessus, à savoir l'exploration, la réponse photomotrice (PMR), le *Planarian Light Dark Test* (PLDT) et le *tapping* (réponse aux vibrations) sur les planaires *D.japonica* et *S. mediterranea* à l'aide du système DanioVision (Noldus). Nous avons déterminé que sur les quatre tests, le test d'exploration réalisé dans des plaques 24 puits à 10 000 lux (intensité lumineuse) est robuste et fiable pour les études toxicologiques sur les planaires. Le PMR reflète les réponses du test d'exploration, cependant, nous n'avons pas été en mesure de conclure sur l'effet cumulatif de l'exposition aux substances chimiques et de la stimulation lumineuse. Le *Tapping*, et le PLDT doivent être révisés pour permettre leur utilisation dans l'évaluation de la toxicité à l'avenir. En ce qui concerne la sensibilité inter-espèces, *D. japonica* et *S. mediterranea* se sont révélés être des modèles sensibles pour le dépistage toxicologique de deux pesticides organophosphorés (Chlorpyrifos et Coumaphos) grâce à l'analyse comportementale. Même si, dans les conditions expérimentales employées, la mobilité de base chez *S.mediterranea* était toujours plus élevée que chez *D.japonica*, la réponse des deux espèces a permis de détecter des changements comportementaux, ce qui en fait de bons modèles pour les tests comportementaux dans un contexte (éco) toxicologique.

4. Article 2

Rejo, L., Malgouyres, J. M., Bonnafé, E., & Vignet, C. (2023). Optimization and calibration of behavioural tests on different species of planaria for ecotoxicological studies. *Environmental toxicology and pharmacology*, *101*, 104189.

Optimization and calibration of behavioural tests on different species of planaria for ecotoxicological studies

Lucia Rejo¹, Jean-Michel Malgouyres¹, Elsa Bonnafé¹, Caroline Vignet¹

¹Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives (BTSB), EA7417, INU Champollion, Place de Verdun, 81000, Albi, France

Corresponding authors:

L.Rejo rejo.lucia@gmail.com; C.vignet caroline.vignet@univ-jfc.fr

Abstract

Freshwater planarian are emerging as a valuable *in vivo* model for (eco) toxicological studies, but the lack of harmonization of procedures between laboratories remains a challenge. This study aimed to optimize, automate and select the best behavioural tests and analyse the potential of different planarian species as models for toxicological assessment. We implemented four tests, based on the analysis of planarian locomotion, namely the exploration, photomotor response (PMR), Tapping and Planarian Light Dark Test (PLDT) assays on different planaria species using the DanioVision system. For the behavioural tests, we conclude, that over the four tests, the exploration assay performed in 24 well-plate at 10 000 lux is the only one that is robust and reliable for toxicological studies with planaria. The current readout for Tapping and the set-up for PLDT and PMR need to be revised to enable their use in toxicity screening in the future. Regarding interspecies sensitivity, *Dugesia japonica* and *Schmidtea mediterranea* have proved to be sensitive models for toxicological screening of organophosphorus pesticides through behavioural analysis. Even if, under necessary experimental conditions the motility baseline in control *S.mediterranea* was always higher than for *D.japonica*, both species response, allowed the detection of behavioural changes, making both good models for behavioural testing in (eco) toxicological context.

Keywords: invertebrate, freshwater flatworm, photoperiod, solvents, organophosphorus pesticides, neurotoxicity

1. Introduction

In ecotoxicology, the adoption of the 3Rs rule - Reduce, Refine, Replace - intended to limit the use of mammals in toxicological studies, has led to the development of invertebrate organisms as new models for biological testing (Wu & Li, 2018). Invertebrates have a relatively high sensitivity to pollutants, and hold great potential as screening tools for predicting pollutant toxicity in mammals. Well known for their regenerative abilities, freshwater planarians are invertebrates that are being developed as test models in a variety of scientific fields, and emerge as a valuable *in vivo* model for toxicological studies. Indeed, planarians offer a number of advantages: compared to other aquatic animal models, they are easy to acquire, require little laboratory maintenance, and both physiological and genomic information on planaria are available, making it possible to study the toxicity of pollutants from a mechanistic approach (Knakiewicz, 2014; Noreña et al., 2015; Wu & Li, 2018) ([Supplementary table 1](#)). Planarians have a sensitivity comparable to that of well-established freshwater invertebrate models such as Daphnids (Hagstrom et al., 2015). And most importantly, they do share anatomical and molecular features of the mammalian brain (Pagán, 2014; Ross et al., 2017; Sarnat & Netsky, 2002) as demonstrated by numerous studies on cholinergic transmission in Platyhelminthes (Buttarelli et al., 2008, 2000; Hagstrom et al., 2017; Nishimura et al., 2010).

In practice, the use of planaria in toxicology is attractive because they display a simple behavioural repertoire, such as locomotion, that respond to various stimuli such as chemical gradients, vibration and light (Deochand et al., 2018; Nicolas et al., 2008). Moreover, their behaviour can be used as quantitative markers of neuronal function (Hagstrom et al., 2015; Ireland et al., 2020).

However, the major consideration for establishing freshwater planaria as an alternative model for chemical toxicity screening is the lack of harmonization regarding procedures between laboratories (Wu & Li, 2018).

Planarians can be easily acquired by researchers, either by collecting native species in their geographical area (Sluys & Riutort, 2018), or commercially as the increasing research on planarians regenerative abilities has made them more readily available. Thus, planaria of different origins and species are used interchangeably in the literature as toxicological screening tools ([Supplementary data 1](#)), and raise a major concern. For instance, in our laboratory, we have mainly worked with *Schmidtea polychroa*, native to our region, to study the toxicity of pollutants on their reproduction (Mazzitelli et al., 2018). Yet, Ireland (2020) have investigated

and compared the sensitivity to chemicals of the three most commonly used planarian species in toxicology: *Dugesia japonica*, *Schmidtea mediterranea* and *Girardia tigrina*, in a High Throughput Screening context, using a custom made screening platform. They concluded that *D.japonica* was the most suited species, by principle of elimination towards the two others (Ireland et al., 2020). This result actually supports the work of Van Huizen (2017), who found differences in sensitivity to chemicals between freshwater planarian species (Van Huizen et al., 2017). However, this study was mainly carried out in a neurodevelopmental context, comparing adult planaria with regenerating ones, over a static exposure in small volumes of chemicals (a sealed 48-well plate, with 1 planaria per 200 μ L in a well) over an extended period of 12 days, which raises health issues inherent to the experimental setting in planaria (Ireland et al., 2020).

The need to eliminate experimenter bias and minimize manipulations during experimentation calls for the development of optimized battery of tests for the use of planaria in (eco)toxicological screening, combined with the use of automated devices that could track behaviour. For instance, some groups have tried to develop custom-made platforms (Hagstrom et al., 2015; Shomrat & Levin, 2013) to assess toxicity and behavioural endpoints of planarians however they would have to be replicated in several laboratories, creating the risk of variations between set-ups. This is why in this study, we decided to experiment a commercially available device, the DanioVision (Noldus) which is already available in several laboratories working on zebrafish larvae (Varshney et al., 2022) and features add-on such as vibrational and light stimuli. By adapting a system designed for high-throughput monitoring of zebrafish larvae to planaria, we hope to encourage harmonization of test conditions, allowing better comparison of results between research groups, but also to fulfil 3Rs guidelines by encouraging researchers to switch to invertebrates such as planaria.

In a general way, conditions of planarian husbandry and toxicants exposure differ in the literature. Freshwater planarians have a natural averseness to light. Hence, in some laboratory worms are raised in the dark in accordance to their photophobic behaviour but also to prevent the growth of algae (Hagstrom et al., 2017; Ireland et al., 2020; Merryman et al., 2018). Concurrently, a 12:12 (Light/Dark) or 16:8 (LD) photoperiod cycle is also commonly applied (Hinrichsen et al., 2019; Martinez et al., 2020). While both maintenance condition exist in the literature, it is not known whether photoperiod cycle can interfere with the results of toxicity tests (Wu & Li, 2018). In our effort of standardization of practices, we aim to select planaria species with stable behavioural responses whether maintained or not in photoperiod cycle.

Light is necessary to stimulate a planarian into locomotion otherwise they simply rest in the dark. Thus researchers have opted to poke, shock or pipette planaria to induce locomotion (Deochand et al., 2018). Light is considered a weaker unconditioned stimulus compared to vibration and shock (Vandeventer & Ratner, 1964) for planarians. We therefore decided to carry out all the locomotion tests in the presence of light.

The use of multi-well plate during assays is also the key for high throughput screening of toxicants while reducing both the experimental variability associated with technical variation and the quantity of chemicals by working on small volumes. In their study, Ireland (2020) pointed out that 48-well plates were not suitable for planarians under static exposure as the health of *G. tigrina* worsened over time and even led to total immobilisation or death after 12 days (Ireland et al., 2020). The main requirements to consider are 1) the ability to test a large number of planaria at the same time, while using 2) the minimum exposure volume possible per well (enough to allow planaria movement, while using a minimal amount of chemical for toxicological testing) and 3) the rapid filling of the plate, with one planaria per well, to minimize differences in exposure time between individuals in the first and last wells as we still have to place each planaria manually.

Gentamicin is a broad-spectrum antibiotic that can be used in cultures either to prevent the growth of pathogens that could affect the health of planarians (Covely, 2022; Shiroor et al., 2018; Subramanian et al., 2021), especially for static culture method (Arnold et al., 2016) or as a treatment when bacterial infection is suspected, particularly when planarians have a poor appearance with head regression, lesions or lysis. It is unclear whether gentamicin acts in any way on a pathogen, or if the improved health of the planaria is due to a placebo effect. In either case, the exposure seems to help address these culture problems (Covely, 2022; Merryman et al., 2018).

For toxicological assessment with freshwater flatworms, in the most common experimental system, whole individuals are usually exposed to chemicals by direct soaking in mainly aqueous solution, as fluids enter the planaria body through cutaneous diffusion (Deochand et al., 2018). It is therefore sometimes necessary to use a vehicle solvent to dissolve molecules that are not or only slightly soluble in water. We therefore sought to test the effect of sublethal concentrations of the two most common solvents (dymethylsulfoxide (DMSO) and ethanol) to ensure that they did not interfere with the chemicals tested.

Planarians are sensitive to vibrations (Nicolas et al., 2008). Indeed, Ross (2018), tested the behavioural response of planaria to vibration using a custom tapping device, analysed their body contraction in response to the stimulus, and showed that the vibratory sensory test was a reliable readout of sensory neuron dysfunction linked to the defect *SoxB1* gene (Ross et al., 2018). Also, in an ecotoxicological context, this method was found to be suitable for predicting the effect of neuroactive compounds and environmental pollutants in both zebrafish, and crickets consistent with the responses reported in rodents (Faria et al., 2019; Rice et al., 2011; Ro et al., 2021). Therefore, in the very context of toxicological assessment, the Tapping test may prove interesting to develop for planaria.

Overall, in this study we aim to: 1) select the best suited species for (eco)toxicological assessment regarding the stability of their behavioural responses to photoperiod cycle, antibiotic treatment, and sensitivity to two commonly used solvents; 2) consolidate repeatable tests that are already used for planarians such as locomotion and photophobic behaviour considering the effect of light intensity, and the size of well plates used during these tests; 3) therefore explore the effect of mechanical stress namely the Tapping test on planarian locomotion 4) to evaluate, as proof of concept, the effect of sublethal doses of two known organophosphate pesticides on planaria, using validated tests from among those described above.

2. Materials and methods

2.1 Planarian husbandry

Asexual strains of *D. japonica* and *S. mediterranea* were obtained from Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany) and established in our lab since January 2021. Asexual *G. tigrina* and sexual *S. polychroa* were collected in the field in the Caussel river (Tarn, France), both species were acclimatized to lab condition for at least 1 week prior to use for experiments. All freshwater planarians were kept in 400mL in 1X Montjuïc salts water (1.6 mM NaCl, 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM KCl, 1.2 mM NaHCO₃ in deionized water, pH~7.5) in glass Tupperware containers, and raised in an Aqualytic™ Refrigerated Incubator Model TC 445 S, 445 L, permanently set at 20°C, in the dark 24 hours. Worms were exposed to light only when fed or cleaned in a room permanently set at 20°C. Planaria were fed once a week with organic calf liver paste (Merryman et al., 2018) and washed twice a week. Worms were starved for at least

5 days prior to use in experiments. All experiments were carried out in accordance with relevant animal protection guidelines.

2.2 Behavioural tracking and recording

Fully regenerated planarians (approximately 5 - 10mm) found gliding normally in the container were randomly selected and checked for abnormality on a Leica S8 APO, *Greenough stereo microscope*. All behavioural tests were carried out during the day (9am-5pm).

Two behavioural set-ups have been used for this study. The first one, for the assessment of photoperiod conditions on planaria behaviour were conducted as described in (Martinez et al., 2020). Briefly, the custom-made set-up was composed of an infrared (IR) transmitting PVC platform (80 × 80 × 15 cm) equipped with four IR (48 LED each) and four LED spots (6W RGB 27,000 K), all lights were emitted from below. The camera equipped with IR lens was placed above the PVC platform in a way that distortion was minimised and was connected to a computer with the EthoVision XT12 tracking software installed. Up to 20 plastic petri-dishes of 100mm diameter were placed on the PVC platform at the same time. Planarians were individually placed into plastic petri dish filled with 20mL of Montjuich water. They were set for acclimatization for at least 2 min before recording.

All subsequent behavioural tests were carried out using the DanioVision Observation Chamber (v.DVOC-0040T; Noldus, Netherlands) which consists of a video camera equipped with infrared and white light sources, a transparent multi-well plate holder, an intensity-adjustable white light (up to 10,000 lux), and a tapping device (a solenoid) below the plate holder. The camera output was fed into a standard PC system with EthoVision XT16 software that recorded video for later analysis. The DanioVision Chamber is combined with a temperature control unit set at 20°C for all experiments.

The general protocol consisted of an acclimation period of 5 minutes at light, to allow the planaria to adjust to the Noldus set up and for their baseline movement to settle. This was followed by a 20 min measurement of spontaneous swimming behaviour in the presence of light (referred to as “exploration” throughout the manuscript). This was then followed by the photomotor response (PMR) assay, alternating dark and light periods each lasting 5 min (2x light periods, referred to as “L1 and L2”; 2x dark periods, referred to as “D1 and D2 ([Supp. data 2](#))). EthoVision XT16 software was used to control the switching on and off of white lightening in the chamber. Two parameters of this protocol have been modified to answer two questions, first was about the light intensity used. The influence of light intensity on planarian

activity was verified by the means of the EthoVision software, light intensity was set to 100% (~10 000 lux), 50% (5 000 lux), 10% (1 000 lux) or 0% ([Supplementary data 2](#)). The second parameter investigated was the influence of the size of the surface area available for the movement of planaria in the behavioural trials. Two types of plates were set up for each species: in the first type, planaria were placed individually in 48-well plates with 200 μ L of Montjuich water, while in the second one, planaria were placed individually in 24-well plates with 400 μ L of Montjuich water. All plates were subsequently stored in the incubator at 20°C overnight and behavioural assays were performed the next day, at 100% light ([Supplementary data 3](#)).

Two other behaviour protocols to be raised to paradigm have also been tested. The automated version of Planarian Light Dark Stress (referred as PLDT) consisted of a custom designed Plexiglas frame (124 \times 82mm, 3mm thickness) (Sarl Marcorelles, Montpellier France) covering half of each well was placed below a 24 well plate. The Plexiglas frame was black, while still allowing infra-red light to pass through. Planaria were set to acclimation for 5 min, then recorded for 20min. PLDT was assayed using 24 well plates and at 100% light intensity ([Supplementary data 4](#)). Startle response of planaria was assayed with the tapping stimulus, which is included in the DanioVision setup and has already been used with other species (Ro et al., 2021). Planarian were allowed to acclimate for 10 min, follows two intense tapping stimuli (scale 8 on 8) that were done at 1 sec of interval. Then, planaria activity was recorded for additional 10 min after tappings ([Supplementary data 5](#)).

2.3 Photoperiod assay

The four species mentioned earlier were all tested. Two conditions were set up for each species: in the first condition, planarians were placed in the upper grill of the incubator with one neon tube (8W, 600 lm) on each side, with a scheduled light/dark cycle of 12:12 from 8am-20pm/20pm-8am. In the second condition, worms were placed on the bottom grid of the same incubator and covered with cardboard to keep them in complete darkness. For each species and condition, approximately 15 planaria were selected from the Tupperware glass container, and placed into a 1L beaker filled with 400mL of Montjuich water and maintained according to the scheduled condition for one week prior to behavioural assays.

2.4 Assessment of chemical toxicity

The following compounds were tested and prepared according to manufacturer guidelines: gentamicin (Sigma Aldrich, G1272), dimethylsulfoxide (Panreac Química SA, 191954), Chlorpyrifos (Pestanal), ethanol (Emsure®), and Coumaphos (Institute of Industrial

Organic Chemistry (IPO), Poland). All solutions were prepared in autoclaved 1X Montjuïc water. Stocks of 500mM Chlorpyrifos and 10mM Coumaphos were prepared in 100% DMSO, in such a way that, in the final working solutions, the DMSO concentration did not exceed 0.1%. Experimental concentrations were prepared at 2X of final concentration in 1X Montjuïc water. [Table 1](#) summarises details on chemicals and concentrations.

Mortality assays have been done for all the chemicals listed in [Table 1](#), except for Gentamicin. For ethanol, DMSO, and Chlorpyrifos tested concentration were chosen according to results in (Hagstrom et al., 2015). To our knowledge, Coumaphos has never been tested on planaria. At least eight concentrations were assessed for each chemical. Deaths were manually inspected under a Leica S8 APO *Greenough stereo microscope* at 24 post-exposure. Planarians that did not move under light or when poked with a plastic pipette were considered dead. Worms that managed to crawl out of the water and have dried on the well side were labelled “suicide” and weren't take into account in final results. At least three replicates were performed for each chemical. For every chemical concentration and planarian species, 12 planarians were tested in independent screening plates. 48 well-plates and 24 well-plates were used respectively for mortality, and behavioural tests. Final exposition volumes were 200 μ L in 48 well-plate and 400 μ L in 24 well-plates. These volumes allow free movements of planarians inside the well while preventing them from escaping to another one. For both mortality and behavioural assays, exposure protocol was adapted from (Ireland et al., 2020). Briefly, planarians were selected as described earlier, then using a p1000 micropipette fitted with a cut-off tip, one planaria was pipetted with 200 μ L of Montjuïc water from the Tupperware glass container, and placed into a well with the water. Once the plates were filled (1 worm per well) -for mortality tests in 48 well-plate, 100 μ L of planaria water was removed from each well- an appropriate volume of 2X concentrated chemical solution was added to each well in a way that final planned concentrations and volumes (200 μ L and 400 μ L for 48 and 24 well-plates respectively) were met. Worms were assayed for exploration and PMR behaviour at 24h and stored in the plate for 48 hours at 20°C, in the incubator in the dark.

For gentamicin assays, for each species and concentration, approximately 30 planaria were selected from the Tupperware glass container, and placed into a 1L beaker filled with 100mL of Montjuïc water with appropriate final concentration of gentamicin. Gentamicin solution was replaced once a week. The general protocol of behavioural assay previously described was performed after fourteen days of exposure to gentamicin, in 24 well-plates.

Table 1: Chemicals and concentration ranges tested for planarian exposure

| Chemical | CAS | Supplier | Purity (%) | Tested concentrations |
|---------------------|-----------|---|-----------------|----------------------------|
| Chlorpyrifos | 2921-88-2 | Pestanal | 99.2% | 10 μ M to 5 mM |
| Ethanol | 64-17-5 | Emsure® | 100% | 0.01-15% |
| DMSO | 67-68-7 | Panreac-AppliChem | 99.9% | 0.05-15% |
| Gentamicin | 1405-41-0 | Sigma-Aldrich | N/A | 12.5 to 50 mg/L |
| Coumaphos | 56-72-4 | Institute of Industrial Organic Chemistry (IPO) | 98.3 \pm 0.3% | 0.05 μ M to 10 μ M |

2.5 Data and statistical analysis

Tracking of the planaria by the EthoVision software was carried out from the video in a non-live tracking mode, by either static subtraction of the background or using the DanioVision tracking mode -ideal for detecting transparent zebrafish larvae- when planaria did not move during acquisition, or when planarian diversity (color nuances) impeached correct detection. Tracking precision was verified manually and corrected if necessary before generating data. EthoVision XT is used to directly collect data such as distance travelled by the tracked subject and time spent in light area. Each well of the well-plate was defined as an arena and planaria were individually tracked. Regarding the exploration test, for each individual, distance travelled in millimeters (mm) every 10s (raw data) and in total (20 min) were pooled and analysed. To characterise the locomotor behaviour during the dark / light phases (PMR assay), distance travelled (in mm) by each individual every 5 min period were gathered. The expected response is a decrease in locomotor activity when switching from the light to the dark phase, whereas an increase in activity is expected when switching from the darkness to the light (Martinez et al., 2020; Vignet et al., 2013). The pattern of response expected for light stress is a wavy curve. For the PLDT assay, the amount of time spent respectively in dark and light areas during 20min of were analysed by EthoVision XT software. The percentage of time spent in light and dark areas over the 20min acquisition period were further analysed.

For all behavioural experiments, statistical analysis were performed on pooled data, and were carried out as in (Martinez et al., 2020), using Statistica v.15 software. In order to test behavioural hypotheses, a general linear mixed model (GLM) was fitted to the data. When the F statistics and p values from the various GLMs showed statistically significant differences, a Tukey post-hoc test was applied to compare groups of fixed factors. For exploration, PMR and Tapping assays, concentration of chemicals effect and period (Light 1/2 and Dark 1/2 for PMR and before/after tapping) effect were tested as fixed factors and arena and run as random ones.

For PLDT, zone effect (light or dark) were tested as fixed factors and arena and run as random. Statistics were presented in the text in the format (F = ..., p = ...). For all tests, data were considered statistically significant when $p < 0.05$.

For the mortality assays, dead and alive planarians were labelled 0 and 1 respectively. For each replicate, percentage of alive planarians at 24h for each concentration was calculated and reported in Graphpad Prism 6 software to calculate LC₅₀ of tested compounds, which was determined by using the sigmoid equation in Graphpad Prism 6 software: $LC_{50} = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$.

3. Results

3.1 Photoperiod assay

In the exploration phase of the protocol, although not significant, the distance travelled by *D.japonica* and *S.mediterranea* raised in 12:12 LD condition (referred as Light/Dark throughout the manuscript) was slightly higher compared to those raised in darkness. The trend was the opposite for *G. tigrina* and *S.polychroa*, for which those raised in the Dark (referred as Dark throughout the manuscript) travelled more distance than the Light/Dark ones. However, this difference was only significant for *G.tigrina*, for which those maintained under Light/Dark cycle were 1.4 times less active than those maintained in the Dark (F=12.08, $p < 0.05$; Fig.1a). For the PMR assay, the expected response (Martinez et al., 2020; Vignet et al., 2013), a wavy pattern was strictly observed for *D.japonica* Light/Dark, in both conditions for *S.mediterranea*, and for *S.polychroa* Dark, in which the distance travelled was higher during the light phases than during the dark ones. A significant condition effect was observed for *G.tigrina* (F=63.2, $p < 0.0005$) and *S.polychroa* (F=6.7, $p < 0.05$; Fig 1b). Although the wavy pattern was not observed for *D.japonica* Dark compared to the Dark/Light group, no significant difference was found between the two conditions.

The aim of this first essay was to select planarian species for which maintenance in the dark or following a 12:12 LD cycle would have little or no significant impact on their behaviour. *G.tigrina* and *S.polychroa* showed significant variability in behavioural responses between the two photoperiod conditions. Besides, *S. polychroa* was difficult to handle as individuals would lay eggs during the experiments. Therefore, these two species were excluded from the next steps of our study.

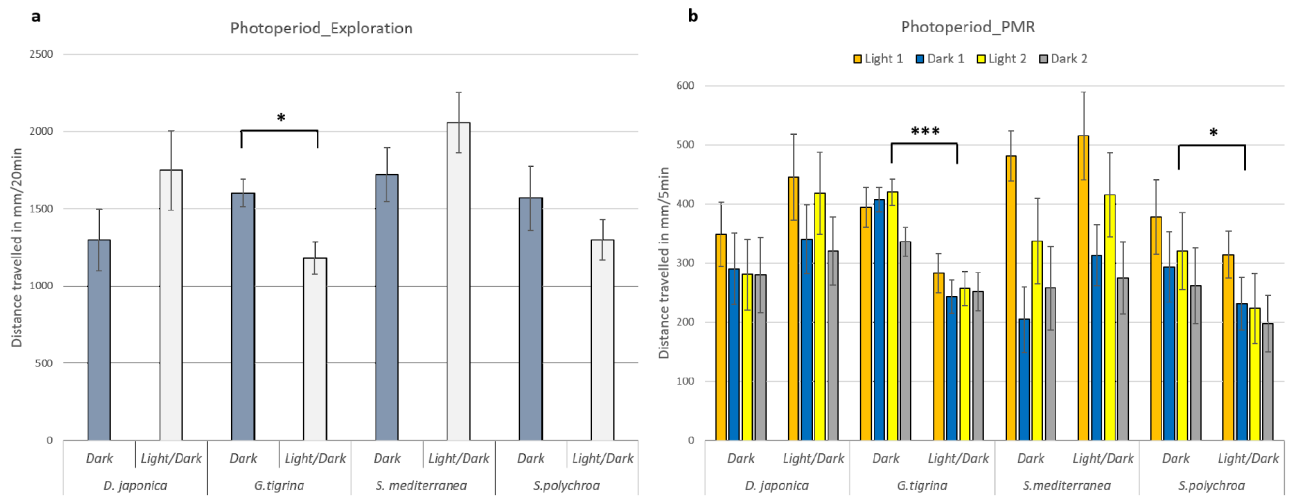


Figure 1: Comparison of the behavioral responses of four planarian species maintained in a photoperiod cycle (Light/Dark) or not (Dark). (a) Cumulative distance travelled in mm over 20 minutes of recording. (b) Effect of light stimuli on distance travelled in mm over 5 minutes periods of recording. Data represent the mean \pm SE. * $p < 0.05$ *** $p < 0.0005$ (n=11 for *D. japonica* Dark and Light/Dark, *G. tigrina* Dark and Light/Dark and *S. mediterranea* Dark; n=10 for *S. mediterranea* Light/Dark; n=12 for *S. polychroa* Dark and Light/Dark).

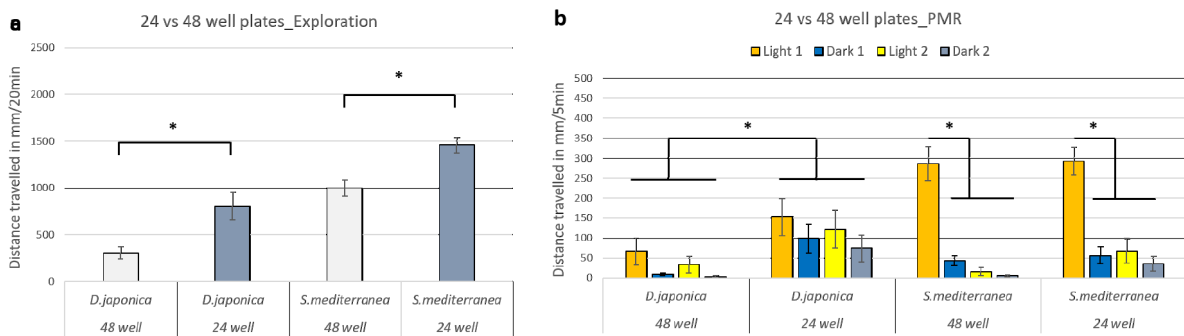


Figure 2: Comparison of the behavioral responses of two planarian species to the variation well size. (a,b) *D. japonica* and *S. mediterranea* species assayed in 24 or 48 well plates for behavioural tests; (a) Distance travelled in 48 and 24 well plates for *D. japonica* and *S. mediterranea*. (b) Effect of light stimuli on distance travelled over 5 minutes periods of recording (n=9 for *D. japonica* in 24 and 48 well plates and n=12 for *S. mediterranea* in 24 and 48 well plates). Data represents means \pm SE. * $p < 0.05$

3.2 Well size optimization assay

In the exploration phase of the protocol, distance travelled was significantly higher in 24 well plates compared to 48 well plates for both species (2.6 times and 1.6 times respectively for *D. japonica* and *S. mediterranea* ($F=23.0$, $p < 0.001$)). However, *S. mediterranea* explored significantly more (average of 8.3 mm/sec in 48 well plates and 12.2 mm/sec in 24 well plates) than *D. japonica* (average of 2.5 mm/sec in 48 well plates and 6.7 mm/sec in 24 well plates ($F=45.2$, $p < 0.001$)) (Fig. 2a).

As for the PMR, a wavy pattern was observed on all graphs (Fig 2b), in which distance travelled during Light 1 and 2 were higher than during Dark 1 and 2, except for *S. mediterranea*

in 48 well-plates, for which a decrease in activity was observed over time. *D.japonica* travelled significantly more in 24 well plates than in 48 ones ($F=11.1$, $p<0.01$). For *S.mediterranea*, an important period effect ($F=52.2$, $p<0.001$) was highlighted because period Light 1 is different from all the others.

The drop of activity expected from Light 1 to Dark 1 is much more important for *S.mediterranea* than for *D.japonica*. In 24 well plates, *S.mediterranea* travelled 5 times less distance during Dark 1 compared to Light 1, whereas this decrease is only around 1.5 times for the same periods for *D.japonica* (Fig. 2b).

This test aimed to find out whether the locomotion results are influenced by the space available for the planarian to move and showed that distance travelled was statistically higher in the 24-well plates for the exploration and PMR, thus we decided to carry out all following tests in 24 well plates.

3.3 Light intensity calibration assay

Distance travelled seemed higher at 100% light intensity compared to 0% for both species (Supp. data 6a). However, *S.mediterranea* was exploring more (average of 1416 mm) than *D.japonica* (average of 689 mm). There appears to be a positive correlation between reduced light intensity and distance travelled, being 1.1 (50%) to 1.7 times (0%) less than at 100% for *D.japonica* and 1.5 (50%) to 3.07 times (10%) less for *S.mediterranea*. This decrease was only significant for *S.mediterranea* at 50% ($p<0.05$) and 0% ($p<0.001$).

For PMR assay, a wavy pattern was observed in all graphs (Supp. data 6b), except for 0% light *D.japonica*, which showed a decreasing activity over time. *D.japonica* showed a significant period effect as distance travelled in Light 1 was higher than in other periods ($F=7.35$, $p<0.001$) and a condition effect ($F=2.84$, $p<0.05$); 100% light was different from 10% light ($p<0.05$). For *S.mediterranea*, a similar period effect was observed ($F=13.62$, $p<0.001$); and Light 2 was different from Dark 2. A condition effect was also observed ($F=14.26$, $p<0.001$); 100% light was different from 0% light ($p<0.01$) and 50% light ($p<0.001$). In addition, response of the 50% and 0% lights planarians looked similar (Supp. data 6b).

For both species, as expected, distance travelled was much higher, and the wavy pattern in PMR was met at 100% light intensity (10 00 lux). With this test we validated the positive correlation between light intensity and the distance travelled by planaria and noted that at 10,000 lux (within the limit imposed by the DanioVision system), saturation of the planaria

locomotor potential was not reached, and would appear to be able to increase even further. At 100% light intensity, planarian locomotion was still in the linear phase, and have not yet reached the plateau. We therefore recommend working at 100% light and carried out all following tests at that intensity. Besides, high mobility of planarians would help detect subtle changes in behaviour.

3.4 PLDT

As a control, we first sought to investigate the time spent in “supposedly” light and dark zones, without the Plexiglas on, when the light is not blocked, to see the percentage of time the worms would spend in the same regions. Without the plexiglas on (referred as Exploration in [Supp. data 7](#)).no significant difference between the time spent in the both zones were found for both species. *D.japonica* spent 48.83% and 51.12% of time in the dark and light zones respectively. For *S.mediterranea*, times spent were 48.9% and 50.9% in dark and light zones respectively. However, when the plexiglas is on (referred as PLDT in [supp. data 7](#)), we observed that both species tend to spent more time in the dark zone that in the light one (*D.japonica* spent 54.94% and 45.06% of time in the dark and light zones respectively. For *S.mediterranea*, times spent were 60.2% and 39.8% in dark and light zones respectively. However, these variations were not significant.

3.5 Effect of Tapping stimuli on planarian locomotion

A species effect was observed for this assay, overall, *S.mediterranea* travelled significantly more (mean of 967 mm/10 min before tapping and 888 mm/10 min after the tapping) than *D.japonica* (mean of 377 mm/10 min before tapping and 314 mm/10 min after the tapping) ($F=131.7$, $p<0.0005$). For both species, distance travelled tend to decrease after the tapping stimulus, being 0.83 times lower for *D.japonica* and 0.91 times lower for *S.mediterranea*. However, no period effect was observed for both species ([Fig. 3](#)).

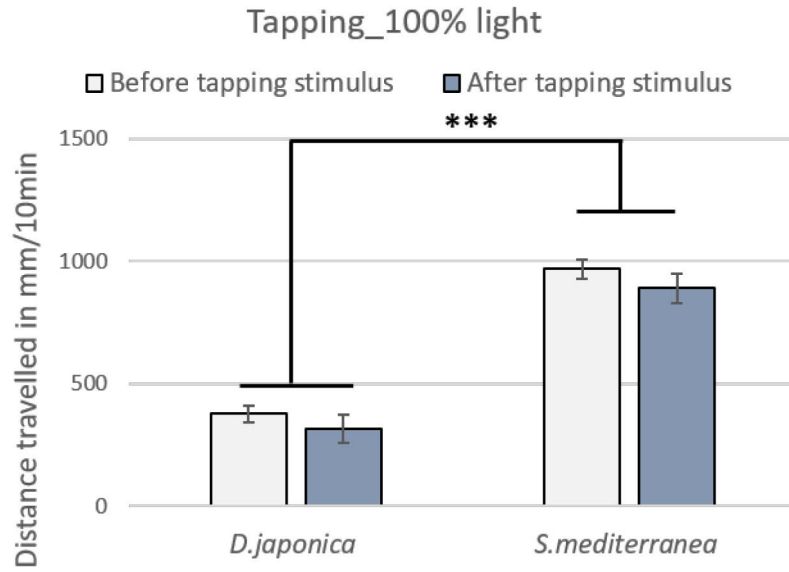


Figure 3: Comparison of the locomotion of two planarian species to Tapping. Analysis of the cumulative effect of light stimulation (100% light) and a mechanical stimulus (tapping) on the locomotion of planarians (n= 21 for *D.japonica*, n=24 for *S.mediterranea*). Data represents means \pm SE. *** $p < 0.0005$.

Table 2: Summarized results of locomotion performance and photomotor response of *D.japonica* and *S.mediterranea* exposed to sublethal concentrations of Gentamicin, DMSO and Ethanol. For exploration test, upward arrow indicates that planarians travel more compared to controls; downward arrow indicates that planarians travel less compared to controls; equal sign indicates no difference observed compared to control. For PMR assay, presence of expected pattern curve is indicated by Yes, No indicated the loss of the curve. Data represents means ± SE. *p<0.05 **p<0,005 ***p<0.0005 compared with control group (n=12 except for *D.japonica* Ethanol 1% for which n=11). Detailed results for gentamicin, DMSO and ethanol are available in Supp. data 7 to 12.

| Compounds | | Gentamicin (mg/mL) | | | | DMSO (% v/v) | | | | | | Ethanol (% v/v) | | | | | |
|-------------|-------------------------------|--------------------|------|-----|-----|--------------|-------|------|------|-----|----|-----------------|--------|------|-----|----------|----------|
| | Species | 0 | 12.5 | 25 | 50 | 0 | 0.01 | 0.05 | 0.1 | 0.5 | 1 | 0 | 0.01 | 0.05 | 0.1 | 0.5 | 1 |
| Exploration | <i>Dugesia japonica</i> | Control | = | = | = | Control | = | = | = | = | = | Control | = | = | = | = | = |
| | <i>Schmidtea mediterranea</i> | Control | = | = | = | Control | = | = | = | = | = | Control | = | = | = | *** ↘ | *** ↘ |
| PMR curve | <i>Dugesia japonica</i> | Yes | Yes* | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| | <i>Schmidtea mediterranea</i> | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes** | Yes | Yes* | Yes | No | Yes | Yes*** | Yes | Yes | Yes | Yes*** |

Table 3: comparison of LC50 values for the tested chemicals in planarians (*D.japonica* and *S.mediterranea*) and other aquatic species. Highlighted values are from the current study. *Artemia Franciscana* and *Allorchestes compressa* are marine crustaceans, *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Danio rerio* and *Oncorhynchus mykiss* are freshwater crustacean, arthropod, and fishes, respectively. N.D stands for Non determined

| Chemical | <i>D.japonica</i> | <i>S.mediterranea</i> | <i>Artemia Franciscana</i> | <i>Allorchestis compressa</i> | <i>Daphnia magna</i> | <i>Danio rerio</i> | Nematode | <i>Artemis salina</i> | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | References |
|--------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------------|--|---|--|----------|-----------------------|----------------------------|--|
| DMSO | 5.02% (24h) | 5.02% (24h) | 5.643 % (LC ₅₀ , 48h) | 5.41 % (EC ₅₀ Mortality; 48h); 3.51% (72h); 1.92% (96h) | 2.34 % (EC ₅₀ ; 24h); 0.5% (48h) | Embryos: 5.46 % (LC ₅₀ Mortality; 24h); 3.26% (48h); Larvae (4.00 % (LC ₅₀ Mortality; 24h); 2.49% (48h); | | | | (Bichara et al., 2013; Hagstrom et al., 2015; Huang et al., 2018) |
| | 7.08%, (day 2); 4.03% (24h) | | | | | | | | | |
| Ethanol | 3.80% | 1.70% | | | | 1.20% | 5.00% | | | (Chen et al., 2011; Dhawan et al., 1999; Hagstrom et al., 2015; Hallare et al., 2006; Maes et al., 2012) |
| | 1.94%, day 2 | – | | | | | | | | |
| Chlorpyrifos | 961µM | 1118µM | | | | 1µM | 2.76µM | | | (Richendrfer et al., 2012; Roh and Choi, 2008; Watson et al., 2014) |
| | 238µM, day 2 | | | | | | | | | |
| Coumaphos | 2.56µM | N.D | | | | | | 585µM, 24h | | (Sánchez-Fortún et al., 1995) |
| | | | | | | | | | | |
| Gentamicin | >50mg/L | >50mg/L | | | | | | | >955mg/L, Day 4 | USEPA. (2000). Pesticide Ecotoxicity Database [Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)]. |
| | | | | | | | | | | |

3.6 Effect of solvent use and antibiotic treatment on planarian behaviour

Gentamicin was tested in order to evaluate its impact on planarian health in the context of animal husbandry, therefore the LC₅₀ could not be determined in the concentration range tested, and is estimated to be over 50mg/mL. *S.mediterranea* is more sensitive to ethanol than *D.japonica*, LC₅₀ were respectively 1.52% and 3.80%. For DMSO, 24h LC₅₀ was 4.76% for *D.japonica*. LC₅₀ calculation was described ambiguous for and was hardly estimated around 5.31% for *S.mediterranea* (Table 3; Supp. data 7).

Exposure to increasing sublethal concentrations of DMSO for 24h did not significantly affect the locomotor activity of planaria (Table 2; supp. data 8) compared to the control. However, a concentration effect after ethanol exposure on distance travelled was highlighted for *S.mediterranea* (F=18.58, p<0.0005), with a significant decrease of 1.89 and 4.34 times at respectively 0.5% and 1% compared to control (Table 2; supp. data 10). Exposure to gentamicin revealed a concentration effect for *D.japonica* (F=3,13, p<0,05) for which the activity of planarians maintained in 50mg/L of gentamicin was 1.4 times higher than that of the ones maintained in 25mg/L (Table 2; supp. data 12).

For PMR, in a general way, a wavy pattern was observed for both species exposed to all solvents. *S.mediterranea* exposed to 1% DMSO showed a strong significant concentration effect on distance travelled decrease (F=5.67, p <0.0005) at 0.01% (p<0.005) and 0.1% (p<0.05) (Table 2; supp. data 9). *S.mediterranea* exposed to 1% ethanol showed a strong concentration effect on distance travelled (F=7.94, p<0.0005) where the distance travelled at 0.01% (p<0.0005) and 0.5% (p<0.0005) was significantly different from the controls (Table 2; supp. data 11). For *D.japonica* exposed to gentamicin, a significant concentration effect on distance travelled (F=3.72, p <0.05) was observed with the distance travelled at 12.5mg/L (p<0.05) being higher compared to the controls, and planarian at 25mg/L travelling significantly less compared to 12.5mg/L ones (p<0.05) (Table 2; supp. data 13). No concentration effect was observed for *S.mediterranea*.

In all cases, an important period effect was also highlighted for both species because Light 1 is different from all the others with DMSO (F=29.89, p<0.0005 for *D.japonica*; F=91.61, p<0.0005 for *S.mediterranea*) (Supp. data 9), ethanol (F=50.87, p<0.0005 for *D.japonica*; F=83.36, p<0.0005 for *S.mediterranea*) (Supp. data 11) and gentamicin (F=31.49, p<0.0005 for *D.japonica*; F=113.67, p<0.0005 for *S.mediterranea*) (Supp. data 13).

DMSO is a common solvent used to help dissolve hydrophobic/ lipophilic compounds. Also, when compared with established toxicological model organisms, planarians do show comparable sensitivity to DMSO (Table 3). Here we showed that exposition over 24h to 0.01-1% of DMSO did not significantly affect planarian locomotion even if results seemed less stable for *D.japonica*. In our case, PMR of *S.mediterranea* seemed to be more sensitive to DMSO, as response at 0.01% and 0.1% were found significantly different from control.

Herein, we showed that exposure to 0.5% and 1% ethanol significantly decreased locomotion in *S.mediterranea* but not *D.japonica*, for which locomotor performance tended to slightly decrease with ethanol concentrations, potentially implying a partial effect on locomotion. Thus, in our study, *S.mediterranea* seemed more sensitive to ethanol than *D.japonica*. Caution should therefore be exercised when extrapolating results between species. When using ethanol as a carrier solvent, one should consider working with *D.japonica*.

Here, we observed that, at the highest concentration (50mg/L) of gentamicin (a broad-spectrum antibiotic), *D.japonica* moved significantly more compared to the previous concentration (25mg/L) while having no effect on the response to light stress. For *S.mediterranea*, exposure to increasing concentrations of gentamicin had no effect on exploratory behaviour while the expected wavy pattern of light stress disappeared at the two highest concentrations. Afterwards, we recommend spacing the antibiotic treatment (50mg/mL) and the experiments and consider that antibiotic treatment may bias the results.

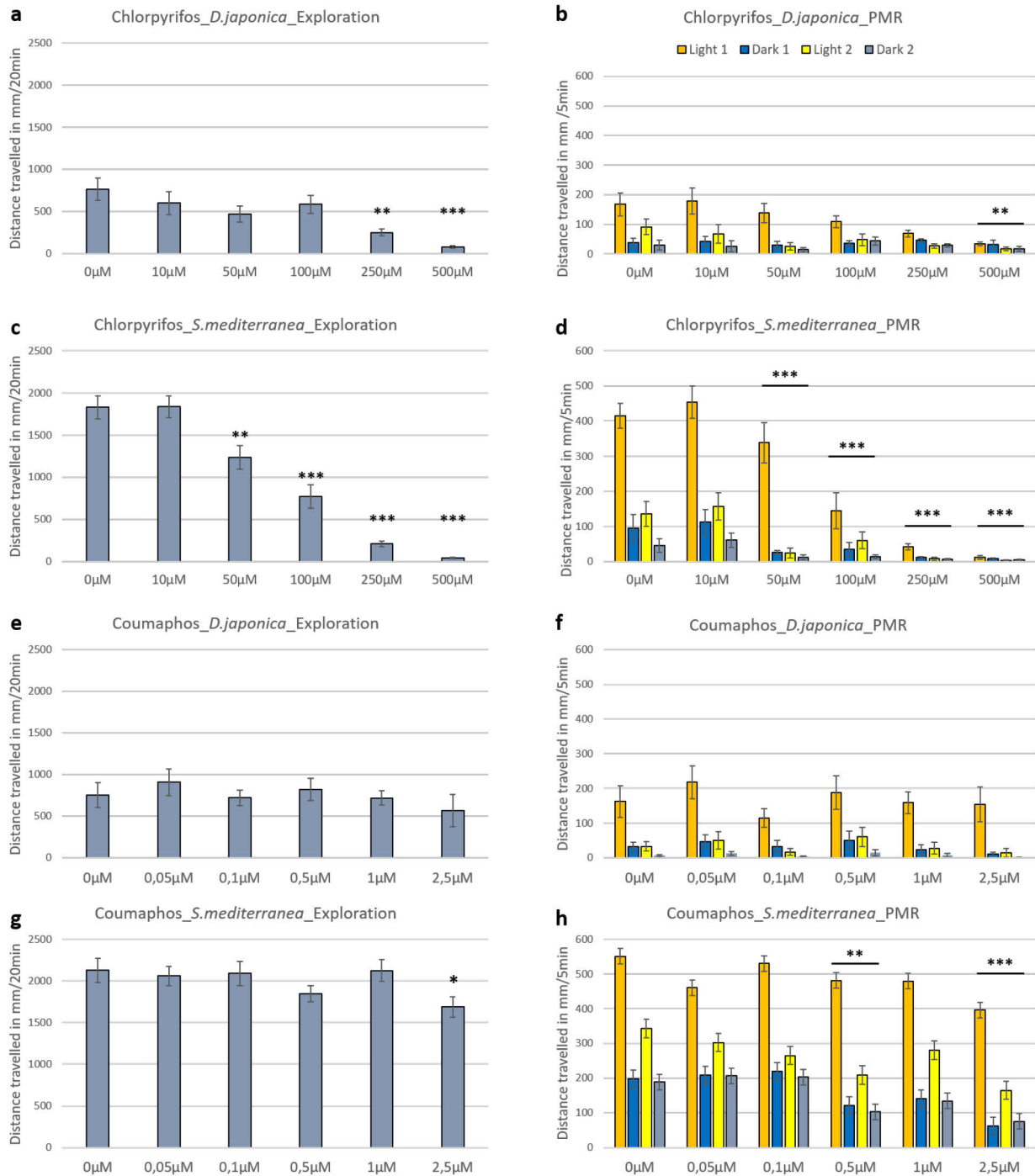


Figure 4: Comparison of the behavioural responses of two planarian species exposed to organophosphorus pesticides. (a-d) *D.japonica* and *S.mediterranea* species exposed to Chlorpyrifos (10 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM). Distance travelled over 20 minutes of recording for *D.japonica* (a), and for *S.mediterranea* (c). Effect of light stimuli on distance travelled over 5 minutes periods of recording for *D.japonica* (b) and *S.mediterranea* (d). (e-h) *D.japonica* and *S.mediterranea* species exposed to Coumaphos (0.05 μM , 0.1 μM , 0.5 μM , 1 μM , 2.5 μM). Distance travelled over 20 minutes of recording for *D.japonica* (e), and for *S.mediterranea* (g). Effect of light stress on distance travelled over 5 minutes periods of recording for *D.japonica* (f) and *S.mediterranea* (h). Data represent the mean \pm SE. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.0005$ compared with control group (0 μM) (n=12 except for *D.japonica* 2.5 μM Coumaphos for which n=6).

3.7 Effect of exposure to organophosphorus pesticides (OP) on planarian behaviour

We first analysed the lethality of planaria exposed to increasing concentrations of OP for 24h to identify the sublethal concentrations to which we would expose planaria for behavioural testing. For *D.japonica*, *D.japonica* (24h LC₅₀=961µM) is more sensitive to Chlorpyrifos than *S.mediterranea* (1118µM). As for Coumaphos, due to experimental trouble, LC₅₀ could be determined only for *D.japonica* (2.56µM; Table 3, supp. data 7).

3.7.1 Chlorpyrifos

Exposure to increasing concentrations of Chlorpyrifos affected negatively the distance travelled for both planarian species. Indeed, for *D.japonica*, the distance travelled at the highest concentrations (250µM and 500µM) was significantly lower than the control (F=5.26, $p<0.005$; Fig. 4a). Among the two species, *S.mediterranea* appeared to be more sensitive to Chlorpyrifos, we observed a significant decrease in travelled distance starting at 50µM (F=54.6, $p<0.0005$) (Fig. 4c).

A wavy pattern was observed for both species in control conditions but disappear for *D.japonica* at 50µM, 250µM and 500µM, and for *S.mediterranea* at 250µM and 500µM in relation to a decrease in activity over periods (Fig. 4b and d). For *S.mediterranea*, this decrease is significant starting from 50 µM (F=41.50, $p<0.0005$). For *D.japonica* this effect is significant only at 500 µM (F=3.31, $p<0.05$).

A period effect was also highlighted for both species (F=23.15, $p<0.0005$ for *D.japonica*; F=93.06, $p<0.0005$ for *S.mediterranea*) with period Light 1 differing from other periods as previously observed in other assays. (Fig. 4b and d).

3.7.2 Coumaphos

Exposure to increasing sublethal concentrations of Coumaphos for 24h did not significantly affect the locomotor activity of *D.japonica* compared to the control (Fig. 4e). However, exposure to the highest concentration (2.5µM) led to a significant decrease in locomotion (around 1.3 times lower) of *S.mediterranea* (F=2.6, $p<0.05$) (Fig. 4g).

A wavy pattern was observed for both species at all concentrations except for *D.japonica* 0.1µM which showed a decrease in activity over periods (Fig. 4f). As observed for the exploration test, for *S.mediterranea*, distance travelled at 0.5µM and 2.5µM was significantly lower compared to controls (F=10.09, $p<0.0005$; Fig. 4h). No concentration effect was observed for *D.japonica*. Like observed before, the light 1 period is significantly different

from the others for both species ($F=48.96$, $p<0.0005$ for *D.japonica*; $F=120.81$, $p<0.0005$ for *S.mediterranea*).

In summary, for both pesticides, there is a general drop in mobility in both tests, which in the PMR test is translated by the disappearance of the wavy pattern at the highest concentrations.

4. Discussion

Freshwater planarian are emerging as a valuable *in vivo* model for toxicological studies, but the lack of harmonization of procedures between laboratories (Wu & Li, 2018) remains a challenge. In the present work, we implemented the exploration and PMR assays on four planaria species. Both of these tests are based on the analysis of locomotion. Locomotion was usually analysed with the planarian Locomotor Velocity (pLMV) method, which entails counting each time the worm cross a square of a grid lined petri dish (Raffa et al., 2001). Although pLMV has shown to be a simple and sensitive metric with a consistency over observation periods, observer bias has been pointed out as times of observation, ways of counting, size of the grid and lightening condition may vary rendering results comparison difficult (Rodrigues et al., 2016). Nevertheless, pLMV method is time consuming as it allows testing only one planaria at a time. Live video tracking and image analysis holds higher precisions and high throughput analysis and the availability of devices for automated tracking of animal locomotion makes the analysis more reliable and repeatable.

Using exploration and PMR, we eliminated *G.tigrina* and *S.polychroa* for their lack of stability in behavioural responses to photoperiod cycle variation. Then, with the two selected species, *D.japonica* and *S.mediterranea*, and by using the DanioVision, we sought to optimize the two behavioural tests, by evaluating the effects of two parameters (the space allocated to planarian movement and the use of light) and concluded that it was preferable to carry out the exploration and PMR test at 100% light intensity and in 24-well plates. With these parameters defined, we assessed the effect of antibiotic treatment and two solvents on the behaviour of the two species. *D.japonica* proved to be more sensitive to sublethal concentrations of gentamicin and DMSO, while *S.mediterranea* was more sensitive to ethanol. We then studied the implementation of two other behavioural tests: Tapping and PLDT showed promising results, but still require improvement and were not retained for the final phase of this work. Finally, as a proof of concept, we evaluated the effect of sublethal doses of two OPs on planarian

behaviour, in order to link it to cholinergic neuron function, and found that *S.mediterranea* was more sensitive to Chlorpyrifos and Coumaphos than *D.japonica*.

4.1 Parameter calibration for behavioural testing

In our study, the behavioural responses of *G.tigrina* and *S.polychroa* were significantly different depending on the photoperiod cycle, with the amplitude of the responses being higher for planarians kept in darkness. Based on these results, it can be assumed that *D.tigrina* and *S.polychroa* are sensitive to photoperiodic cycle variations. Differences in the diurnal activity of different species of freshwater planaria have been highlighted and could explain this condition effect. Namely, Lombardo (2011) found out that, in a 12:12 (LD) photoperiod context, *D. tigrina* was most active at night (21:00-3:00), while *S.polychroa* was active almost throughout a 24-hour cycle (Lombardo et al., 2011). In contrast, under a 16:8 photoperiod (LD) cycle, Martinez (2020) showed that *D.tigrina* and *S.polychroa* were more active during the day than at night. Meanwhile, in the same study, no difference between daytime and night-time activities was found for *S.mediterranea* (Martinez et al., 2020). This last observation could explain why in the current study, when assayed between 9 am to 5pm, photoperiodic cycling had no significant effect on locomotor performance and response to light stimulation in *S.mediterranea*, and *D.japonica*. However for both species, the amplitude of responses was lower for planaria kept in darkness and similar results were observed by Itoh (1999) regarding circadian rhythms. The pattern of variation in melatonin levels is a common indicator of circadian rhythm in mammals (Reiter, 1993). It was demonstrated that in planarians, melatonin synthesis fluctuates in a circadian manner (Itoh et al., 1999), and that the pattern was conserved when *D.japonica* were transferred from a 12:12 (LD) cycle to a DD cycle for 3-4 days. However, the amplitude of the rhythm was reduced compared to that of 12:12 (LD) worms (Itoh & Igarashi, 2000). A parallel could be drawn between the variation in the amplitudes of the locomotor response and the fluctuation of melatonin synthesis but further investigations are needed. In terms of metabolic physiological responses, the trends we observed for *D. japonica* and *S. mediterranea* are consistent with the results of a previous study. Indeed, in Lewallen and Burgen's (2020) study, $\dot{V}O_2$ measurements of *Girardia dorocephala* that were maintained in darkness tend to be lower than those maintained in a 12:12 (LD) cycle but is not significantly different (Lewallen & Burggren, 2020). The differences in the responses of *D.tigrina* and *S.polychroa* in the photoperiod test may be related to the origin of these two species, as they were gathered from actual rivers, in contrast to *S.mediterranea* and *D.japonica*, which were from established lab cultures. Indeherberg (1999) has already pointed out that even within the

same planarian species (*Polycelis tenuis*), sensitivity can differ between populations depending on the conditions of their original environmental habitat (Indeherberg, 1999). Also, experimental conditions may vary between laboratories (light intensity, measurement method) and might account for the inconsistency of findings from one research lab to another.

To our knowledge, this is the first study which formally assesses the effect of well size on the behavioural responses of planarians. Regardless of the type of field/plate (rectangular or circular), planarians have shown a spontaneous wall preference. In circular fields, this preference for walls is even stronger in smaller fields (60 mm) than in large ones (200mm) (Akiyama et al., 2015). Thus, working in small volumes and with well plates would be even more consistent with this spontaneous behaviour of planaria. We observed that both *D.japonica* and *S.mediterranea* are more mobile in 24-well plates compared to the 48 ones. Hence, carrying behavioural tests in 24-well plates will make the detection of subtle changes in behaviour easier. Besides, Ireland (2020) pointed out that when using 48-well plates under chronic exposure, the health of *G. tigrina* worsened over time and even led to total immobilisation or death (Ireland et al., 2020).

4.2 Implementation of the Planarian Light Dark Test

The PLDT is well documented in the literature, here we sought to develop an automated version of it using the DanioVision tool. Planarian Light Dark Test is an adapted version of the conditioned place preference (CPP) assay commonly used in rodents (McKendrick & Graziane, 2020) and fish (Mathur et al., 2011) and have shown to be a predictive tool to assess freshwater flatworm's response to anxiolytic and anxiogenic drugs and predator odor exposure (Zwede et al, 2018; Cho et al, 2019; Adam et al, 2019). We found out that, either of *S.mediterranea* and *D.japonica* displayed natural place preference because they spend approximately 50% of the time in each zone. However, when PLDT set up was on, both species tend to spent more time in the dark zone, with *S.mediterranea* spending slightly more than *D.japonica*, (60.2 % and 54.9 % respectively). These results are in an accordance with planarians photophobic behaviour (Davidson et al., 2011), but were not statistically significant. Like us, Martinez (2020) also observed that planarian affinity for darkness was species dependent, but unlike us, they demonstrated strong negative phototaxy with *S. mediterranea* spending 5% of its time only in the light zone during over 20min (Martinez et al., 2020). Comparing our results with theirs, we can exclude an effect of the duration of acquisition, since we also carry out this test over 20 minutes. However, they did test planarians in 1000 mm plastic Petri dishes, with half of the dish covered in dark lightproof tape, whereas we used 24-well plates with a black Plexiglas frame

underneath designed to cover half of each well and not cover the rising edges of the well. Thus, unintended penetration of light within the dark part of the well, due to the design of the black frame, may have influenced our results.

4.3 Investigation of planarian locomotion as a readout of tapping stimulus

The tapping test has already been used with planarians. Indeed, by studying the effect of the vibratory stimuli on contraction of their body, Ross (2018) has shown to be a reliable readout of sensory neuron dysfunction linked to the defect *SoxB1* gene (Ross et al., 2018). As performed in (Faria et al., 2019) for zebrafish, here in, rather than studying body contraction, we wanted to study the potential of locomotion as an indicator for analysing the response of planaria to the tapping stimulus. We observed that tapping stimulus tend to have an effect on the behaviour of planaria, as for both species, the distance travelled after tappings decreased compared to before. This decrease could be explained by motor fatigue after the startle response. However, this results rendered statistically insignificant. Unlike the measure of body contraction used by Ross (2018) which proved to be a good indicator of an anxiety-like response, locomotion seems not to be sufficiently impaired by tapping stimulus. As performed in this study, this test needs additional investigations like increasing the number of individuals tested, to find out whether the trend observed persists. Also, we did not analyse the possibilities of planarians becoming habituated to the tapping stimulus, as each planaria was essayed only one time.

4.4 Proof of concept: behaviour as a neurological readout

In the exploration test, we observed that chlorpyrifos reduced planarian locomotion in a dose-dependent manner especially for *S.mediterranea*. For *D. japonica*, locomotion was significantly decreased only at the two highest concentrations. Like for higher vertebrates, planarians cholinergic transmission is linked to motor function, in particular to muscle contraction, and therefore to locomotion (Hagstrom et al., 2015, 2017; Nishimura et al., 2010; Ross et al., 2017). Thus, planarian locomotion is considered a good readout to assess the effects of compounds on behaviour and the underlying mechanisms involved such as disruption of the cholinergic system. Indeed, OPs act by inhibiting acetylcholinesterase (AChE) activity, inducing an accumulation of acetylcholine (ACh) and thus over-excitation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) at the neuromuscular junction, resulting in prolonged muscle contraction (Sidhu et al., 2019). The reduction in locomotion we observed could be the result of dysfunctional neuromuscular communication mediated by the inhibition of DjChE activity by organophosphate pesticides (Hagstrom et al., 2017). With these results, we show that the

effects of OPs on cholinergic neurons are conserved in planaria and manifest in impaired locomotion. Accordingly, Nishimura (2010) have observed that administration of physostigmine, also an AChE inhibitor induced muscle contraction behaviour in a concentration dependent manner in *D.japonica* (Nishimura et al., 2010). Similar to our observations, Zebrafish and *Xenopus* treated with Chlorpyrifos showed a concentration-based decrease in swimming activity that began at 0.1 μM and 1 μM , respectively (Watson et al., 2014). In the case of Coumaphos, the results were less spectacular: although locomotor performance during exploration appeared unstable for both species across concentrations, a significant drop in locomotion was observed only for *S.mediterranea*, and solely at the highest concentration. Comparing $\text{LC}_{50\text{s}}$, in our study (Table 3) we found that planarians were more sensitive to Coumaphos than to Chlorpyrifos with respectively 2.55 μM and 961 μM 24h LC_{50} for *D.japonica*. Although both are organophosphate pesticides, differences in chemical structures may induce variations in responses and explain the differences in sensitivity. To our knowledge, Coumaphos has never been tested on planarians, nevertheless *D. japonica* was more sensitive to Coumaphos than the aquatic arthropod *Artemia salina* with 24h LC_{50} of 2.56 μM and 585 μM (21.23mg/L), respectively (Sánchez-Fortún et al., 1995). Nevertheless, both species have proved to be sensitive to OPs.

Based on this analysis, we can conclude that the exploration test is relevant for analyzing the toxic effect of OPs on planaria. Regarding PMR, at first, planarian seems to respond accordingly to the protocol since the expected wavy pattern is met in controls: under light stimuli, planarians travel more than during dark phases. But, as observed throughout the study, they always respond strongly in the first light period then the amplitude of response decrease over the other periods. Aoki (2009) experienced similar results, by analyzing electroencephalogram (EEG) of planarian during photo-stimulation, they found out that planarians *brain* activity decreased in amplitude in response to frequent light changes (Aoki et al., 2009). Also, interestingly, the results of PMR seem to mimic those of exploration, with a loss of the wavy pattern and significant differences with the control, essentially at the same concentrations that showed a significant effect in exploration. It appears that the general inhibitory effect of OPs on locomotion overrides the effect of the light stimulus. Therefore, we can neither analyze nor conclude on a cumulative effect of light stimulation and pesticide. PMR is not relevant to analyse the effects of AChE inhibitor. However, since the GABAergic system is the one implicated in photosensitivity in planaria (Nishimura et al., 2008), it would be

interesting to consider and study PMR for assessing the effect of molecules that might disrupt the function of the GABAergic system.

5 Conclusion

The aim of this study was to optimize, automate and select the best behavioural tests and analyse the potential of different planarian species as models for (eco) toxicological studies. With regard to the behavioural tests, we conclude that the exploration test, based on the analysis of induced locomotion in planaria, is robust and reliable for toxicological studies on planaria. As for the Photomotor Response (PMR) test, the effect on locomotion observed during exploration, seems to override the effect of the light stimulus. At present, this test cannot be used solely for toxicological studies, and needs further investigation. The current readout of Tapping and the set-up of Planarian Light Dark Test (PLDT) need to be revised to enable their use in toxicity screening with the DanioVision system in the future.

Regarding interspecies sensitivity, *D.japonica* and *S.mediterranea* have proved to be sensitive models for toxicological screening of organophosphorus pesticides through behavioural analysis. Even if, under necessary experimental conditions the motility baseline in control *S.mediterranea* was always higher than for *D.japonica*, both species response, allowed the detection of behavioural changes, making both good models for behavioural testing in (eco) toxicological context. Thus, this work is implementing the effort of establishing the planarian as an *in vivo* model for toxicological assessment throughout behaviour analysis.

Credit authorship contribution statement

Lucia Rejo: methodology, experimentation, formal analysis, investigation, validation, writing – original draft and editing. **Jean-Michel Malgouyres:** methodology, investigation. **Elsa Bonnafé:** conceptualization, funding acquisition, supervision, writing- review and editing. **Caroline Vignet:** conceptualization, funding acquisition, methodology, supervision, writing-original draft, review and editing.

Acknowledgements

Lucia Rejo's PhD contract is funded by the Occitanie Region and the Institut National Universitaire J-F Champollion

References

- Akiyama, Y., Agata, K., Inoue, T., 2015. Spontaneous behaviors and wall-curvature lead to apparent wall preference in planarian. *PLoS One* 10, e0142214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142214>
- Arnold, C.P., Shane Merryman, M., Harris-Arnold, A., McKinney, S.A., Seidel, C.W., Loethen, S., Proctor, K.N., Guo, L., Alvarado, A.S., 2016. Pathogenic shifts in endogenous microbiota impede tissue regeneration via distinct activation of TAK1/MKK/p38. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.16793>
- Bichara, D., Calcaterra, N.B., Arranz, S., Armas, P., Simonetta, S.H., 2013. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. <https://doi.org/10.1002/jat.2856>
- Buttarelli, F.R., Pellicano, C., Pontieri, F.E., 2008. Neuropharmacology and behavior in planarians: Translations to mammals. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.01.009>
- Buttarelli, F.R., Pontieri, F.E., Margotta, V., Palladini, G., 2000. Acetylcholine/dopamine interaction in planaria. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 125, 225–231. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00111-5](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00111-5)
- Byrne, T., 2018. Effects of ethanol on negative phototaxis and motility in brown planarians (*Dugesia tigrina*). *Neurosci. Lett.* 685, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.030>
- Chen, T.H., Wang, Y.H., Wu, Y.H., 2011. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquat. Toxicol.* 102, 162–166. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2011.01.010>
- Cochet-Escartin, O., Carter, J.A., Chakraverti-Wuerthwein, M., Sinha, J., Collins, E.M.S., 2016. Slo1 regulates ethanol-induced scrunching in freshwater planarians. *Phys. Biol.* 13. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/5/055001>
- Cochet-Escartin, O., Mickolajczyk, K.J., Collins, E.M.S., 2015. Scrunching: A novel escape gait in planarians. *Phys. Biol.* 12. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/12/5/056010>
- Dhawan, R., Dusenbery, D.B., Williams, P.L., 1999. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 58, 451–462. <https://doi.org/10.1080/009841099157179>
- Faria, M., Prats, E., Novoa-Luna, K.A., Bedrossiantz, J., Gómez-Canela, C., Gómez-Oliván, L.M., Raldúa, D., 2019. Development of a vibrational startle response assay for screening

- environmental pollutants and drugs impairing predator avoidance. *Sci. Total Environ.* 650, 87–96. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.421>
- Hagstrom, D., Cochet-Escartin, O., Zhang, S., Khuu, C., Collins, E.M.S., 2015. Freshwater Planarians as an Alternative Animal Model for Neurotoxicology. *Toxicol. Sci.* 147, 270–285. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFV129>
- Hagstrom, D., Hirokawa, H., Zhang, L., Radic, Z., Taylor, P., Collins, E.M.S., 2017. Planarian cholinesterase: in vitro characterization of an evolutionarily ancient enzyme to study organophosphorus pesticide toxicity and reactivation. *Arch. Toxicol.* 91, 2837–2847. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1908-3>
- Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.006>
- Hinrichsen, R.D., Fabi, J.L., Craig, S.E., Rovins, P.S., Cerwensky, A.J., Major, R.J., Ruby, C.L., 2019. Photoresponsivity and motility in the planarian *Schmidtea mediterranea* vary diurnally. *Chronobiol. Int.* 36, 1789–1793. <https://doi.org/10.1080/07420528.2019.1683023>
- Huang, Y., Cartlidge, R., Walpitagama, M., Kaslin, J., Campana, O., Wlodkovic, D., 2018. Unsuitable use of DMSO for assessing behavioral endpoints in aquatic model species. *Sci. Total Environ.* 615, 107–114. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.09.260>
- Ireland, D., Bochenek, V., Chaiken, D., Rabeler, C., Onoe, S., Soni, A., Collins, E.-M.S., 2020. *Dugesia japonica* is the best suited of three planarian species for high-throughput toxicology screening. *bioRxiv* 2020.01.23.917047. <https://doi.org/10.1101/2020.01.23.917047>
- Itoh, M.T., Igarashi, J., 2000. Circadian rhythm of serotonin levels in planarians. *Neuroreport* 11, 473–476. <https://doi.org/10.1097/00001756-200002280-00009>
- Itoh, M.T., Shinozawa, T., Sumi, Y., 1999. Circadian rhythms of melatonin-synthesizing enzyme activities and melatonin levels in planarians. *Brain Res.* 830, 165–173. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01418-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01418-3)
- Knakievicz, T., 2014. Planarians as invertebrate bioindicators in freshwater environmental quality: the biomarkers approach. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, v 9, 1–12. <https://doi.org/10.5132/eec.2014.01.001>
- Lee, F.J., Williams, K.B., Levin, M., Wolfe, B.E., 2018. The Bacterial Metabolite Indole Inhibits Regeneration of the Planarian Flatworm *Dugesia japonica*. *iScience* 10, 135–148. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2018.11.021>

- Lewallen, M., Burggren, W., 2020. Metabolic physiology of the freshwater planaria *girardia dorocephala* and *Schmidtea mediterranea*: Reproductive mode, specific dynamic action, and temperature. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 319, R428–R438. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00099.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH60092099250006.JPEG>
- Lombardo, P., Giustini, M., Miccoli, F.P., Cicolani, B., 2011. Fine-scale differences in diel activity among nocturnal freshwater planarias (Platyhelminthes: Tricladida). *J. Circadian Rhythms* 9. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-9-2/METRICS/>
- Maes, J., Verlooy, L., Buenafe, O.E., de Witte, P.A.M., Esguerra, C. V., Crawford, A.D., 2012. Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS One* 7, e43850. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0043850>
- Martinez, O., Sire, S., Saunier, A., Malgouyre, J.-M., Fournier, A., Vignet, C., 2020. Behavioral responses of three freshwater planaria species to light, visual and olfactory stimuli: setting the stage for further ecotoxicological studies. *Behav. Processes* 183, 104295. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104295>
- Mathur, P., Lau, B., Guo, S., 2011. Conditioned place preference behavior in zebrafish. *Nat. Protoc.* 2011 6, 338–345. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.201>
- McKendrick, G., Graziane, N.M., 2020. Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Front. Behav. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2020.582147>
- Merryman, M.S., Sánchez Alvarado, A., Jenkin, J.C., 2018. Culturing planarians in the laboratory, in: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 241–258. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_5
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Taniguchi, T., Agata, K., 2010. Analysis of motor function modulated by cholinergic neurons in planarian *dugesia japonica*. *Neuroscience* 168, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.038>
- Pagán, O.R., Rowlands, A.L., Urban, K.R., 2006. Toxicity and behavioral effects of dimethylsulfoxide in planaria. *Neurosci. Lett.* 407, 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.073>
- Raffa, R.B., Holland, L.J., Schulingkamp, R.J., 2001. Quantitative assessment of dopamine D2 antagonist activity using invertebrate (Planaria) locomotion as a functional endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 45, 223–226. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(01\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(01)00152-6)

- Reiter, R.J., 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49, 654–664. <https://doi.org/10.1007/BF01923947>
- Rice, C., Ghorai, J.K., Zalewski, K., Weber, D.N., 2011. Developmental lead exposure causes startle response deficits in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 105, 600–608. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2011.08.014>
- Richendrer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Créton, R., 2012. Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 458–465. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2012.04.010>
- Ro, Y., Noronha, M., Mirza, B., Ansari, R., Gerlai, R., 2021. The Tapping Assay: A Simple Method to Induce Fear Responses in Zebrafish. *Behav. Res. Methods* 1–14. <https://doi.org/10.3758/S13428-021-01753-9>
- Rodrigues, A.C.M., Henriques, J.F., Domingues, I., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A.M.V.M., Pestana, J.L.T., 2016. Behavioural responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. *Aquat. Toxicol.* 170, 371–376. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2015.10.018>
- Roh, J.Y., Choi, J., 2008. Ecotoxicological evaluation of chlorpyrifos exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 483–489. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2007.11.007>
- Ross, K.G., Currie, K.W., Pearson, B.J., Zayas, R.M., 2017. Nervous system development and regeneration in freshwater planarians. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 6, e266. <https://doi.org/10.1002/wdev.266>
- Sánchez-Fortún, S., Sanz-Barrera, F., Barahona-Gomariz, M. V., 1995. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 76–82. <https://doi.org/10.1007/BF00196272>
- Sarnat, H.B., Netsky, M.G., 2002. When does a ganglion become a brain? Evolutionary origin of the central nervous system. *Semin. Pediatr. Neurol.* 9, 240–253. <https://doi.org/10.1053/SPEN.2002.32502>
- Schretter, C.E., Vielmetter, J., Bartos, I., Marka, Z., Marka, S., Argade, S., Mazmanian, S.K., 2018. A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nat.* 2018 5637731 563, 402–406. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0634-9>
- Shettigar, N., Joshi, A., Dalmeida, R., Gopalkrishna, R., Chakravarthy, A., Patnaik, S., Mathew, M., Palakodeti, D., Gulyani, A., 2017. Hierarchies in light sensing and dynamic interactions between ocular and extraocular sensory networks in a flatworm. *Sci. Adv.* 3. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1603025>

- Shomrat, T., Levin, M., 2013. An automated training paradigm reveals long-term memory in planarians and its persistence through head regeneration. *J. Exp. Biol.* 216, 3799–3810. <https://doi.org/10.1242/JEB.087809>
- Sluys, R., Riutort, M., 2018. Planarian Diversity and Phylogeny. *Methods Mol. Biol.* 1774, 1–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_1
- Stevens, A.S., Piroette, N., Plusquin, M., Willems, M., Neyens, T., Artois, T., Smeets, K., 2015. Toxicity profiles and solvent–toxicant interference in the planarian *Schmidtea mediterranea* after dimethylsulfoxide (DMSO) exposure. *J. Appl. Toxicol.* 35, 319–326. <https://doi.org/10.1002/JAT.3011>
- Van Huizen, A. V., Tseng, A.S., Beane, W.S., 2017. Methylisothiazolinone toxicity and inhibition of wound healing and regeneration in planaria. *Aquat. Toxicol.* 191, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.013>
- Varshney, S., Gora, A.H., Siriyappagouder, P., Kiron, V., Olsvik, P.A., 2022. Toxicological effects of 6PPD and 6PPD quinone in zebrafish larvae. *J. Hazard. Mater.* 424. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.127623>
- Vignet, C., Bégout, M.L., Péan, S., Lyphout, L., Leguay, D., Cousin, X., 2013. Systematic Screening of Behavioral Responses in Two Zebrafish Strains. <https://home.liebertpub.com/zeb> 10, 365–375. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2013.0871>
- Watson, F.L., Schmidt, H., Turman, Z.K., Hole, N., Garcia, H., Gregg, J., Tilghman, J., Fradinger, E.A., 2014. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1337–1345. <https://doi.org/10.1002/ETC.2559>
- Wu, J.P., Li, M.H., 2018. The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies: Advantages and potential. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.057>
- Yuan, Z., Shao, X., Miao, Z., Zhao, B., Zheng, Z., Zhang, J., 2018. Perfluorooctane sulfonate induced neurotoxicity responses associated with neural genes expression, neurotransmitter levels and acetylcholinesterase activity in planarians *Dugesia japonica*. *Chemosphere* 206, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.011>
- Zabala, N.A., Gómez, M.A., 1991. Morphine analgesia, tolerance and addiction in the cricket *Pteronemobius* sp. (Orthoptera, Insecta). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40, 887–891. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90102-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90102-8)

Chapitre III : Etude de l'effet de l'effet de molécules neuroactives sur le comportement des planaires



1. Synthèse de l'article 3

Dans ce chapitre, le test de locomotion dont les paramètres ont été validés dans l'article 2 du chapitre 2, est utilisé pour évaluer la toxicité de deux composés neuroactifs, la nicotine et l'imidacloprid, deux polluants retrouvés dans les milieux aquatiques, et agonistes des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, chez les mammifères et les insectes respectivement.

Nous avons évalué l'effet d'une exposition aiguë aux deux substances neuroactives sur les planaires à l'aide de deux paramètres comportementaux : la locomotion des planaires et l'analyse d'indicateurs posturales et morphologiques appelées stéréotypies. Ensuite, la variation de l'expression de 12 gènes cholinergiques putatifs a été analysée à la concentration la plus faible à laquelle les planaires présentaient une mobilité significativement altérée. L'exposition à 0,09 à 0,8 mM de nicotine pendant 24 heures a produit des effets biphasiques sur les stéréotypies : *S.mediterranea* a présenté des hyperkinésies de type *c-shape* et *screw-like* à T0, et des hypokinésies de type *walnut* de T1h à 24h. Lors de l'exposition à 0,1 à 1,7 μ M d'imidaclopride, les planaires ont montré un comportement de type sauvage prédominant, mais des hyperkinésies de type *screw-like* ont également été observées de manière dépendante de la concentration. L'exposition à 0,08 à 0,3 mM de nicotine pendant 24 heures a diminué la mobilité de manière dépendante de la concentration. Alors que 0,01 et 0,1 μ M d'imidaclopride ont augmenté la mobilité, et de 0,3 à 1,92 μ M, les planaires se sont comportées comme des contrôles. Les planaires ayant une locomotion réduite à 7,8 μ M de nicotine ont montré une légère surexpression d'*ache2*. Et l'augmentation de la mobilité à 0,01 μ M d'imidaclopride a été accompagnée d'une légère sous-expression de *chat2* et de deux gènes codant pour des sous-unités des récepteurs nicotiniques, *nicor3* et *nicor4*. Cette étude contribue aux efforts visant à faire de planaire un modèle pour les études (éco) toxicologiques, en examinant le lien entre le comportement moteur et le niveau d'expression des gènes liés à l'axe cholinergique.



2. Article 3

Rejo, L., Ksen, M., Carayon, J.L., Marty, P., Malgouyres, J.M., Bonnafé, E., Vignet, C. Effect of acute exposure to two neuroactive compounds, nicotine and imidacloprid, on the behavioural response and expression of nicotinic receptor-encoding genes in planaria *Schmidtea mediterranea*. (En préparation)



Effect of acute exposure to two neuroactive compounds, nicotine and imidacloprid, on the behavioural response (locomotion, stereotypies) and expression of nicotinic receptor-encoding genes in planaria *Schmidtea mediterranea*

Lucia Rejo¹, Marie Ksen¹, Jean-Luc Carayon¹, Pierre Marty¹, Jean-Michel Malgouyres¹, Elsa Bonnafé¹, Caroline Vignet¹

¹Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA, 7417, Institut National Universitaire J-F Champollion, 81012 Albi, France

Keywords: Nicotine, neonicotinoid, nAChRs, locomotion, walnut, screw-like hyperkinesia, invertebrate, neurotoxicology

Abstract:

Planaria has emerged as a valuable model for toxicological and ecotoxicological studies: they display mammalian-like behaviours when exposed to addictive substances, and are considered a bioindicator of freshwater ecosystems. Nicotine and imidacloprid are both agonist of nAChRs. We assessed the effect of acute exposure to both neuroactives substances on planaria through two behavioural endpoints: stereotypy and motility. Then, variation in expression of 12 putative cholinergic genes were analysed at the lowest concentration at which planarian displayed significantly altered motility. Exposure to 0.09 to 0.8 mM nicotine for 24h produced biphasic effects on stereotypy: *S.mediterranea* exhibited screw-like and c-shape hyperkinesias at T0, and walnut hypokinesias from T1h to 24h. Upon exposure to 0.1 to 1.7 μ M Imidacloprid, planaria showed predominantly wildtype behaviour, but screw-like were also observed in a concentration-dependent manner. Exposure to 0.08 to 0.3 mM nicotine for 24h decreased motility in a concentration-dependent manner. Whereas 0.01 and 0.1 μ M imidacloprid increased motility, and from 0.3 to 1.92 μ M, planaria behaved like controls. Planaria with reduced locomotion at 7.8 μ M nicotine showed a slight up-regulation of *ache2*.



And increased motility at 0.01 μ M imidacloprid was accompanied by slight down-regulation of *chat2* and two nAChR genes, *nicor3* and *nicor4*. This study contributes to the effort to establish the planarian as a model for (eco) toxicological studies, by investigating the link between motor behaviour and the level of expression of genes linked to the cholinergic axis.

1. Introduction

Known for their regenerative abilities, freshwater planarians emerge as a valuable *in vivo* model for toxicological and ecotoxicological studies. The use of the free-living members of the Triclad in toxicological studies increased since the 1990s (Wu & Li, 2018). Planarians have a sensitivity comparable to that of well-established freshwater invertebrate models such as Daphnids (Hagstrom et al., 2015) could serve as a bioindicator of freshwater ecosystems (Knakievicz, 2014).

Planarians do share anatomical and molecular features of the mammalian brain (Pagán, 2014; Sarnat & Netsky, 2002) as demonstrated by numerous studies on cholinergic transmission in Platyhelminthes (Buttarelli et al., 2000, 2008; Hagstrom et al., 2017; Nishimura et al., 2010). Indeed, autonomous muscle-driven movement, responsible for motor function, are powered by a balance of dopaminergic and cholinergic neurons (Ross et al., 2017). Thus, various studies have demonstrated the usefulness of two distinct planarian behavioural endpoints in pharmacological experiments, namely the observation of changes in the normal motility of the worms (Hagstrom et al., 2016; Raffa et al., 2001) and the induction of planarian seizure-like movements also called stereotypies (Palladini et al., 1996; Passarelli et al., 1999; Van Huizen et al., 2017; Wu et al., 2014). Planarians show specific behavioural patterns, analogous to mammalian stereotypes, in response to drugs acting on acetylcholine or dopamine transmission (Buttarelli et al., 2008).

With the power of modern molecular techniques, the ultimate challenge of physiological discoveries is to find their possible significance in the context of the whole organism, not only through its behaviour, but also by analysing the underlying molecular mechanisms involved. Unlike, established invertebrate and vertebrate models, such as *Caenorhabditis elegans* and zebrafish for which established genetic makers of neuronal dysfunction are commonly analysed in toxicological studies (Levin et al., 2009), few studies combining behavioural assays and analysis of variation of gene expression have been done on planaria.



Nicotine is a toxic alkaloid found in the tobacco plant and a drug of abuse. The vast consumption of tobacco products resulted in the widespread nicotine contamination in surface water, wastewater and its classification as an emerging pollutant being frequently detected in wastewaters at a $\mu\text{g.L}^{-1}$ concentration level (reviewed in (Alberti et al., 2021)). Most importantly, nicotine is an agonist of one of the two types of cholinergic receptors, to which it gave its name, the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Neonicotinoids are derived from nicotine, and constitute a major class of extremely effective insecticides. Accounting for 41.5 % of the total neonicotinoid used worldwide. Imidacloprid is an effective neurotoxic pesticide that acts as a selective agonist at the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in insects (Jeschke et al., 2011). In agriculture, it is used to control pests through a systemic mode of action which is not specific to target species. Imidacloprid has shown to be neurotoxic for non-target species such as rats (Hassanen et al., 2023) and fish (Vignet et al., 2019; Zhang et al., 2021) and have been partially banned by the European Union in 2018 (EU, Implementing regulations 2018/784 and 2018/785), and finally without any derogatory use on January 2023 (Ruling C-162/21, Court of justice of the EU), due to its recognised toxicity on honeybees (Blacquière et al., 2012; Rondeau et al., 2014).

The significance of the planaria model for mammalian neurobiology and its suitability as a bioindicator of freshwater ecosystems make it a relevant species not only for assessing the effect of these two nAChRs agonists, but also for studying their effects on a non-target organism from the aquatic environment. Thus, establishing planaria as a model for toxicological or ecotoxicological studies.

In the current study, we evaluated the effect of two neuroactive compound, namely nicotine and imidacloprid known to interfere with acetylcholine nicotinic pathway that control motility in planarian. These effects have been evaluated at two levels: 1) on planarian behaviour through stereotypy and locomotion analysis; 2) at molecular level through the analysis of expression variation of nicotinic ACh receptor and AChE encoding genes.

2. Materials and methods

2.1 Planarian care

Asexual strains of *Schmidtea mediterranea* were obtained from Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, (Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany) and established in our lab since January 2021. Planarians were kept in 400mL in 1X Montjuïc salts water (1.6 mM

NaCl, 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgSO₄, 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM KCl, 1.2 mM NaHCO₃ in deionized water, pH~7.5) in glass Tupperware containers, and raised in an Aqualytic™ Refrigerated Incubator Model TC 445 S, 445 L, permanently set at 20°C, in the dark. Worms were exposed to light only when fed or cleaned in a room permanently set at 20°C. Planaria were fed twice a week with organic calf liver paste (Merryman et al., 2018) and frozen *Chironomus sp.* larvae and subsequently cleaned after feeding. Worms were starved for at least 5 days prior to use in experiments. All experiment were carried out in accordance with relevant animal protection guidelines.

2.2 Chemical exposure

Compounds were tested and prepared according to manufacturer guidelines. Nicotine ditartrate (cas 61-31-6) was purchased from Toronto Research Chemicals Inc. and imidacloprid (cas 138261-41-3) from A2S-France. Stocks of 10mM of Nicotine and 0.5mM (in 0.04% Trifluoroacetic acid) of Imidacloprid were prepared in ultrapure water. Working solutions were prepared at final concentration in autoclaved 1X Montjuich water, and all solutions were adjusted to pH7.5.

All behavioural tests were carried out during the day (9am-5pm) in a room permanently set at 20°C. Fully regenerated planarians (approximate size between 5 and 10mm) found gliding normally in the container were randomly selected and checked for abnormality. For every chemical concentration, for stereotypies and locomotion tests, respectively 15 (n=5 per replicate, 3 replicates) and 28 planarians (n=7 per replicate, 4 replicates) were tested in independent multi-well screening plates. Planarians were selected as described above, then using a p1000 micropipette fitted with a cut-off tip, one planaria was pipetted with Montjuich water from the Tupperware glass container, and placed into a well with the water. Once the plates were filled (1 worm per well), all planaria water was removed and appropriate volume of scheduled chemical concentration was added in each well. Final exposition volumes were 200µL in 48 well-plate and 400µL in 24 well-plates. These volumes allow free movements of planarians inside the well while preventing them from escaping to another one.

2.3 Stereotypies analysis

Each planaria was observed and recorded for stereotypies analysis at T0, T1, T3 and T24 hours post exposure with Leica S8 APO, *Greenough stereo microscope* equipped with a camera (Figure S1). The camera output was fed by a standard PC system running LasEZ 3.4 software,

which recorded 30-second videos. Each video was subsequently split into one frame per second, or 30 frames per video using the Fiji software (Schindelin et al., 2012). Images were retrieved perfectly labelled (compound, concentration, plate number, well position, recording time (T_post exposure) and frame number in the source video), enabling their analysis and classification into the following categories: wildtype, walnut, bridge-like, snake-like, c-shape, screw-like (Grebe & Schaeffer, 1991; Hagstrom et al., 2016; Wu et al., 2014), death, or undefined. Drawn representations of the different stereotypies observed in planarians is available in [Figure S1](#). For each individual, the time spent doing the stereotypy over 30 seconds at the 4 recording time points (T0 - T24h) was reported in a table for further analysis.

2.4 Locomotion behaviour

Analysis of locomotion behaviour was carried out as described in (Rejo et al., 2023), by using the DanioVision Observation Chamber (v.DVOC-0040T; Noldus, Netherlands) which consists of a video camera equipped with infrared and white light sources, a transparent multi-well plate holder, an intensity-adjustable white light below the plate holder. The camera output was fed into a standard PC system with EthoVision XT16 software that recorded video for later analysis. The DanioVision Chamber is combined with a temperature control unit set at 20°C for all experiments. The protocol consisted of an acclimation period of 5 minutes with light on (10,000 lux), to allow the planaria to adjust to the Noldus set up and for their baseline movement to settle. This was followed by a 20 min measurement of spontaneous swimming behaviour in the presence of light ([Figure S1](#)).

2.5 Analysis of compound concentrations

We sought to determine the actual concentration of chemicals to which planaria were exposed. For each tested concentration, a 100µL of water sample was collected at T0 and T24h, in a well with and without planaria, for stereotypy tests and only at T0 for locomotion. Samples were stored at -20 °C until analysis. Compounds concentrations were checked by high-performance liquid chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) detection using a Thermo Scientific HPLC Vanquish with UV/VIS diode array detector and Phenomenex Kinetex 5µM C18 100Å column. For both compounds, analytical standards were prepared in a 0.1% TFA aqueous solution, and the resulting standard curve equations were used to quantify our samples. For nicotine, elution was performed with an isocratic mobile phase composed of H₂O/Acetonitrile (90/10 v/v) at a flow rate of 1.25mL/min for 4 minutes. Nicotine was detected at a wavelength of 254nm, with retention time of 2.24 minutes. For Imidacloprid, we used a



mobile phase gradient of Acetonitrile and H₂O with the following acetonitrile content: from 0 to 1 min, 20%; at 5 min, 100% for 2 min; and at 8 min, 20% for 3 min, with an injection volume of 10 µL at a flow rate 1.25 ml/min, detection wavelength was 276 nm and the retention time was 4.73 min. Each sample was injected three times, data represents mean of results of three injections ± SEM.

2.6 Primer Design

We sought to investigate the *in vivo* expression of genes involved in the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) system in planarian exposed to sublethal concentration of Nicotine, or Imidacloprid for 24h. The protein sequences of 16 nAChR genes (*acr2* (P48182); *acr3* (Q93149); *acr5* (P54246); *acr6* (Q9N4M3); *acr7* (P45963); *acr8* (Q23355); *acr9* (Q18556); *acr10* (Q21645); *acr11* (P91197); *acr12* (G5EDF1); *acr14* (Q22224); *acr15* (O16926); *acr16* (P48180); *acr18* (G5EG72); *acr23* (G5EG88); *acr25* (Q65XS8)) and acetylcholine esterase (AChE; P38433) from *C.elegans* (Polli et al., 2015), and *Dj-ChAT* (D5MS68), the Choline acetyltransferase from *Dugesia japonica* planaria, were compared to the *S.mediterranea* proteome database using the BlastP program, featured on the Ugene software v 45.0. All data associated with planarian genome were downloaded from *Schmidtea mediterranea* Genome Database (<https://planosphere.stowers.org/smedgd>). SmedSx1 version 4.0, accessed in January 2023. Only Blast hits with an *E-value* < 0.01 were selected. Selected protein sequences were run through Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) to identify conserved domains, and Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>) to predict mainly transmembrane topology from protein sequences. Only proteins which revealed nAChR-related domains and similar topology were selected for primer design. Details on how these genes were identified in *S.mediterranea*, are given in Table S1.

Based on Udvardi (2008) guidelines, specific primers, aimed to amplify exon junctions, were designed using Primer 3 featured on Ugene v.45 software.

2.7 RNA isolation, cDNA synthesis, and real time PCR

After locomotion acquisition, for each concentration, planarians were pooled in random pairs in 1.5mL Eppendorf® tubes and treated with RNAlater™ (Invitrogen™) according to manufacturer's instructions, briefly, planarians were soaked in 100µL RNAlater overnight at 4°C, then RNAlater was removed and samples were stored at - 80°C until extraction.



Planaria tissues were disrupted using TissueLyser II (Quiagen) at 30 beats per minute for two minutes, in TRIzol™ reagent (Invitrogen™, USA). 1/5 TRIzol volume of Chloroform-isoamil alcohol 24:1 (Sigma-Aldrich) was added to the TRIzol lysate. The following extraction steps were carried out using a protocol adapted from (Yaffe et al., 2012). After centrifugation, the upper aqueous phase containing RNA was recovered in a new tube and mixed with 1 volume of 96% ethanol. The mixture was loaded onto Quick Plasmid Mini Columns (Pure Link, Invitrogen™). RNA was washed twice with 3M Sodium acetate (Sigma-Aldrich), then precipitated with 70% ethanol. Finally RNA was eluted in 22µL of 0.1% treated DEPC (Diethyl pyrocarbonate, Sigma-Aldrich) water. RNA was treated with DNA-free™ (Invitrogen™) to remove DNA fragments. To check RNA quantity and quality, 260/280 and 260/230 nm ratios were determined with the Biotek Cytation 1 microplate reader (Agilent Technologies, USA) using Gen5 software (Biotek, v3.10.06).

Real time RT-PCR was performed at least three times for each examined gene, using three replicates for each cDNA. SYBR Green chemistry-based RT-PCR was carried out the QuantStudio5 instrument (Applied Biosystems, Thermofisher) with SsoFast™ EvaGreen® Supermix (1X final) (Biorad). Reverse transcription was carried out with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions on 200 ng total RNA. Details of the procedures and primers sequences are given in [Table S2](#), according to MIQE guidelines. The expression level of selected 12 protein-coding genes were tested by quantitative real-time polymerase reaction (qPCR). *β-actin* and *gapdh* were selected as reference genes for normalizing qPCR results (Stevens et al., 2015). Supplementary table 3 details PCR efficiency.

The geometric mean of the two reference genes (*β-actin* and *gapdh*) was used to calculate fold changes using the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method where the $\Delta\Delta Ct$ for one individual of the control or exposed group is: $((CT_{target,indX} - GeoAvg[CT_{ref1,ref2indX}]) - (AvgCT_{target,controlgroup} - GeoAvg[CT_{Ref1,Ref2,controlgroup}]))$. For each target gene, the mean fold-change in expression of the control or exposed group is the mean fold-changes calculated for each individual of the corresponding control or exposed group (Livak & Schmittgen, 2001).

2.8 Data and statistical analysis

For locomotion tests, tracking of the planaria by the EthoVision software was carried out from the video in a non-live tracking mode, by either static subtraction of the background or using the DanioVision tracking mode -ideal for detecting transparent zebrafish larvae- when planaria did not move during acquisition. Tracking precision was verified manually and corrected if necessary before generating data. EthoVision XT is used to directly collect data. Each well of the well-plate was defined as an arena and planaria were individually tracked. For each individual, distance travelled in millimeters (mm) in total (20 min) were pooled and analysed. Statistical analysis were performed on pooled data, and were carried out as in (Rejo et al., 2023), using Statistica v.15 software. In order to test behavioural hypotheses, a general linear mixed model (GLM) was fitted to the data. When the F statistics and p values from the various GLMs showed statistically significant differences, a Tukey post-hoc test was applied to compare groups of fixed factors. Concentration of chemicals effect was tested as fixed factors and arena and run as random ones.

For chemical concentration and qPCR analysis, normal distribution of data was assessed by the Shapiro-Wilk test, and homogeneity of variance by the Fisher test. As the conditions of normality and homoscedasticity were not met, Mann-Whitney non-parametric test was performed. For qPCR analysis, for each gene, the difference between the expression ratios (CTs) of the two conditions tested was run on the R studio (R. 4.3.1). For all tests, data were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

Table 1: Comparison of theoretical concentrations of both compounds in working solutions and actual concentrations measured by HPLC-UV, for both behavioural protocols.

| Analyzed behaviour | Compound | Target concentration (µM) | Measured concentration ± SEM (µM) |
|--------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Stereotypies | Nicotine | 50 | 91.21 ± 8.29 |
| | | 100 | 133.28 ± 5.75 |
| | | 250 | 237.96 ± 0.24 |
| | | 500 | 810.96 ± 58.56 |
| | Imidacloprid | 0.1 | 0.09 ± 0.008 |
| | | 1 | 0.72 ± 0.062 |
| | | 3 | 1.68 ± 0.08 |
| Locomotion | Nicotine | 5 | 7.79 ± 0.21 |
| | | 10 | 12.44 ± 0.88 |
| | | 25 | 26.57 ± 1.25 |
| | | 50 | 55.56 ± 1.50 |
| | | 250 | 287.3 ± 13.45 |
| | Imidacloprid | 0.01 | 0.01 |



| | |
|-----|--------------|
| 0.1 | 0.07 ± 0.01 |
| 0.5 | 0.3 ± 0.025 |
| 1 | 0.66 ± 0.067 |
| 5 | 1.92 ± 0.109 |

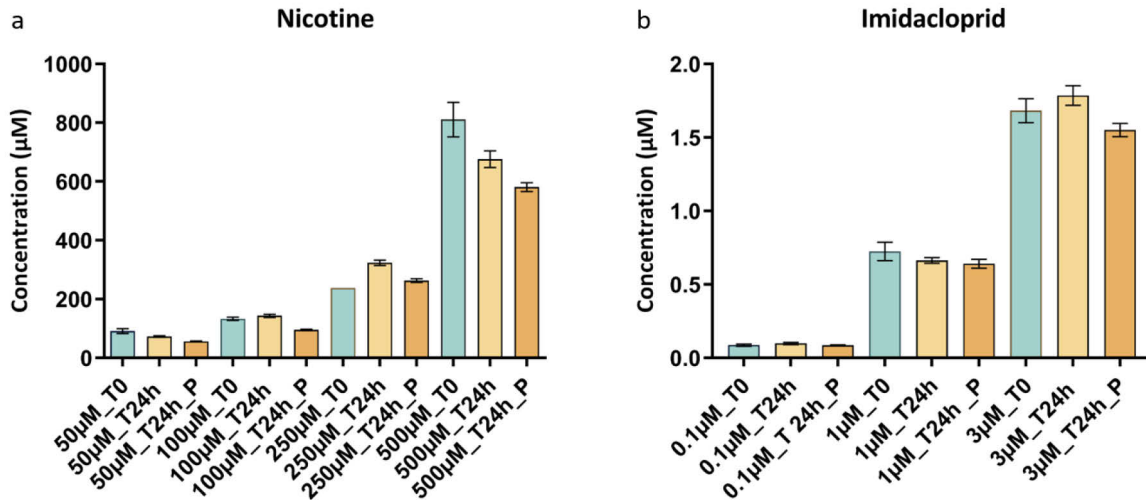


Figure 1: Actual measured concentrations of (a) nicotine and (b) imidacloprid for each target concentration (50; 100; 250; 500µM for nicotine; 0.1; 1 and 3µM for imidacloprid). Concentrations are reported for T0, T24h (in wells without planaria), T24h_P (in wells with planaria), during stereotypy analysis. Data represent mean ± SEM (n=3).

2.1 Chemical analysis

For both behavioural tests, namely stereotypies and locomotion, we measured nicotine and imidacloprid concentrations at T0. Additional measurements of sample concentrations at T24h in wells with and without planaria were carried out for stereotypies. The real concentrations measured in comparison with the target values, for both compounds, are reported in [Table 1](#). For the stereotypy assays, concentrations measured at T24h in wells with planaria for 50µM, 100µM and 500µM nicotine ([Fig. 1a](#)); 1µM and 3µM imidacloprid ([Fig. 1b](#)) appeared to be lower compared to T0 and T24h without planaria, however no significant difference was found ($p>0.1$).

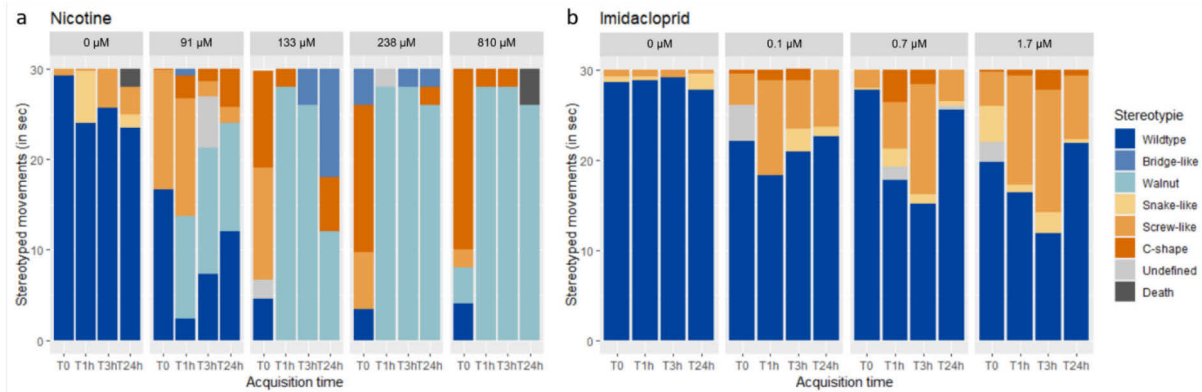


Figure 2: Quantification of stereotypies elicited by planarians exposed to Nicotine (a) or Imidacloprid (b) at T0, T1h, T3h and T24h. Cumulative average duration of stereotypies observed on a 30-second video for each concentration (n=15 per concentration).

2.2 Effect of nicotine and imidacloprid on planarian stereotypies

The stereotypies induced by nicotine appeared dependent on the concentration and duration of exposure and changed over time. Indeed, at T0, hyperkinesia with “screw-like” positions (44.2%, 41.2%, 20.9% and 6.7% for 91.2µM, 133.3µM, 238µM and 810µM respectively), or “C-shape” position (36%, 54.2% and 66.7% for 133.3µM, 238µM and 810µM respectively) were mainly observed. From T1h post exposure, hyperkinesia were replaced by hypokinesia with mainly “walnut-type” positions representing 40% of all observed stereotypies for 91.2µM and 133.µM; 86.7% for 238µM and 810µM exposed planarians with and 40% of “bridge like” positions at 133,3 µM, after 24h. Only planaria at 91.2µM kept showing hyperkinesia with “screw-like” (6.2%) and “C-shape” (13.8%) positions alongside the “walnut” ones at 24h (Figure 2a).

For imidacloprid, planaria exhibited only hyperkinesia positions, mainly “screw-like” ones. For all exposure concentrations, stereotypies increased at T1h (35.1% and 40.4% for

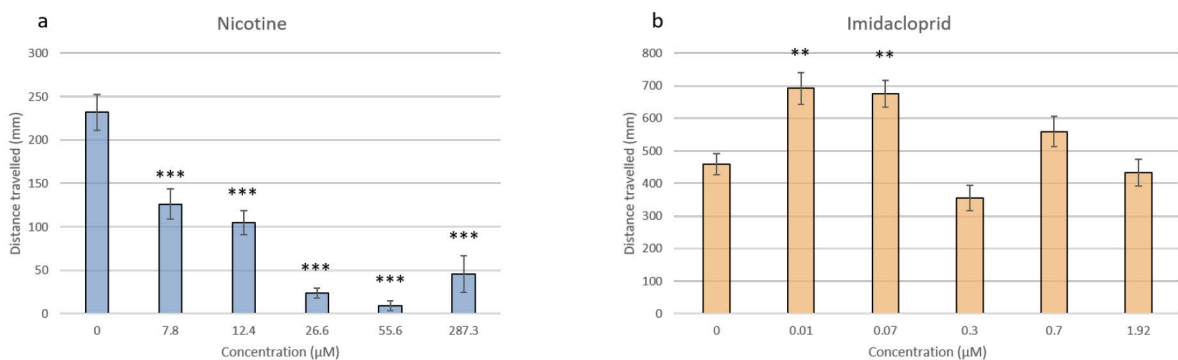


Figure 3: Comparison of the behavioural responses (locomotion) of planarians exposed to Nicotine (a) or Imidacloprid (b) for 24h. Cumulative distance travelled in mm over 20 minutes of recording. Data represent the mean ± SE. **p<0.005; *** p<0.0005 (n=28 per concentration).



0.1 μ M and 1.7 μ M) and T3h (40.9% and 45.6% for 0.7 μ M and 1.7 μ M respectively) compared to T0 (11.8%, 6.7% and 12.7% for 0.1 μ M, 0.7 μ M and 1.7 μ M respectively, before decreasing at 24h (Figure 2b).

2.3 Effect of nicotine and imidacloprid on locomotion

Locomotion is a highly sensitive and robust assessment endpoint, which prompted us to work at lower concentrations, at which stereotypy would not be induced during the 24-hour exposure. Exposure to increasing concentrations of nicotine or imidacloprid for 24h affected planarian locomotor activity, but in opposite ways. The distance travelled by all *S.mediterranea* exposed to nicotine was significantly lower than that of controls, in a concentration-dependent manner ($p < 0.0001$; Figure 3a). For imidacloprid, at the two lowest concentrations, planaria covered significantly more distance than controls ($p < 0.0001$), whereas at the three highest concentrations, planaria behaved just like controls (Figure 3b).

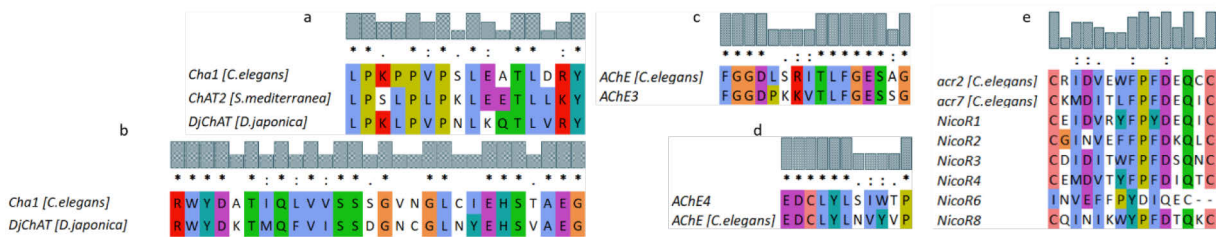


Figure 4: Multiple alignment of consensus amino acid sequences of conserved sites in predicted cholinergic transmission related proteins in *S.mediterranea*. (a) Acetyltransferases ChoActase family signature 1 (PS00439) of Cha1 (*C.elegans*, P32756), ChAT2 of *S.mediterranea* and DjChAT (*D.japonica*, D5MS68); (b) Acetyltransferases ChoActase family signature 2 (PS00440) of Cha1 (*C.elegans*, P32756) and DjChAT (*D.japonica*, D5MS68); (c) Carboxylesterases type-B serine active site (PS00122) of AChE3 and AChE [*C.elegans*] (P38433); (d) Carboxylesterases type-B signature 2 (PS00941) of AChE4 and AChE [*C.elegans*]; (e) Neurotransmitter-gated ion channel conserved site (PS00236) of NicoR1 to Nicor8 compared to acr2 (P48182) and acr7 (P45963) from [*C.elegans*]

2.4 Gene expression analysis

After blastp analysis using the sequences of 16 subunits of nicotinic acetylcholine receptor (nAchR) from *C.elegans* as query sequences, we identified 8 putative homologous nAchR proteins in *S.mediterranea* proteome. We named them NicoR1-NicoR8. Based on sequence identity, they were classified either as non-alpha subunits, namely NicoR1 and NicoR3, or as alpha type ones. The neurotransmitter-gated ion channel domain associated with nAchRs was identified in all sequences (Figure 4d) except for NicoR5 and NicoR7. As such, NicoR5 possesses a signal peptide similar to *C.elegans* acr2, NicoR7 and NicoR8 contains a single transmembrane domain (TM) but lacks the sequence encoding the more the C-terminal TM, whereas the other protein sequences have at least three TM as *C. elegans* nAchR. Thus, NicoR5, NicoR7 and NicoR8 appeared to be truncated protein sequences encoding alpha-type



nicotinic receptor subunits. We have identified a protein which share sequence identity to *Dugesia japonica* (27.4%) and *C.elegans* (24.1%) Choline acetyltransferase, respectively,

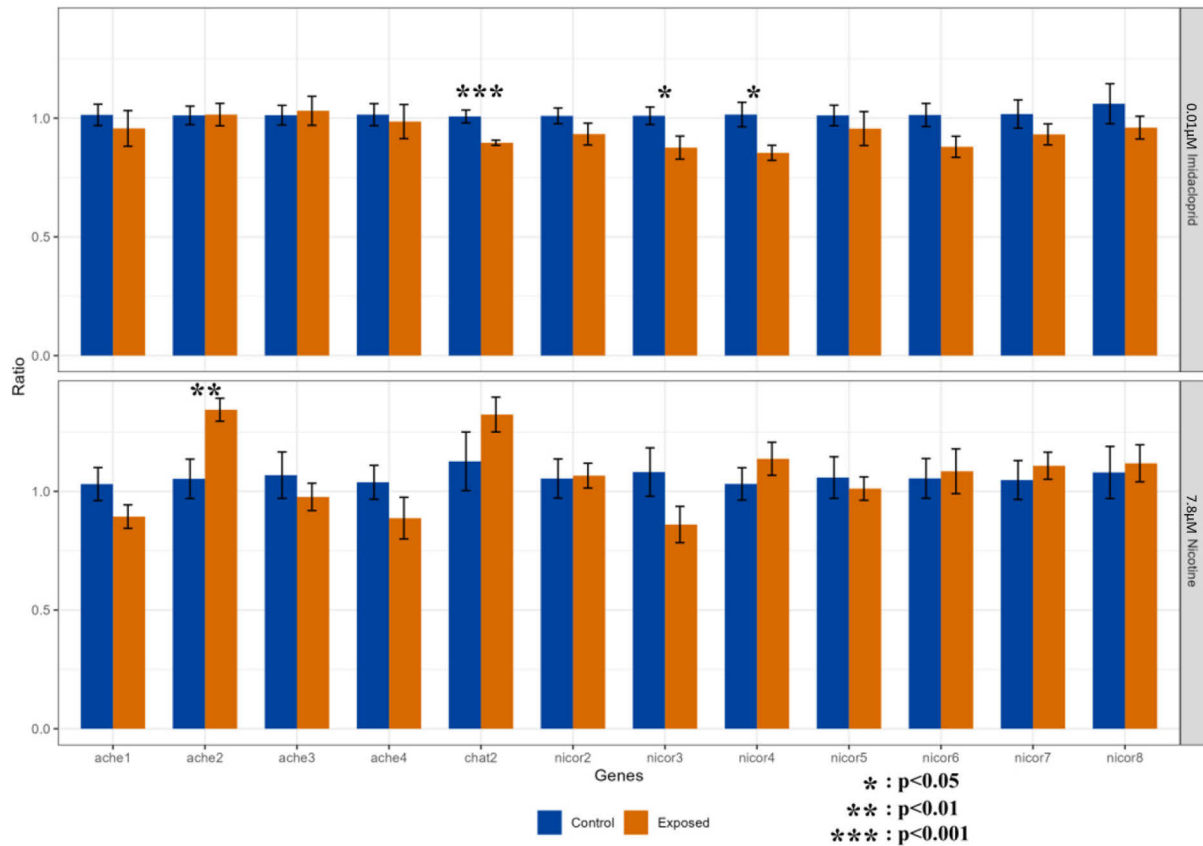


Figure 5: Fold change of the 12 genes tested in *S.mediterranea* after exposure to either 7.8µM Nicotine or 0.01µM Imidacloprid for 24h. All Ct values were normalized using B-actin and GAPDH mRNA then compared to control value of 1. Results are presented as mean for Imidacloprid and Nicotine respectively. *p<0.05, **p<0.01, p<0.001

DjChAT and Cha1, while DjChAT and Cha1 had 34.7% percentage identity. *S.mediterranea* ChAT2 and DjChAT proteins both contains the Acyltransferases ChoActase/COT/CTP signature (Figure 4a). However, ChAT2 was predicted to have a transmembrane domain while DjChAT and Cha1 would be entirely extracellular. We found four putative *S.mediterranea* sequences with high identity to *C.elegans* acetylcholine esterase, among which AChE3 and AChE4, in which the type B carboxylesterases signature 2 (Figure 4b) and the serine active site (Figure 4c), respectively, were conserved.

Exposure to low concentration of the tested substances affected significantly the expression of specific genes encoding putative *ache*, *chat* and nicotinic receptors. Over the 12 genes tested, 3 were slightly down-regulated (*chat2*, *nicor3* and *nicor4*) in planarians exposed to 0.01µM Imidacloprid for 24h. As for those exposed to 7.8µM Nicotine for 24h, *ache2* was slightly up-regulated (Figure 5).

4. Discussion

Planaria has emerged as a valuable model for toxicological and ecotoxicological studies (Wu & Li, 2018). This small aquatic invertebrate, already considered a bioindicator in freshwater environments (Knakiewicz, 2014), displays mammalian-like behaviours when exposed to addictive substances, including motility and stereotypies, both controlled in part by the nicotinic acetylcholine pathway (Buttarelli et al., 2008). We focused on two compounds: nicotine, a powerful psychoactive substance, and imidacloprid, used for pest control in agriculture. Both interfere with the nicotinic acetylcholine pathway and are nAChR agonists in humans and insects respectively, and are aquatic pollutants. For instance, they have been detected at $\mu\text{g/mL}$ levels and found to be toxic to members of the aquatic ecosystem (Morrissey et al., 2015; Oropesa et al., 2017). We therefore aimed to determine and compare the effect of these substances on planaria, a non-target and model animal. We first assessed the effect of acute exposure to nicotine and imidacloprid on two planarian behavioural parameters. We recorded for 30 seconds and quantified the stereotypy of planaria at four different time points over a 24-hour exposure period. At lower concentrations than those used for stereotypy analysis, after 24 hours of exposure, we analysed locomotion by Center of Mass tracking for 20 minutes using Ethovision software. Finally, at the lowest concentration for which planarians showed a significantly different response for locomotion, we analysed the variation in expression of 12 putative nAChRs, AChE and ChAT genes. We observed that acute exposure to 0.09 to 0.8 mM nicotine for 24 h produced biphasic effects on stereotypy: *S.mediterranea* exhibited screw-like and C-shape hyperkinesias at T0, then from T1h to 24h showed walnut hypokinesias. Imidacloprid had little effect on stereotypy: upon exposure to concentrations of 0.1 to 1.7 μM , planaria showed predominantly wild-type behaviour, but screw-like hyperkinesias were observed and appeared to be concentration-dependent. Regarding locomotion, exposure to 0.08 to 0.3 mM nicotine for 24 hours decreased planarian motility in a concentration-dependent manner. Exposure to 0.01 and 0.1 μM imidacloprid for 24h increased motility, while at 0.3 to 1.92 μM , planaria showed normal locomotion. Planaria with reduced locomotion at 7.8 μM nicotine showed a slight up-regulation of *ache2*. And increased motility at 0.01 μM imidacloprid was accompanied by slight down-regulation of *chat2* and two nAChR genes, *nicor3* and *nicor4*.



4.1 Chemical analysis

In toxicological tests, whole planaria are soaked directly in an aqueous solution containing the test substance, as the planaria tegument is permeable to high molecular weight compounds (Deochand et al., 2018). Here, we sought to assess the stability of the molecules tested over the 24-hour exposure period, in Montjuïc water (as a vehicle), in the presence or absence of planaria. The concentrations of chemicals present at T0 and T24h in wells with and without planaria did not differ significantly. This suggests that the planaria were stably exposed to nicotine or imidacloprid for 24 hours. Nevertheless, chemical analysis enabled us to confirm the presence of the tested substances and the actual concentrations to which the planaria were exposed, suggesting that the observed behavioural responses were the consequence of trans-tegmental absorption of chemicals.

4.2 Behavioural endpoints

In planaria, several studies have shown that behavioural analysis represents a reliable model for studying the effect of chemicals acting on the nervous system (reviewed in Buttarelli et al., 2008). Two behavioural endpoints, namely locomotion and stereotypy analysis, have proved particularly useful for pharmacological studies and are constantly being improved and automated to enable better comparison of data between laboratories (Raffa et al., 2001; Rejo et al., 2023; S. Zhang et al., 2019). In the current study, for motility assessment, the pLMV (planarian locomotor velocity) approach of counting the number of gridline crossed by the planarian (Raffa et al., 2001) was rather replaced by center of mass tracking using the Ethovision software. With the exception of an attempt by Ireland (2020) to automate the analysis of planarian morphology using computer imaging, stereotypy has generally been analysed live by a naive observer, at a single timepoint. In our case, however, we recorded 30-second videos of exposed planaria at four timepoints over 24 hours, and performed the analysis later.

Effects of nicotine on planaria behaviour have been extensively studied (Table S4). For instance, planaria exposed to nicotine display mammalian-like behavioural responses. For the two main behavioural endpoints commonly assessed, stereotypy and locomotion, acute nicotine exposure induced an increase in C-shaped hyperkinesias and a decrease in motility, respectively, in a concentration-dependent manner for both (Bach et al., 2016; Best & Morita, 1991; O. R. Pagán et al., 2013; Oné R. Pagán et al., 2009, 2012, 2015; Rawls et al., 2011; Sal et al., 2021; Tallarida et al., 2014).



In the present study, we observed that acute exposure to nicotine for 24h at concentrations ranging from 0.09 to 0.8 mM produced biphasic effects on stereotypy: at T0, *S.mediterranea* elicited screw-like and C-shaped hyperkinesias, then from T1h to 24h, they displayed hypokinesias, mainly walnut positions, with residual bridge-like at 0.1 and 0.2 μ M. The switch to hypokinesia overtime increases in a concentration-dependent manner. As mentioned earlier, the observation of C-shape hyperkinesias is consistent with previous studies. To name but a few, Pagán (2012), Bach (2016) and (Rawls (2011), all reported that acute exposure to nicotine, for 10min for the first two studies and 5 min for the third, induced C-shape, with the activity increasing in a concentration-dependent manner, at concentrations ranging from 1 to 5mM, 0.125 to 1mM and 0.01 to 2 mM nicotine, respectively. But two studies have described nicotine-induced walnut hypokinesias. For instance, Buttarelli (2000) reported that for concentrations ranging from 0.12 to 3.08mM, nicotine induced behaviour in planarians displayed a latency of 10-15 min, then *D.gonocephala* produced hypokinesia with 'walnut' positions that lasted until the end of a 60 min observation period, and were still observed 10 to 15min following wash-out from nicotine solution. Like us, Ramakrishnan & Desaer (2011) have described a biphasic response to nicotine exposure in a concentration-dependant manner, as at 0.0001 to 0.01m, *D.dorotocephala* displayed C- shape and screw-likes, but from 0.05 to 1mM, walnut positions were observed, over 5 min of exposure. Studies that observed only form C shared the same short exposure and observation period of 5 to 15 minutes (Supp. table 4). Whereas, Buttarelli (2000) and Ramakrishnan & Desaer (2011) results suggest that walnut induction depend either on longer exposure and observation time or on concentration, respectively, which is fully in line with our current findings. Variations in species sensitivity may explain the absence of latency in the behavioural response of *S. mediterranea* in our case, and may account for the induction of a C shape only, even at concentrations considered to be high in studies mostly made on *Girardia tigrina* and *D.dorotocephala* species. Difference in species sensitivity to the same chemical have been reported (Ireland et al., 2020; Rejo et al., 2023). Nevertheless, as previous studies have mostly only reported either hypo- or hyperkinesia, the present findings highlights the importance of analysing behaviour over time to detect changes that may be related to duration of exposure.

Planarian locomotion is sustained by gliding which is powered by ventral motile cilia that beat with metachronal synchrony, controlled by serotonergic neurons and autonomous muscle-driven movements that are attenuated with loss of function of either dopaminergic or cholinergic neurons (Ross et al., 2017). We might therefore draw a parallel between the display



of stereotypies by planarians and their motility. For instance, Rawls (2011) noted that concentrations (0.3mM-10mM) that produced a decrease in motility also caused the most pronounced increase in C-shape in *D.dorotocephala*.

In the present study, we have shown that incubation at relatively low concentrations of nicotine ranging from 0.08 to 0.3mM for 24 hours negatively affected planarian motility in a concentration-dependent manner. In agreement with our findings, various studies have demonstrated that acute nicotine administration has been shown to steadily alter the motility of planaria. Thus, Pagán (2009) determined that acute exposure to nicotine (0.1µM-1mM) with an incubation period of 15min decreased *D.dorotocephala* planarians motility in a concentration dependent manner. Similarly, even without an incubation period, (Bach et al., 2016) also observed that *G.tigrina* exposed to 0.01 to 1mM nicotine experienced a concentration-dependent decrease in velocity over a 8 minutes immediate period observation. Sal (2021) had established that the unconditioned response of *S.mediterranea* to acute exposure to nicotine at different concentrations (0.025-0.1mM) was reduced motility or “hypo-locomotion”. Rawls (2011) also showed that exposure to higher concentrations of nicotine (0.3mM-10mM) inhibited motility. Similar trend in behaviour have be reported in *C.elegans* as 1 to 100mM nicotine induced a decrease in locomotion manifested by a decrease in body bends (Kudelska et al., 2017). As suggested by Pagán (2009), we once again show here that stimulation of the nicotinic–cholinergic system reduce planarian motility.

Unlike nicotine, exposure to Imidacloprid, a neonicotinoid derived from nicotine, has little effect on stereotypy elicitation in planarians. Indeed, exposure to 0.1 to 1.7 µM imidacloprid induced screw-like hyperkinesia in *S.mediterranea*, in a manner that appears to be concentration-dependent. However, these stereotypes remained residual, as planarians mostly behaved normally (referred as “wildtype”). To our knowledge, this is the first study involving exposure of planaria to imidacloprid. However, our results suggest that our working concentration might have been too low to induce significant hyperkinesia in planaria. As for locomotion, we observed that exposure to even lower concentrations of imidacloprid (0.01 and 0.1µM) for 24 hours significantly increased the distance covered by planaria, while 0.3 to 1.92µM imidacloprid exposed planarian behaved like controls. In agreement with our findings, McManus (2018) found out that zebrafish (5hpf-120hpf) exposed to 0.04nM to 3.9mM imidacloprid travelled significantly more and had higher average velocity compared to controls. In contrast, in *C.elegans*, 24h exposure to imidacloprid at concentrations ranging from 4 to 39 µM resulted in a significant decrease in the frequency of head movements and body flexion,



two common indicators of locomotion (Xuezhu et al., 2018). It seems that results differ between species. Indeed, in their review, Malhotra et al., (2021) report at least forty studies on the adverse effects of Imidacloprid on non-target aquatic invertebrates and vertebrates, and highlights the difference in sensitivity to the neonicotinoid between species. Binding affinities to nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits are considered an important factor for specific effects on organism behaviour. It has been shown, in the non-target, non-biting aquatic larvae of *Chironomus xanthus*, that imidacloprid acts as a partial agonist binding only to $\alpha 1$ - $\alpha 3$ nAChR subunits, implying that the proportion of nAChR subunits present in target and non-target insects must be taken into account (Melo et al., 2022). For instance, in studying the effect of thiamethoxam, another neonicotinoid, (Barbosa et al., 2022) suggested that the proportion of $\alpha 1$ - $\alpha 3$ appeared to be lower in planarians, compared with other nAChR subunits.

4.3 Gene expression analysis

We sought to investigate if a significant change in locomotor behaviour was associated with variation in the expression of nAChR-related, AChE and ChAT genes at the minimal concentration observed, i.e. 7.8 μM and 0.01 μM for nicotine and imidacloprid, respectively.

In this study, we targeted genes representing the three main actors of cholinergic transmission and signalling, namely Choline acetyltransferase (ChAT), which is essential for acetylcholine biosynthesis; Acetylcholinesterase (AChE) the enzyme that catalyses the breakdown of acetylcholine at the post-synaptic membrane; and genes encoding nAChR subunits in *S.mediterranea*.

We identified at least 7 putative genes encoding nAChR subunits, a rather compact gene family then, similar to what is found in various insect species, compared to their nematode and vertebrate counterparts. For example, *D.melanogaster* and the honey bee (*Apis mellifera*) have 10 and 11 nAChR genes respectively, while humans and the nematode *C. elegans* have 16 and 29 respectively (Jones & Sattelle, 2010). For AChE, we identified two protein sequences in which at least one of the two signature sites present on *C. elegans* AchE was conserved. In vertebrates, a single gene has been shown to encode AChE, which is involved in both neuronal and non-neuronal functions. Whereas two different AChE genes (*ace1*, encoding AChE1, and *ace2*, encoding AChE2) originating either from a single locus for *D.melanogaster* (*ace*) or from two loci (*ace1* and *ace2*, respectively paralog and ortholog to *Drosophila* *ace*) have been identified in various insect species (Kim et al., 2014). Finally, as in the planarian species *D.japonica*, we only seem to have identified a single gene encoding ChAT in *S. mediterranea*



(Nishimura et al., 2010). However, we must not overlook that our results are entirely determined by the genomic assembly to which we had access.

In the current study, planaria exposed to nicotine, which exhibited reduced locomotion, showed a slight up-regulation of *ache2*. As with imidacloprid, the increase in locomotion was accompanied by a slight down-regulation in *chat2* and two nAChR genes, *nicor3* and *nicor4*. We can hypothesize that these two agonists of mammalian and insect nAChRs, respectively, affect planarian behaviour and cholinergic genes expression differently.

Nicotine binds to nAChRs, making them natural candidates for genetic studies about nicotine exposure. For instance, chronic nicotine exposure is known to increase nAChRs in specific brain regions in humans and animal models (Miwa et al., 2011; Polli et al., 2015). However, in the present study, decreased locomotion due to nicotine exposure is rather associated with a slight up-regulation of *ache2*, and appeared to have no effects on nAChRs mRNA levels. The regulation of nAChRs turns out to be complex: the behavioural changes we observed might not be mediated by over- or under-expression of the genes encoding nAChRs, but rather be a result of a direct effect on targeted nicotinic receptors. Furthermore, the regulation of nAChRs could be mediated by post-translational or post-transcriptional mechanisms, which are not addressed here. For instance, Rauthan et al., (2017) showed that in *C.elegans*, the microRNA miR-238 regulates *acr-19* expression and mediates the withdrawal response after nicotine exposure. Therefore, it could also be related to the acute exposure context we had here. Since AChE is a major enzyme involved in cholinergic transmission, its implication in response to nicotine exposure is therefore coherent. Indeed, (Saad et al., 2020) showed that rats treated with nicotine (1mg/kg), had a significant increase in brain AChE levels. Furthermore, consistent with our observations, acute exposure to nicotine (6.16 and 30.8 mM for 3min) has been reported to reduce swimming speed and distance travelled, and increase *ache* mRNA levels in zebrafish (Araujo-Silva et al., 2023).

To our knowledge, this is the first study investigating the effect of imidacloprid on planaria. Interestingly, *nicor3* and *nicor4*, which are slightly down-regulated here, were identified as non-alpha and alpha nAChR subunits respectively, and code for the proteins with the highest percentage identity to *C.elegans* *acr9* and *acr12* (Table S1), respectively. This suggest that modulations of nAChRs in planaria by imidacloprid is not specific to a subtype. McManus (2018) reported that exposure to an environmentally relevant concentration of imidacloprid (0.4nM) increased zebrafish locomotion, but unlike our results, did not affect



expression levels of *chrna7* (nicotinic cholinergic receptor alpha 7). However, in line with our slight down-regulation of *chat2*, in pioneering molecular studies of cholinergic neuron function in planaria, (Nishimura et al., 2010) showed that *Djchat*-knockdown induced a decrease in ACh concentrations and extended the latency time for muscle contraction behaviour in physostigmine exposed planaria. Moreover, it was reported that the toxicity of imidacloprid to the chinese lizard (*Eremias argus*) was manifested by the inhibition of the expression of *ach* in the brain. Toxicological manifestation of imidacloprid and binding affinities to nAChR subunits (nAChRs) differ between species (Stinson et al., 2022). Thus, the mechanisms leading to the behavioural response we observed may be multiple and will require further study to be fully understood.

Here, we were working on the lowest concentration at which planaria showed significantly different behaviour from the control, thus these concentrations might not be sufficient to induce strong changes in gene expression. However, we thought it wiser to focus on low concentrations, since working on too high concentrations would directly analyse specific toxic effects, as well as deleterious side effects on cellular functions, which would translate into changes in the expression of numerous genes. Although, we were specifically focused on the effects of exposure to sublethal concentrations of nicotine and imidacloprid on the expression of genes of the cholinergic axis, a more complete picture might have been drawn with the analysis of the mRNA levels of genes expressed on the dopaminergic axis. In planarian, dopaminergic and acetylcholine pathways both control motility. Indeed, the balance between cholinergic and dopaminergic transmissions, as autonomous muscle movements are attenuated by the loss of function of dopaminergic (Nishimura et al., 2007) or cholinergic neurons (Buttarelli et al., 2008; Nishimura et al., 2010; Ross et al., 2017). In zebrafish, 3.91 μ M and 0.0352nM imidacloprid induced up-regulation of *th1* (*tyrosine hydroxylase*) and a down-regulation of *drd2a* (*dopaminergic receptor*) genes expression, respectively (McManus, 2018). Genes encoding for protein of dopaminergic pathways may then be relevant to test in future research.

It is also important to underline the limitations of the qPCR approach, since it does not allow us to take note of post-transcriptional and post-translational modifications that could affect nAChRs, and which could, for example, be analysed by western-blot.



Chapitre III : Etude de l'effet de l'effet de molécules neuroactives sur le comportement des planaires

Overall, the present study contributes to the effort to establish the planarian as a model for (eco) toxicological studies, by investigating the link between motor behaviour and the level of expression of genes linked to the cholinergic axis.

Acknowledgements:

LR's PhD contract was funded by the Occitanie Region and the Institut National Universitaire J-F Champollion (INUC). MK's Master Internship was funded by INUC. We would like to thank C. Senegas for planarian drawings, and A. Colin for his help in the handling of stereotypies data.

Résultats complémentaires

1. Contexte

Dans le précédent article intitulé “**Effect of acute exposure to two neuroactive compounds, nicotine and imidacloprid, on the behavioural response (locomotion, stereotypies) and expression of nicotinic receptor-encoding genes in planaria *Schmidtea mediterranea***”, nous avons étudié la réponse comportementale des planaires lors d’exposition aiguë à deux agonistes des récepteurs nicotiniques à l’acétylcholine.

Comme mentionné plusieurs fois tout au long de ce manuscrit, le contrôle physiologique de l’activité motrice, notamment des mouvements musculaires, chez la planaire dépend de l’équilibre entre les transmissions cholinergiques et dopaminergiques (Cochet-Escartin et al., 2015; Nishimura et al., 2010; Nishimura et al., 2007). La combinaison d’études neuropharmacologiques et comportementales ont montré que la stimulation des neurones cholinergiques produisait des hypokinésies tandis que la stimulation de la transmission dopaminergique provoquait des hyperkinésies. Ainsi, la physostigmine et la nicotine ont provoqué des hypokinésies de type “*Bridge-like*” et “*Walnut*”, respectivement. Inversement, le blocage des récepteurs muscariniques par l’atropine a provoqué une hyperkinésie de type « *Screw-like* ». Concernant l’axe dopaminergique, la stimulation des récepteurs D1 produit des « *Screw-like* » tandis que la stimulation des récepteurs D2 provoque des « *C-shape* » (Buttarelli et al., 2000; Palladini et al., 1996; Venturini et al., 1989). Cependant, ces études ont été réalisées dans un contexte de criblage bas débit, 1) avec un faible nombre d’individus testés (n=3 dans (Buttarelli et al., 2000), n=10 dans (Palladini et al., 1996)) ; 2) dans une même boîte de pétri de 3.5cm pour chaque concentration ; 3) avec des substances directement solubilisées dans de l’eau du robinet ; 4) avec un observateur naïf qui identifiait les stéréotypies à un instant T. Par ailleurs, la notion d’intensité- ainsi de quantité- dans l’analyse de cet indicateur moteur et postural ne sera introduit par Buttarelli (2000) alors que les premiers travaux sur les stéréotypies datent de 1975 (Carolei et al., 1975).

Afin d’avoir une vision complète concernant l’induction de stéréotypies en fonction de la sous-population neuronale stimulée, nous avons entrepris d’identifier et de quantifier les stéréotypies observées lors de la stimulation des récepteurs muscarinique et nicotinique à acétylcholine, et des récepteurs dopaminergiques.

2. Matériel et méthodes

2.1 *Elevage de planaires*

Les souches asexuées de l'espèce *Schmidtea mediterranea* proviennent de l'Institut Max Planck de chimie biophysique (Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Allemagne) et sont élevées dans notre laboratoire depuis janvier 2021. Les planaires ont été maintenues dans 400mL d'eau reconstituée Montjuïc 1X (1,6 mM NaCl, 1,0 mM CaCl₂, 1,0 mM MgSO₄, 0,1 mM MgCl₂, 0,1 mM KCl, 1,2 mM NaHCO₃ dans de l'eau déionisée, pH~7,5) dans des Tupperware en verre, placés dans un incubateur réfrigéré Aqualytic™ modèle TC 445 S, 445 L, à 20°C, dans l'obscurité. Les vers n'étaient exposés à la lumière que lorsqu'ils étaient nourris ou nettoyés dans une pièce réglée en permanence à 20°C. Les planaires ont été nourries deux fois par semaine avec de la pâte de foie de veau d'origine biologique (Merryman et al., 2018) et des larves de *Chironomus sp.* congelées, puis nettoyées après nourrissage. Les vers ont été affamés pendant au moins 5 jours avant le début des expérimentations. Toutes les expériences ont été menées conformément aux directives en matière de protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

2.2 *Exposition aux substances chimiques*

Les composés ont été testés et préparés conformément aux directives du fabricant. Les informations concernant les formulations utilisées et la préparation des solutions mères sont fournies dans le **tableau 1**. Les solutions de travail ont été préparées à la concentration finale dans de l'eau de Montjuïc 1X autoclavée, et toutes les solutions ont été ajustées à un pH de 7,5. Pour les substances solubilisées dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO), la concentration finale en DMSO ne devait pas dépasser 0.5% (v/v) dans les solutions de travail.

Tous les tests comportementaux ont été effectués en journée (de 9h à 17h) dans une pièce réglée en permanence à 20°C. Des planaires entières (taille approximative entre 5 et 10 mm) qui montraient un déplacement normal ont été sélectionnées au hasard et contrôlées pour détecter toute anomalie. Pour chaque concentration, pour les tests de stéréotypie, 15 planaires (n=5 par réplicat, 3 réplicats) ont été testées dans des plaques 48 puits indépendantes. Les planaires sélectionnées ont été prélevées à l'aide d'une micropipette p1000 munie d'un cône sectionné, la planaire était pipetée avec de l'eau de Montjuïc provenant du Tupperware d'élevage, et placée dans un puits de la plaque avec l'eau. Une fois les plaques remplies (1 ver par puits), toute l'eau des planaires a été retirée et un volume de 200µL de solution de travail (1X) a été ajouté dans

chaque puits. Ce volume permet à la planaire de se déplacer librement à l'intérieur du puits, et empêche sa fuite vers un autre puits.

2.3 Analyse des stéréotypies

Chaque planaire a été observée et enregistrée pour l'analyse des stéréotypies à T0, T1heure, T3h et T24h après l'exposition à l'aide d'un microscope stéréo Leica S8 APO, Greenough équipé d'une caméra. La sortie de la caméra était alimentée par un système PC standard équipé du logiciel LasEZ 3.4, qui enregistrait des vidéos de 30 secondes. Chaque vidéo a ensuite été divisée en une image par seconde, ou 30 images par vidéo à l'aide du logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012). Les images ont été récupérées parfaitement étiquetées (composé, concentration, numéro de plaque, position du puits, temps d'enregistrement (T_post exposition) et numéro d'image dans la vidéo source), ce qui a permis de les analyser et de les classer dans les catégories suivantes : *wildtype*, *walnut*, *bridge-like*, *snake-like*, *c-shape*, *screw-like* (Grebe & Schaeffer, 1991; Hagstrom et al., 2016; Wu et al., 2014), *dead* (mort) ou *undefined* (pour les comportements que nous n'avons pu classer). Pour chaque individu, le temps passé à faire la stéréotypie sur 30 secondes aux 4 points de temps d'enregistrement (T0 - T24h) a été rapporté dans un tableau pour une analyse ultérieure.

2.4 Quantification des substances chimiques dans les solutions d'exposition


Nous avons cherché à déterminer la concentration réelle des produits chimiques auxquels les planaires ont été exposées. Pour chaque concentration testée, un échantillon de 100µL d'eau a été prélevé à T0 et T24h, dans un puits avec et sans planaires. Les échantillons ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Les concentrations des composés ont été vérifiées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou en chromatographie en phase gazeuse couplé à spectromètre de masse. Les informations concernant la préparation des standards d'analyse, l'élution et la détection des substances sont détaillées dans le **tableau 1**. Chaque échantillon a été injecté trois fois, les données (**tableau 2**) représentent la moyenne des résultats des trois injections \pm SEM.

Tableau 1: récapitulatif des méthodes d'analyse et de détections des substances étudiées à partir d'échantillons d'eau d'exposition des planaires. Pour chaque molécule et chaque concentration étudiée, 100µL d'échantillon avait été conservé à -20°C. Les molécules étant solubles soit dans l'eau soit dans le DMSO, leur détection a été réalisée par HPLC-UV ou par LC-MS pour l'acétylcholine. La détection des échantillons sous UV se faisait entre 200 et 380nm. TR signifie temps de rétention. L'H2O UP désigne l'eau ultrapure.

| Molécule | Formulation | Matériel d'analyse | Technique de séparation | Technique de détection | Standards d'analyse | Elution | Détection | Solvant de préparation de la solution mère |
|----------------------|--|--|-------------------------|------------------------|---|--|--|--|
| Acétylcholine | acétylcholine chlorure (TCI) | LC-MS Thermo Scientific modèle Vanquish avec spectromètre LTQ XL- colonne Phenomenex Luna C18 150 x 2 mm, 5µM, 10A | LC | MS | | Volume injecté : n µL Solvant A : H2O à 0,1 % TFA, Solvant B : Acétonitrile à 0,1 % TFA, débit 1,25mL/min, Gradient (% B) : 0 min : 0% 3 min : 20% 4 min : 20% 5 min : 0 % 10min : 0% Durée du run : 10 min | Entre 50 et 250m/z Ion m/z=146 TR:1,28min | H2O UP |
| Tubocurarine | tubocurarine chlorure pentahydrate (TCI) | HPLC Thermo Scientific modèle Vanquish avec détecteur UV/Vis à barrette de diodes Colonne Phenomenex Kinnetex 5µM C18 100Å | HPLC | UV | Solutions aqueuses à 0,1 % TFA à 100 µM, 500 µM et 1000 µM | Volume injecté : 5µL Solvant A : H2O à 0,1 % TFA, Solvant B : Acétonitrile à 0,1 % TFA, débit 1,25mL/min, Gradient (% B) : 0 min : 5% pendant 1 min 8 min : 100% pendant 3 min 12 min : 5 % pendant 3 min Durée du run : 15 min | Quantification à 280 nm, TR: 6,04 min | H2O UP |
| Pilocarpine | pilocarpine hydrochlorure (TCI) | – | HPLC | UV | Solution [Potassium Phosphate 7mM pH 4,0/Acétonitrile/Méthanol (55/15/30 v/v/v)], à 1 µM, | Volume injecté : 10µL Phase mobile : [Potassium Phosphate 7mM pH 4,0/Acétonitrile/Méthanol (55/15/30 v/v/v)], isocratique débit 1,25 mL/min Durée du run : 6 min | Quantification à 214 nm, TR: 2,19 min. | DMSO |

5 μ M, 10 μ M et
50 μ M

| | | | | | | | | |
|----------------------|--|---|------|----|---|--|--|---------------------|
| Atropine | atropine sulfate salt monohydrate (Sigma A0267-5G) | – | HPLC | UV | Solutions aqueuses à 0,1 % TFA à 345 μ M, 500 μ M, 1730 μ M et 3460 μ M | Volume injecté : 5 μ L Solvant A : H ₂ O à 0,1 % TFA, Solvant B : Acétonitrile à 0,1 % TFA, débit 1,25mL/min, Gradient (% B) : 0 min : 5% pendant 2 min 6 min : 50% 8 min : 100 % pendant 2 min 12 min : 5 % pendant 3 min Durée du run : 15 min | Quantification à 230 nm, TR: 7,25 minutes. | H ₂ O UP |
| Physostigmine | physostigmine salicylate (European Pharmacopoeia) | – | HPLC | UV | Solution [Potassium Phosphate 7mM pH 4,0/Acétonitrile/Méthanol (55/15/30 v/v/v)], à 1 μ M, 10 μ M, 25 μ M et 50 μ M | Volume injecté : 10 μ L Phase mobile : [Potassium Phosphate 7mM pH 4,0/Acétonitrile/Méthanol (55/15/30 v/v/v)], isocratique débit 1,25 mL/min Durée du run : 6 min | Quantification à 245 nm, TR: 2,22 min | DMSO |
| Dopamine | 3-hydroxytyramine HCl dopamine (Cluzeau Info Labo) | – | HPLC | UV | Solutions aqueuses à 0,1 % TFA à 10 μ M, 100 μ M et 500 μ M | Volume injecté : 10 μ L Solvant A : H ₂ O à 0,1 % TFA, Solvant B : Acétonitrile à 0,1 % TFA, débit 1,25mL/min, Gradient (% B) : 0 min : 5% pendant 1 min 4,75 min : 50% 6 min : 100 % pendant 2 min 9 min : 5 % pendant 3 min Durée du run : 12 min | Quantification à 280 nm, TR: 3,45 min | H ₂ O UP |

 Résultats complémentaires

| | | | | | | | | |
|--------------------------|--|--|------|----|--|--|---|--------|
| Apomor- phine | R(-)-Apomorphine hydrochloride hemihydrate (Sigma; LGC Labor GmbH) | – | HPLC | UV | Solutions aqueuses à 0,1 % TFA à 10 µM, 20 µM, 30 µM et 40 µM | Volume injecté : 5µL Solvant A : H2O à 0,1 % TFA, Solvant B : Acétonitrile à 0,1 % TFA, débit 1,25mL/min, Gradient (% B) : 0 min : 20% 4,5 min : 50% 6 min : 100 % pendant 1 min 8 min : 20 % pendant 2 min Durée du run : 10min | Quantification à 272 nm, TR: 4,99 min | H2O UP |
| Halopé- ridol | haloperidol (LGC Labor GmbH) | HPLC Thermo Scientific modèle Spectra System avec détecteur UV/Vis à barrette de diodes UV8000 Colonne Phenomenex Kinnetex 5µM C18 100Å | HPLC | UV | Solutions à 1 µM, 10 µM et 100 µM dans phase mobile (Phosphate de potassium 7mM pH 4,0/Acétonitrile, 70/30, v/v) | Volume injecté : 20µL Phase mobile : Phosphate de potassium 7mM pH 4,0 / Acétonitrile (70/30, v/v) Isocratique, débit 1,25 mL/min Durée du run : 10 min | Quantification à 246 nm, TR: 5,89 minutes | DMSO |

3. Résultats

3.1 Analyse de la stabilité des composés étudiés sur 24h

Nous avons mesuré les concentrations des molécules étudiées à T0, puis à T24h, dans des puits avec et sans planaire. Les concentrations réelles mesurées en comparaison avec les concentrations ciblées, pour les composés étudiés, sont rapportées dans le **tableau 2**.

Tableau 2: Comparaison des concentrations théoriques des composés dans les solutions de travail et des concentrations réelles mesurées par HPLC-UV et LC-MS (pour l'acétylcholine). . Les composés n'ayant pas pu être détectés sont marqués ND

| Sous-type neuronal | Composé | Action | Concentration cible (μM) | Concentration réelle \pm SEM (μM) |
|--------------------|---------------|-------------------------------|---------------------------------------|--|
| Cholinergique | Acétylcholine | Neurotransmetteur | 3000 | 3331 \pm 53.4 |
| | | | 5000 | 5862 \pm 155.9 |
| | | | 10 000 | 17 080 \pm 57.35 |
| | Physostigmine | Inhibiteur de l'AChE | 10 | ND |
| | | | 25 | ND |
| | | | 50 | ND |
| | Tubocurarine | Antagoniste (R. nicotiniques) | 100 | 139.3 \pm 0.77 |
| | | | 500 | 694.9 \pm 8.46 |
| | | | 1000 | 1765 \pm 29.69 |
| | Pilocarpine | Agoniste (R. muscarinique) | 1 | ND |
| | | | 10 | ND |
| | | | 50 | ND |
| | Atropine | Antagoniste (R. muscarinique) | 500 | 418.5 \pm 9.12 |
| | | | 1000 | 772.6 \pm 3.77 |
| | | | 3500 | 3471 \pm 160.2 |
| Dopaminergique | Dopamine | Neurotransmetteur | 10 | 1.76 \pm 0.04 |
| | | | 100 | 36.8 \pm 0.14 |
| | | | 500 | 449.7 \pm 32.31 |
| | Apomorphine | Agoniste | 5 | 2.8 \pm 0.06 |
| | | | 10 | 6.8 \pm 1.7 |
| | | | 20 | 10.5 \pm 0.06 |
| | Halopéridol | Antagoniste | 1 | ND |
| | | | 10 | ND |
| | | | 100 | ND |

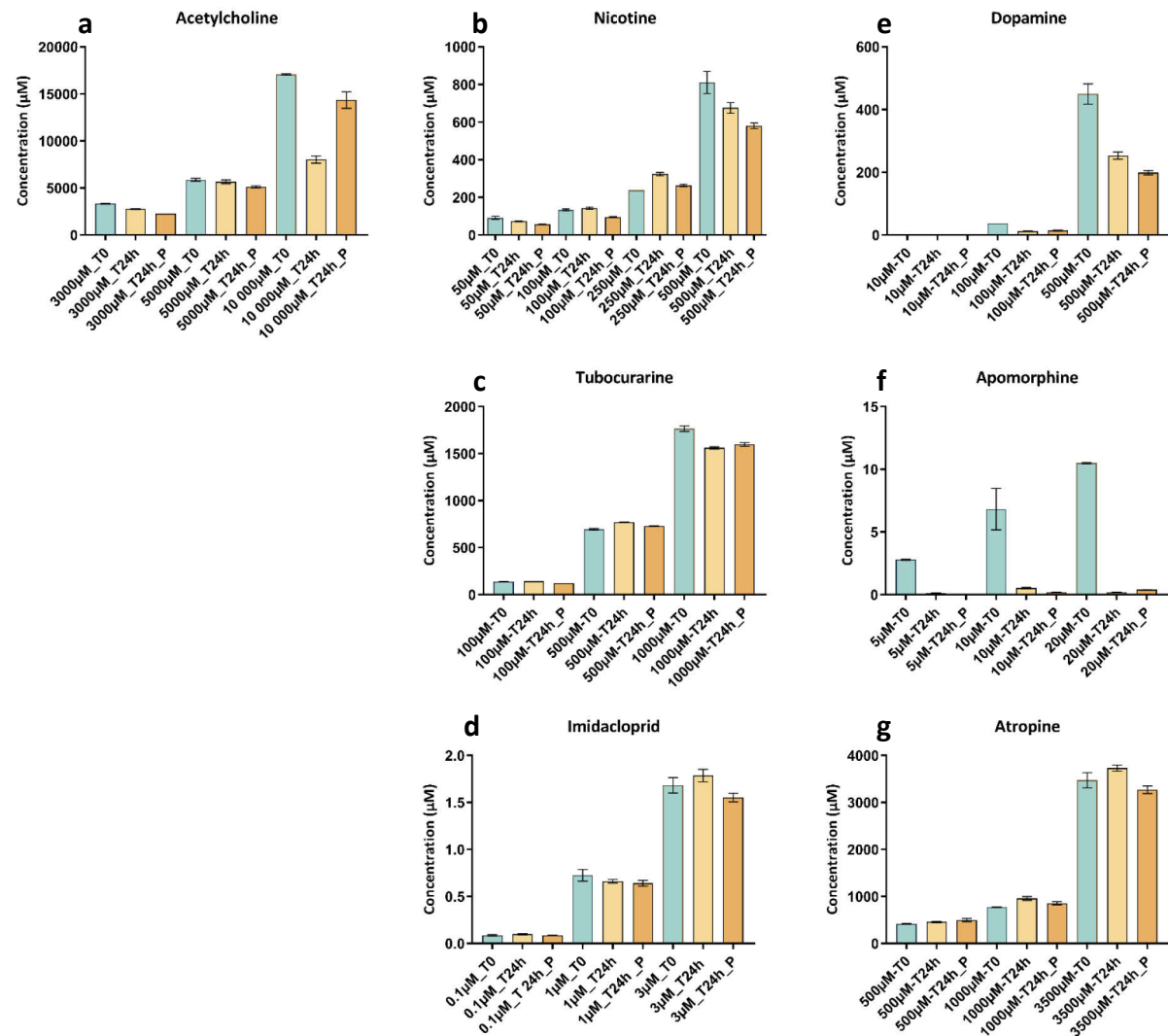


Figure 1: Concentrations réelles mesurées de (a) acétylcholine, (b) nicotine, (c) tubocurarine, (d) imidaclopride, (e) dopamine, (f) apomorphine, (g) atropine pour chaque concentration cible (axe des x). . Les figures (b) nicotine et (d) imidacloprid proviennent de l'article précédent et ont été intégré pour permettre une vision d'ensemble. Les concentrations sont rapportées pour T0, T24h (dans les puits sans planaires), T24h_P (dans les puits avec planaires), au cours de l'analyse des stéréotypies. Les données représentent la moyenne ± SEM (n=3)

Nous n'avons pas été en mesure de quantifier trois substances sur les huit indiquées dans le [tableau 2](#). En milieu aqueux, la pilocarpine se dégrade très rapidement en acide pilocarpique, isopilocarpine, et acide isopilocarpique, passant de 100% à environ 10% de pilocarpine en 50 minutes, avec 80% d'acide pilocarpique formés (Bundgaard & Hansen, 1982). Les altérations comportementales observées chez la planaire pourraient alors être attribués aux métabolites de la pilocarpine qu'à la molécule elle-même. La physostigmine subit également une hydrolyse totale sous quelques heures en milieu aqueux, voire en 2h lorsqu'elle est dissoute dans de l'eau bouillante (Rubnov et al., 1999). Quant à l'halopéridol, l'injecteur de la chaîne HPLC a rencontré une panne non détectable par le système lors de l'exécution de la séquence. Le capillaire de l'aiguille d'injection s'est rompu en entrée de vanne rhéodyne, les échantillons ont donc été perdus.

La dopamine subit une auto-oxydation, dont la vitesse serait dépendante du pH, en milieu aqueux. Ainsi, un pH acide limite cette réaction tandis qu'un pH neutre puis basique l'accélère. Or ici, le Montjuich, l'eau d'élevage des planaires, est généralement à pH7.5. Ce qui pourrait expliquer cette dégradation de la dopamine observée à T24h dans les puits avec et sans planaire, essentiellement aux deux plus faibles concentrations supposées ([Fig.1e](#)).

Les quantités d'acétylcholine ([Fig.1a](#)), de nicotine ([Fig.1b](#)), de tubocurarine ([Fig.1c](#)), d'imidacloprid ([Fig.1d](#)), et d'atropine ([Fig.1g](#)) semblent stables sur les 24h d'expérimentation.

A T0, l'apomorphine est détectée aux quantités indiquées dans le [tableau 2](#), cependant à 24h, dans les puits avec et sans planaires, on observe une diminution de 97% des quantités d'apomorphine par rapport à T0 ([Fig.1f](#)). Il est important de souligner que la quantification des substances chimiques auxquels les planaires sont exposées au début et à la fin de l'exposition, ne nous permet de conclure ni sur la métabolisation des substances par la planaire ni sur leur dégradation dans le cas de l'apomorphine. Néanmoins, l'analyse chimique permet de confirmer la présence des substances testées et les concentrations réelles auxquelles les planaires ont été exposées, ce qui suggère que les réponses comportementales observées sont la conséquence de l'absorption des produits chimiques.

3.2 Effet des substances neuroactives sur la réponse comportementale des planaires

3.2.1 Durée moyenne des stéréotypies

Le [tableau 3](#) donne une vue d'ensemble de la durée moyenne de chacune des stéréotypies observées sur 30 secondes pour chaque composé testé. Les catégories *wildtype*,

undefined et *death* ont été omises n'étant pas des stéréotypies. Les temps moyens des contrôles (en eau Montjuich ou eau Montjuich 0.5% DMSO) n'ont pas été pris en compte car ils comportaient moins de 15% de stéréotypies. Enfin, la dopamine et la pilocarpine ayant les temps moyens de stéréotypies compris entre 0 et 4,99 secondes, ont été omises car considérées comme n'ayant pas d'effet sur le comportement des planaires.

L'hyperkinésie *screw-like* semble être la stéréotypie la plus récurrente, avec une durée moyenne de plus de 5 secondes pour chacune des molécules. À l'inverse, les hypokinésies telles que le *walnut* ou le *bridge-like* n'ont été observées de manière consistante que pour la nicotine. La durée moyenne d'une stéréotypie est de 5 à 10 secondes, indépendamment de la molécule testée. Cependant, une latence de plus de 10 secondes est souvent observée lorsque l'exposition est supérieure ou égale à 3h. La nicotine fait exception puisque certaines des stéréotypies qu'elle a induites ont duré plus de 10 secondes dès le début d'exposition (T0).

Tableau 3: Temps moyen de stéréotypie (en secondes) par molécule en fonction des trois niveaux de concentration d'exposition (Low, Medium et High) et du temps d'acquisition. . Vert : de 0 à 4,99 sec ; jaune : de 5 à 10 sec ; orange : de 10,01 à 20 sec ; rouge : de 20,01 à 30 sec

| Stéréotypie | SCREW-LIKE | | | | | | | | | | | | C-SHAPE | | | | | | | | | | | | SNAKE-LIKE | | | | | | | | | | | | WALNUT | | | | | | | | | | | | BRIDGE-LIKE | | | | | | | | | | | |
|------------------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | Low | | | | Medium | | | | High | | | | Low | | | | Medium | | | | High | | | | Low | | | | Medium | | | | High | | | | Low | | | | Medium | | | | High | | | | | | | | | | | | | | | |
| Concentration | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | T0 | T1h | T3h | T24h | | | | | | | | | | | | |
| Acquisition Time | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nicotine | Orange | Orange | Green | Green | Orange | Green | Green | Green | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Orange | Green | Green | Green | Yellow | Orange | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | | | | | | | | |
| Imidacloprid | Orange | Orange | Yellow | Yellow | Orange | Green | Green | Green | Orange | Orange | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | | | | | | | | |
| Tubocurarine | Yellow | Yellow | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Orange | Orange | Orange | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | | | | | | | | |
| Atropine | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Orange | Orange | Orange | Green | Green | Green | Green | Green | Orange | Orange | Green | Green | Yellow | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | | | | | | | | |
| Physostigmine | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Orange | Yellow | Yellow | Red | Yellow | Orange | Red | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | | | | | | | | |
| Acétylcholine | Green | Green | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | | | | | | | | |
| Apomorphine | Green | Green | Green | Green | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | | | | | | | | |
| Halopéridol | Green | Green | Green | Green | Yellow | Green | Red | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Orange | Orange | Red | Green | Yellow | Yellow | Orange | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | | | | | | | | | | | | |

3.2.2 Stimulation des récepteurs cholinergiques

L'apport exogène d'acétylcholine (3 à 17mM) a induit, chez les *S.mediterranea*, des hyperkinésies (Fig.2a), essentiellement des *screw-like* (représentant en moyenne 16.6% des comportements observés pour 3331µM et 20% pour 5892µM et 17 080µM). Cependant, les planaires ont en majorité eu un comportement normal ou sauvage (*wildtype*) sur 24h, représentant en moyenne 70%, 72.7% et 57% des comportements observés pour 3331µM, 5892µM et 17 080µM respectivement.

La tubocurarine, un antagoniste des récepteurs nicotiques, a induit des hyperkinésies d'une manière qui serait dépendante du temps et de la concentration (Fig.2c). En effet pour 695µM et 1765µM, les stéréotypies sont fortement induites à partir de T1h. Les trois catégories d'hyperkinésie ont été observées et représentent en moyenne 27.6%, 30.6% et 49.7% des stéréotypies observées à 139µM, 695µM et 1765µM, respectivement. Le *screw-like* est cependant majoritaire et constitue en moyenne 19.6%, 20.8% et 34% des comportements observés à 139µM, 695µM et 1765µM.

Concernant la stimulation des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, les effets de la pilocarpine, un agoniste et de l'atropine, un antagoniste de ces récepteurs sur le comportement des planaires ont été évalués. L'exposition supposée à la pilocarpine et à ses produits de dégradation (Tableau 1) a induit des stéréotypies résiduelles chez les individus exposés, représentant en moyenne 19.3%, 20.2% et 15.7% des comportements observés pour – supposément- 1µM, 10µM et 50µM. A 1µM, on observe majoritairement des *screw-like* (11.4%) et à 10µM, les *walnut* constituent 8.8% des comportements observés (Fig.2e). Comme mentionné précédemment, la pilocarpine se dégrade rapidement en milieu aqueux, cette propriété pourrait alors expliquer le maintien d'un comportement sauvage par les planaires exposées (représentant en moyenne 80.6%, 79.7% et 84% des comportements observés). L'atropine a induit des hyperkinésies de façon concentration-dépendante (Fig.2f). Des *screw-like* et *snake-like* sont majoritairement observés sur les trois concentrations d'exposition, et représentent 10.8%, 17.8% et 25.4% pour les *screw-like* ; 5.5%, 14.0% et 25% pour les *snake-like* à 419µM, 773µM et 3471µM, respectivement. Des *c-shape* résiduels ont été observés à 773µM (en moyenne 2.5% des comportements observés), mais constituent 13.3 et 57.6% des comportements observés pour 3471µM, à T3h et T24h, respectivement.

La physostigmine, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE), et a essentiellement induit des *c-shape* d'une manière qui serait dépendante du temps et de la concentration (Fig.2g).

En effet pour ce qui devrait supposément être 10 μ M, les *c-shape* représentent 5.3%, 12.6% puis 60% des comportements observés à T1h, T3h et T24h, respectivement. A 25 μ M, elles constituent 29%, 40% puis 70% et à 50 μ M, 33.3%, 40% et 86% des comportements observés à T1h, T3h et T24h, respectivement.

3.2.3 Stimulation des récepteurs dopaminergiques

L'apport exogène de dopamine n'a pas eu d'effet sur le comportement des planaires, et plus 98% des comportements observés sur 24h étaient de type sauvage (non montré). L'apomorphine a induit des hyperkinésies telles que des *screw-like* et *snake-like* représentant en moyenne 11.2% à 7 μ M et 15.8% à 11 μ M, respectivement. Cependant, lors de l'exposition des planaires à cet agoniste des récepteurs dopaminergiques, des comportements que nous n'avons pu classer dans les catégories que nous avons établies ont été fortement observés, et constituent jusqu'à 34% et 60% des comportements observés à T3h à 7 μ M et 11 μ M, respectivement. Enfin, à 11 μ M à T24h, 53.3% des planaires étaient mortes (Fig.2h).

L'halopéridol, antagoniste des récepteurs dopaminergiques a induit des hyperkinésies apparaissant dépendante du temps et de la concentration (Fig.2i). Ainsi, les stéréotypies semblent fortement apparaître à T1h, diminuer à T3h et augmenter à T24h. A 1 μ M, on observe en majorité des *snake-like* (en moyenne 20.9% et 46.7% à T1h et T24h). A 10 μ M, les *screw-like* (en moyenne 20.2% et 74% à T1h et T24h) et *c-shape* (22.4% et 26.7% à T1h et T3h, respectivement). Enfin, à 100 μ M, on observe en majorité des *c-shape* constituant 64%, 46.7% et 68.9% à T1h, T3h et T24h, respectivement.

Les résultats obtenus dans cette partie seront discutés dans la discussion générale.

Discussion générale

Cette thèse visait à développer la planaire- un invertébré, ver plat d'eau douce -comme modèle simplifié d'études *in vivo* du système nerveux en toxicologie et écotoxicologie. Le travail avait alors été détaillé en trois principaux objectifs, énoncés à la fin du chapitre 1.

1. La pertinence des tests comportementaux comme indicateurs toxicologiques

Les tests développés au cours de cette thèse reposent essentiellement sur l'étude du comportement des planaires. Les tests de réponse photomotrice (PMR), d'exploration (simplement désigné par test de locomotion dans l'article 3) reposent sur l'analyse de la distance parcourue par les planaires sur quatre intervalles de 5 min pour l'un et sur 20 minutes pour l'autre, respectivement (Mathiron et al., 2023; Rejo et al., 2023).

Notre intérêt pour l'analyse du comportement locomoteur comme principal indicateur toxicologique a été motivé d'une part par le fait que les planaires répondent à divers stimuli, notamment aux gradients chimiques, aux vibrations, et à la lumière. Ainsi, ces mécanismes de réception sont intégrés par le système nerveux du ver dans un ensemble complexe de comportements et représentent une base fertile de processus cognitifs qui peuvent être modulés par l'exposition à des substances chimiques (Deochand et al., 2018; Nicolas et al., 2008).

D'autre part, réalisés dans un contexte *in vivo*, les essais comportementaux prennent ainsi en compte les manifestations phénotypiques de perturbations du Système Nerveux Central (SNC) à l'échelle d'un individu entier. Le comportement locomoteur est donc un indicateur toxique et neurotoxique pertinent. Étant donné que tous les composés neuroactifs et neurotoxiques altèrent les fonctions du SN et donc la manifestation de phénotypes comportementaux, ils ne peuvent être criblés et leurs effets quantifiés que via leurs impacts à l'échelle d'un phénotypage comportemental. Les approches de criblage moléculaire *in vitro* excluent la pertinence physiologique et sont incapables de récapituler les fonctionnalités qui se manifestent par des altérations comportementales complexes et des fonctions cognitives supérieures (Bownik & Wlodkowic, 2021).

2. Harmonisation et standardisation d'essais comportementaux chez la planaire

2.1 Le choix de l'usage d'un équipement commercial : le logiciel de tracking EthoVision XT et le système DanioVision

Le point commun aux trois articles présentés dans ce manuscrit de thèse est l'usage du logiciel de *tracking* EthoVision XT (Noldus, Pays-Bas) pour suivre le déplacement des planaires. Le principal indicateur comportemental évalué est la distance parcourue sur un temps défini pour le suivi de la locomotion, le PMR et le tapping ; et le temps passé dans une zone délimitée sur un temps défini pour le PLDT. Toutefois, deux plateformes d'analyse du comportement coexistent ici : la première est une plateforme fabriquée sur mesure déjà existante au sein du laboratoire (Martinez et al., 2020), qui dans sa configuration permet de répartir librement jusqu'à 20 boîtes de Pétri de 10cm de diamètre sur une surface en plexiglas de 80 x 80 x 15cm, dont les lumières infrarouge et visible sont émises par en-dessous. Cette plateforme a été utilisée pour l'étude de l'effet de la gentamicine sur la réponse photomotrice des *S.mediterranea* dans Mathiron et al., (2023). Elle nous a également permis d'évaluer l'effet du maintien ou non de quatre espèces de planaires en présence ou non d'un cycle de photopériode sur leur locomotion et leur réponse photomotrice dans Rejo et al., (2023). Bien que fonctionnelle, cette plateforme ne permettait pas l'automatisation des tests réalisés et contraignait à l'intervention récurrente d'un manipulateur pour remplir chaque boîte de pétri, puis placer une planaire par boîte et vider ces contenants après chaque essai (*run*) de 20 individus. De plus, le logiciel EthoVision permettait l'enregistrement et le *tracking* des planaires, cependant, pour le test de PMR, l'induction des phases de lumière et d'obscurité était réalisée manuellement par l'expérimentateur via une télécommande ce qui peut induire un biais. Enfin, la disposition libre des boîtes de Pétri dont la surface devait être définie comme étant « l'arène » de déplacement de la planaire -nécessaire au logiciel pour un *tracking* efficace et pour l'appréciation des distances parcourues par les individus testés- obligeait un repositionnement systématique de l'emplacement de ces arènes sur EthoVision XT. Les tests de comportement étaient réalisés de manière rigoureuse mais l'ensemble des manipulations étaient chronophages. De plus, le volume de solution testée de 20mL par individu impliquait, en fonction des concentrations choisies, l'utilisation de grande quantité de substances chimiques précieuses, de par les faibles quantités auxquelles nous avons accès ou de par leur caractère onéreux. Nous ne sommes pas les premiers à avoir développé et utilisé des

plateformes sur mesure destinées exclusivement à l'analyse du comportement des planaires via des systèmes automatisés (Shomrat & Levin, 2013) et semi-automatisés (Hagstrom et al., 2015). Ces systèmes ont permis d'évaluer la familiarisation des planaires à leur environnement en testant, en simultanée jusqu'à 12 planaires en régénération ou non; et d'étudier différents indicateurs de toxicité en analysant leur comportement (incluant même des modules d'essais sur la phototaxie et la thermotaxie), respectivement. La planaire émerge comme un modèle d'étude pertinent en (éco) toxicologie mais le manque d'harmonisation dans les procédures est un argument récurrent retrouvé dans la littérature. Ceci entraîne également une difficulté supplémentaire pour comparer les observations d'une étude à l'autre. C'est dans cette optique d'harmonisation, que nous avons décidé de réaliser et calibrer les tests comportementaux sur les planaires avec la chambre d'observation DanioVision, en plus du logiciel EthoVision XT. La DanioVision est destinée initialement à l'analyse du comportement des larves de poissons zèbres, mais selon nos expérimentations convient à l'étude d'autres espèces aquatiques (Vignet et al., 2013), dont les planaires font partie, notamment grâce à leur petite taille. La DanioVision dispose de modules d'actionnement de stimuli vibratoires (*tapping*) et lumineux, entièrement contrôlés et programmables sur le logiciel EthoVision XT, ce qui permet l'usage de plaques multipuits, compatibles d'une part avec le criblage haut débit de substances potentiellement toxiques sur la planaire, et d'autre part avec la réduction de quantité de produit utilisé en travaillant sur de faibles volumes (400µL par puits pour les plaques de 24 puits). Une plateforme commerciale pour l'analyse des comportements des planaires (<https://inveritek.com/>) découlant des travaux d'Ireland & Collins, (2022) existe, il est aujourd'hui possible de sous-traiter cette analyse toxicologique sur les planaires. D'autres plateformes commerciales d'analyse comportementale développées entre autre pour des modèles animaux reconnus tels que les daphnies et le poisson zèbre (Martins et al., 2007) sont également disponibles tels que Viewpoints ZebraBox / Toxmate Lab (ViewPoint Inc), Zantiks MWP (Zantiks Inc) (Henry & Wlodkovic, 2020) et pourraient être utilisés à la place du système que nous avons choisi d'utiliser. L'implémentation de ces systèmes commerciaux à la base conçus pour des modèles reconnus et répandus tels que les larves de poissons zèbres, permettrait à de nombreux laboratoires d'adopter la planaire, un invertébré, comme modèle d'étude toxicologiques dans un contexte standardisé, d'établir la reproductibilité et la fiabilité des tests réalisés et des observations, d'élargir le répertoire des réponses comportementales disponibles chez les planaires, et d'asseoir, le développement de tests tels que le PMR, le *tapping*, le PLDT que nous avons souhaité développer dans l'article 2. L'usage du même équipement pour les larves de poisson zèbre et les planaires est d'une grande pertinence pour comparer les réponses des deux

espèces à l'exposition aux mêmes substances chimiques. Comme l'analyse comparative des systèmes poisson zèbre et planaire pour le criblage de la neurotoxicité développementale avec une librairie de 87 composés, alors effectuée sur deux plateformes différentes adaptée à chaque espèce modèle. Hagstrom et al., (2019) avaient alors conclu que les profils toxicologiques des deux modèles étaient complémentaires, le poisson zèbre fournissant des paramètres morphologiques plus détaillés et les planaires des paramètres essentiellement comportementaux.

En somme, l'usage du système DanioVision nous permet d'automatiser, de standardiser nos essais comportementaux en accord avec les objectifs définis de la thèse.

2.2 Essais comportementaux basés sur la locomotion

Nous avons étudié deux tests impliquant l'application de stimuli soit vibratoire pour le tapping, soit lumineux pour le PMR. Dans l'article 1, (Mathiron et al., 2023), nous avons montré que les planaires asexuées *S.mediterranea* semblaient répondre à la photostimulation, lors du test PMR, puisque un profil ondulatoire caractéristique a été observé chez les planaires contrôles qui lors des stimuli lumineux ont tendance à parcourir plus de distance que pendant les phases sombres. De manière générale, il est admis que la lumière est nécessaire pour stimuler la locomotion chez la planaire, qui est au repos dans l'obscurité. Mais, comme il a été observé dans cette étude et par la suite dans l'article 2 (Rejo et al., 2023), les planaires réagissent surtout à la première phase lumineuse durant laquelle, elles parcourent une distance plus importante en comparaison aux trois autres phases. En analysant l'électroencéphalogramme des planaires pendant un test de photo-stimulation, Aoki et al., (2009) ont montré que leur activité cérébrale diminuait en amplitude en réponse aux changements fréquents de lumière, ce qui pourrait expliquer nos observations. Cependant, le profil ondulatoire observé chez les planaires est l'inverse de celui des larves de poisson zèbres pour lesquelles la transition lumière-obscurité augmente l'activité locomotrice tandis que la transition obscurité-lumière la diminue (Basnet et al., 2019). Dans Rejo et al, (2023), le PMR a permis de discriminer les espèces de planaires *G.tigrina* et *S.polychroa*, pour lesquelles une différence significative de comportement ont été observées entre les planaires soumises (12h lumière / 12h obscurité) ou non (24h obscurité) à un cycle de photopériode. Cependant, dans ce même article, lors de l'analyse de l'effet du Chlorpyrifos et du Coumaphos, deux pesticides organophosphorés (OPs), inhibiteurs de l'AcChE, sur le comportement des planaires, nous observons que les résultats du PMR miment alors ceux du test d'exploration et ne permettent pas de conclure sur un effet cumulatif des OPs et de la stimulation lumineuse. Les OPs agissent sur l'axe cholinergique, or c'est le système

GABAergique qui contrôle la photosensibilité des planaires (Nishimura, Kitamura, Inoue, et al., 2008). Cette spécialisation de la fonction des neurotransmetteurs expliquerait la pertinence du PMR pour évaluer l'effet du cycle de photopériode, et ses limites pour l'analyse des effets des OPs. Il serait alors intéressant de considérer le PMR pour évaluer l'effet de molécules susceptibles de perturber la fonction du système GABAergique.

L'effet de stimulus vibratoires sur la contraction du corps de la planaire a déjà été étudié par (Ross et al., 2018). Cependant, nous avons voulu utiliser la locomotion comme indicateur pour analyser la réponse des planaires pour tenter de mettre en avant une réponse suite à stimulus qui pourrait être considéré comme un stimulus induisant l'anxiété. Malgré l'observation d'une tendance à une baisse de la locomotion de *D. japonica* et *S. mediterranea* après le tapping par rapport à une période équivalente précédent le stimulus, les différences observées n'étaient pas statistiquement significatives. Ce qui ne permet pas d'envisager dans les conditions actuelles l'utilisation de ce test pour le criblage de composés neuroactifs, de polluants environnementaux et de médicaments altérant la capacité d'évitement des prédateurs, pour lequel, il est utilisé chez le poisson-zèbre (Faria et al., 2019).

Le Planarian Light Dark Test (PLDT) repose sur la phototaxie négative caractéristique de la planaire (Davidson et al., 2011). Ce test n'est pas nouveau. En effet, Cho et al., (2019) et Zewde et al., (2018) ont montré sa pertinence pour évaluer la réponse des planaires à l'exposition aux odeurs d'un prédateur (extraits de grenouille) et à des anxiolytiques de la famille des benzodiazépines, respectivement. Et Martinez et al., (2020) ont observé une forte phototaxie négative chez les *S. mediterranea* qui passaient 95% du temps d'acquisition dans la zone sombre. Cependant, dans notre étude, les proportions ne s'élèvent qu'à 60.2% et 54.9% (Rejo et al., 2023). Nous faisons l'hypothèse que ces résultats peu probants sont dus à des défauts de notre dispositif expérimental. En effet, nous utilisons un cadre noir adapté aux plaques 24 puits, que l'on plaçait en dessous de la plaque et qui empêchait la pénétration de la lumière uniquement sur la moitié du fond du puits, mais laissait pénétrer la lumière sur les autres côtés. Ce test nécessite alors d'être perfectionné, peut être en utilisant des plaques à paroi opaques, ce qui optimiserait les conditions du test.

Le test d'exploration, nommé « test de locomotion » consiste à placer la planaire dans un espace délimité et de suivre son déplacement sur un temps défini. Nous avons déterminé que, réalisé dans des plaques 24 puits à 10 000 lux (intensité lumineuse) et analysé sur une période de 20 minutes, ce test est robuste, fiable et répétable pour les études toxicologiques sur les planaires, notamment pour les substances qui agissent sur l'axe cholinergique. En effet, chez la

planaire, le contrôle physiologique de l'activité motrice, notamment des mouvements musculaires dépend de l'équilibre entre les transmissions cholinergiques et dopaminergiques (Cochet-Escartin et al., 2015; Nishimura et al., 2010; Nishimura et al., 2007). Ainsi le Coumaphos et le Chlorpyrifos, deux inhibiteurs de l'AChE, après 24h d'exposition, ont induit une diminution significative de la locomotion des planaires (cf. l'article 2). La nicotine et l'imidaclopride, deux agonistes des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine ont induit une diminution de locomotion, concentration-dépendante et une augmentation significative de la locomotion à faibles concentrations, respectivement (cf. l'article 3.). De plus, nous avons également observé que ce test est fiable pour analyser l'effet de solvants communément utilisés en laboratoire, tels que le DMSO et l'éthanol (Rejo et al., 2023). Après ce focus sur l'axe cholinergique, il faudrait ensuite évaluer l'effet de substances susceptibles d'interagir avec les récepteurs dopaminergiques, tels que l'insecticide organochloré endosulfan (W. W. Wilson et al., 2014) ou l'atrazine (Figueira et al., 2017), un herbicide, pour établir l'implication de cette voie dans la locomotion des planaires et dans la manifestation d'effet neurotoxiques.

2.3 Exploitation d'un indicateur postural et morphologique : les stéréotypies

Les stéréotypies motrices ou posturale sont des formes spécifiques adoptées par les planaires en conséquence d'une altération neuromusculaire (soit d'origine dopaminergique ou cholinergique) et peuvent être réparties en deux catégories : les hypokinésies tels que le *bridge-like* et le *walnut* ; et les hyperkinésies tels que le *C-shape*, le *screw-like*, et le *snake-like* (Buttarelli et al., 2000, 2008; Passarelli et al., 1999). Ces stéréotypies des planaires, ont été observées chez *D. japonica* exposées à la Methylisothiazolinone, un biocide commun utilisé dans l'industrie et les cosmétiques (Van Huizen et al., 2017) et pourraient par conséquent servir d'outil de biosurveillance en écotoxicologie. Cependant, les études s'intéressant à ces comportements manquent d'harmonisation en termes de protocole et ne permettent pas, à ce jour, d'établir la fiabilité des stéréotypies comme indicateurs spécifiques de perturbations neuronales. Dans le chapitre 3, nous avons identifié les stéréotypies associées à des substances neuroactives agissant sur l'axe cholinergique et dopaminergique. Ainsi, les cibles neuronales de ces molécules sont connues et leurs effets démontrés chez la planaire ou au moins chez d'autres organismes. Cette étude est d'abord réalisée dans le but d'élaborer un premier protocole harmonisé d'exposition et de quantification des réponses stéréotypées en créant notre propre catalogue de molécule. Dans un second temps, l'objectif est et sera de confirmer et d'établir ou non, un profil liant un comportement spécifique à la stimulation (agoniste ou antagoniste) d'une sous-population neuronale.

Buttarelli et al., (2000) ont suggéré que les planaires exposées à de fortes concentrations de nicotine (agoniste des récepteurs nicotiques (nAChRs)) et de physostigmine (Inhibiteur de l'AChE) exprimaient des hypokinésies de type *bridge-like* et *walnut*, respectivement. A l'inverse, les vers exposés à l'atropine (antagoniste des récepteurs muscariniques) exprimaient plutôt des hyperkinésies de type *screw-like*.

Cependant, nos résultats, obtenus à la suite de l'exposition à ces mêmes molécules, n'indiquent pas un schéma aussi spécifique et tranché. Similairement à ce qui est observé par (Buttarelli et al., 2000), la stimulation de la transmission cholinergique avec la nicotine a induit des *walnut* et son inhibition avec la tubocurarine (antagoniste des nAChRs) et l'atropine, a induit des hyperkinésies. Néanmoins, les planaires exposées à la physostigmine ont présenté des *screw-like* et des *c-shape* et non les hypokinésies attendues. De plus, nous avons observé que l'exposition de planaires à de l'acétylcholine exogène ont également induit des hyperkinésies de type *screw-like*. Nos résultats suggèrent donc que les réponses stéréotypées dues à la stimulation (agoniste et neurotransmetteur) des récepteurs cholinergiques ne sont pas forcément toutes de nature hypokinétique tout comme celles dues à l'inhibition (antagoniste) de ces mêmes neurones ne sont pas forcément toutes hyperkinétiques.

L'exposition de *S. mediterranea* à des substances agissant sur le système dopaminergique n'a pas non plus permis de mettre en évidence une spécificité dans les réponses comportementales. Il a été précédemment démontré par la neuropharmacologie que l'apomorphine (agoniste des récepteurs dopaminergiques) et l'halopéridol (antagoniste) induisaient respectivement des hyperkinésies de type *screw-like* et des hypokinésies de type *bridge-like* chez les planaires (Buttarelli et al., 2000; Palladini et al., 1996; Venturini et al., 1989). Dans nos résultats complémentaires du chapitre 3, les planaires produisent effectivement des hyperkinésies (*snake-like* et *screw-like*) à la suite de l'exposition à un l'apomorphine. Mais contrairement à ce qui était attendu, ces mêmes comportements -avec en plus du *c-shape*- sont observés pour l'antagoniste, l'halopéridol. Ainsi, nos résultats indiquent que la stimulation et l'inhibition des récepteurs dopaminergiques induisent tous deux des stéréotypies hyperkinétiques chez les planaires.

Nos résultats et ceux de la littérature présentent des différences au niveau de la spécificité des réponses stéréotypées des planaires exposées à des molécules ciblant les récepteurs cholinergiques et dopaminergiques. Ces divergences peuvent être dues aux différents protocoles mis en place d'une étude à l'autre. En effet, des paramètres tels que les temps d'exposition, les gammes de concentrations des molécules ou encore les espèces de planaires étudiées vont influencer les réponses obtenues.

La plupart des études qui se sont intéressées aux changements morphologiques des planaires en réponse à l'exposition à des molécules neuroactives se limitaient à un seul temps d'observation. Dans leur travail, Buttarelli et al., (2000) observaient les changements comportementaux pendant 1h, Palladini et al., (1996) pendant 2h, Algeri et al., (1983) avaient un temps d'exposition spécifique à chacune des molécules testées et Venturini et al., (1989) arrêtaient leur observation dès l'apparition des stéréotypies. Or, nos résultats montrent que certaines molécules n'induisent des stéréotypies qu'à partir de 3h et que les stéréotypies produites peuvent changer de nature au cours du temps. Ce qui est en accord avec les observations de Van Huizen et al., (2017) qui a montré que 6h d'exposition à des concentrations croissantes de methylisothiazolinone, induisait des hypokinésies de type *walnut* à 20µM mais des *c-shape* et *screw-like* de 30µM à 45µM. Dans notre étude, nous démontrons également que ces variations de catégories ainsi que l'intensité des stéréotypies dépendent des concentrations testées. En effet, nos résultats indiquent que certaines molécules induisent des réponses stéréotypées de plus en plus longues dans le temps à mesure que la concentration augmente, ce qui est en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature (Buttarelli et al., 2000; Oné R. Pagán et al., 2015). Enfin, notre étude s'est portée sur l'espèce de planaire *S. mediterranea* alors les stéréotypies ont également été étudiées chez *G.tigrina*, *D. gonocephala* et *D. dorotocephala* (**Table S 4, supplementary information - article 3**). Or, les espèces de planaires pourraient avoir une sensibilité différente aux mêmes substances chimiques tout comme il a déjà été démontré que les réponses comportementales sont variables en fonction de l'espèce (Ireland et al., 2020; Martinez et al., 2020).

Aujourd'hui, avec les 10 composés neuroactifs ciblant les axes cholinergiques et dopaminergiques, testés sur l'ensemble du chapitre 3, nous avons établi un catalogue des réponses posturales avec un protocole standardisé sur *S.mediterranea*. Ce catalogue servirait de base de données pour étendre l'étude des stéréotypies à l'analyse de l'effet de substances qui agirait sur les récepteurs au GABA, à l'octopamine, au glutamate et la sérotonine, retrouvés chez la planaire, et par la suite à d'autres molécules avec des effets moins bien connus.

3. Comportement et mode d'action des substances sur le système nerveux

La planaire est un modèle pertinent pour l'étude des perturbations du système nerveux aussi bien dans le cadre toxicologique qu'écotoxicologique, ainsi dans cette thèse nous avons montré le potentiel neurotoxique sur la planaire de deux pesticides organophosphorés (Chlorpyrifos et Coumaphos), de la nicotine et dans une certaine mesure l'effet neuroactif de l'imidaclopride, un néonicotinoïde.

Nous avons utilisé une approche de neuropharmacologie comportementale, qui consiste à évaluer l'effet de substances dont le mode d'action est connu chez d'autres modèles animaux. Les observations du comportement fournissent des informations sur le mode d'action potentiel d'un produit chimique chez la planaire, et de la conservation de ces modes d'actions par rapport à d'autres modèles animaux. Ce que nous souhaitons réaliser dans cette étude neuropharmacologique globale des stéréotypies.

4. Les limites du modèle planaire

L'exposition des planaires par balnéation –pourtant le mode d'exposition le moins invasif pour les planaires- posent plusieurs problèmes. En effet, nous avons observé que lors d'expositions à certaines substances, les planaires préfèrent sortir du puits et sécher (que nous avons défini comme un « suicide ») que d'y rester. Il s'agit alors d'un comportement indicateur de la toxicité, que nous n'avons pas pris en compte dans nos tests car nous ne considérons pas l'exposition comme étant complète, comme l'ont fait Van Huizen et al., (2017) et Zhang et al., (2019). L'exposition aux molécules se fait par diffusion épidermique et dans une certaine mesure probablement par le pharynx des planaires. Les planaires sont couvertes d'une couche de mucus protectrice -qui leur permet de lutter contre les infections et les blessures- qui pourraient empêcher l'absorption ou entraîner la dégradation de certaines substances chimiques. Les quantités absorbées et la métabolisation des substances ici étudiées, par les planaires n'est pas connue et mériterait d'être évalués (S. Zhang et al., 2019).

Au début de ma thèse, à partir d'une population de 130 planaires de 2 espèces différentes (approximativement 30 *Schmidtea mediterranea* asexuée et 100 *D.japonica*), il a fallu que je monte un élevage de planaires afin d'avoir assez d'individus pour effectuer mes tests. J'ai ainsi profité des capacités de régénération des planaires pour développer ma population. Cependant, travailler avec des populations clonales de planaires, pose le problème de l'absence de variabilité génétique.

Perspectives

La planaire présente une sensibilité aux substances chimiques comparable à celle des modèles d'invertébrés d'eau douce bien établis tels que les daphnies, les larves de poissons zèbres et les nématodes (Hagstrom et al., 2015; Wu & Li, 2018). Ainsi, nos objectifs à long terme seraient 1) de poursuivre les efforts amorcés afin d'établir la planaire comme modèle d'étude pour les essais toxicologiques, et 2) d'intégrer des indicateurs comportementaux en tant que mesure quantitative de la toxicité en l'intégrant dans les lignes directrices de l'OCDE.

Cependant, dans le cadre de l'évaluation des risques environnementaux associés à des substances chimiques, le comportement reste un indicateur de second plan malgré l'apparition de publications expliquant l'importance d'intégrer le comportement dans ces tests (Legradi et al., 2018). En effet, les essais toxicologiques destinés à l'établissement de lignes directrices sont traditionnellement basés sur des études standard mesurant la croissance, la mortalité et la reproduction (ECHA, 2011). Les indicateurs comportementaux ne sont utilisés pour évaluer de la qualité de l'eau, le statut des animaux de laboratoire et la poursuite de l'expérience, pour optimiser la conception des essais ou en tant que marqueurs du bien-être des animaux. Ford et al., (2021) expliquent que la faible considération des études comportementales dans la mise en place de réglementations environnementales est principalement due à l'absence de méthodes standardisées pour les essais toxicologiques.

Puisque nous œuvrons dans un contexte écotoxicologique, il s'agit d'améliorer l'intégration des effets comportementaux dans l'évaluation des risques, l'élaboration de critères et la réglementation des contaminants chimiques. Par ailleurs, certains chercheurs pensent que les résultats des tests d'écotoxicologie comportementale sont moins fiables et non reproductibles, ou que les réponses comportementales sont difficiles à extrapoler au niveau de la population, des efforts sont à faire en ce sens. Les données collectées en laboratoire peuvent prédire la variation de comportements écologiquement importants sur le terrain, y compris l'activité et l'exploration.

Des modules d'enseignement (travaux pratiques) pour l'introduction au *tracking* et aux neurosciences avec l'usage de la planaire comme modèle d'étude ont été proposés. Ces vers sont peu coûteux et faciles à entretenir, à manipuler et à perturber, et leur taille relativement grande permet l'acquisition d'images à l'aide d'une webcam, ce qui rend ce module de

laboratoire accessible et évolutif (Stowell et al., 2021) et qui encouragerait l'usage de la planaire par les étudiants et contribuerait donc à la « démocratisation » du modèle.

Enfin, à partir de données comportementales actuelles, le développement de stratégies d'apprentissage automatiques basées sur l'intelligence artificielle (IA), afin d'associer des « clusters comportementaux » à une stimulation neuronale particulière (Henry & Wlodkowic, 2020) serait intéressant notamment pour une analyse à haut débit des stéréotypies. Sur ce point, une nouvelle thèse débute au laboratoire. Le développement de plateformes automatisées à haut débit conjugué à l'IA pour l'analyse du comportement des planaires améliorera considérablement l'intégration de données mécanistiques (mode d'action), élargissant notre compréhension des effets des substances toxiques sur le SN et ouvrant la voie à de nouvelles approches de criblage pour identifier de nouveaux composés ayant d'importants effets toxiques (Nicolas et al., 2008).

Références bibliographiques

- Adler, C. E., & Sánchez Alvarado, A. (2015). Types or States? Cellular Dynamics and Regenerative Potential. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 687. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2015.07.008>
- Agata, K., Soejima, Y., Kato, K., Kobayashi, C., Umesono, Y., & Watanabe, K. (1998). Structure of the planarian central nervous system (CNS) revealed by neuronal cell markers. *Zoological Science*, 15(3), 433–440. <https://doi.org/10.2108/ZSJ.15.433>
- Aigbe, F. R., Sofidiya, O. M., James, A. B., Sowemimo, A. A., Akindere, O. K., Aliu, M. O., Dosunmu, A. A., Chijioke, M. C., & Adeyemi, O. O. (2019). Evaluation of the toxicity potential of acute and sub-acute exposure to the aqueous root extract of *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 244, 112150. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2019.112150>
- Akiyama, Y., Agata, K., & Inoue, T. (2015). Spontaneous behaviors and wall-curvature lead to apparent wall preference in planarian. *PLoS ONE*, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142214>
- Alberti, S., Sotiropoulou, M., Fernández, E., Solomou, N., Ferretti, M., & Psillakis, E. (2021). UV-254 degradation of nicotine in natural waters and leachates produced from cigarette butts and heat-not-burn tobacco products. *Environmental Research*, 194, 110695. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.110695>
- Algeri, S., Carolei, A., Ferretti, P., Gallone, C., Palladini, G., & Venturini, G. (1983). Effects of dopaminergic agents on monoamine levels and motor behaviour in planaria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 74(1), 27–29. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(83\)90142-1](https://doi.org/10.1016/0742-8413(83)90142-1)
- Almazan, E. M. P., Ryan, J. F., & Rouhana, L. (2021). Regeneration of Planarian Auricles and Reestablishment of Chemotactic Ability. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.777951>
- Amaning-Kwarteng, A. O., Asif-Malik, A., Pei, Y., & Canales, J. J. (2017). Relapse to cocaine seeking in an invertebrate. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 157, 41–46.

<https://doi.org/10.1016/J.PBB.2017.04.008>

- An, Y., Kawaguchi, A., Zhao, C., Toyoda, A., Sharifi-Zarchi, A., Mousavi, S. A., Bagherzadeh, R., Inoue, T., Ogino, H., Fujiyama, A., Chitsaz, H., Baharvand, H., & Agata, K. (2018). Draft genome of *Dugesia japonica* provides insights into conserved regulatory elements of the brain restriction gene *nou-darake* in planarians. *Zoological Letters*, *4*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40851-018-0102-2/FIGURES/7>
- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, C. L., Schmieder, P. K., Serrano, J. A., Tietge, J. E., & Villeneuve, D. L. (2010). Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *29*(3), 730–741. <https://doi.org/10.1002/ETC.34>
- Aoki, R., Wake, H., Sasaki, H., & Agata, K. (2009). Recording and spectrum analysis of the planarian electroencephalogram. *Neuroscience*, *159*(2), 908–914. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.11.011>
- Araujo-Silva, H., de Souza, A. M., Mamede, J. P. M., de Medeiros, S. R. B., & Luchiari, A. C. (2023). Individual differences in response to alcohol and nicotine in zebrafish: Gene expression and behavior. *Development, Growth & Differentiation*. <https://doi.org/10.1111/DGD.12876>
- Atlas, R. M. (2012). *One Health: Its Origins and Future*. 1–13. https://doi.org/10.1007/82_2012_223
- Bach, D. J., Tenaglia, M., Baker, D. L., Deats, S., Montgomery, E., & Pagán, O. R. (2016). Cotinine antagonizes the behavioral effects of nicotine exposure in the planarian *Girardia tigrina*. *Neuroscience Letters*, *632*, 204. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2016.09.005>
- Baguñà, J. (2012). The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *The International Journal of Developmental Biology*, *56*(1-2-3), 19–37. <https://doi.org/10.1387/IJDB.113463JB>
- Baguñà, J., & Ballester, R. (1978). The nervous system in planarians: Peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation, and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. *Journal of Morphology*, *155*(2), 237–

252. <https://doi.org/10.1002/JMOR.1051550208>

- Baguñà, J., Carranza, S., Pala, M., Ribera, C., Giribet, G., Arnedo, M. A., Ribas, M., & Riutort, M. (1999). From morphology and karyology to molecules. New methods for taxonomical identification of asexual populations of freshwater planarians. A tribute to Professor Mario Benazzi. *Italian Journal of Zoology*, *66*(3), 207–214. <https://doi.org/10.1080/11250009909356258>
- Balestrini, L., Isolani, M. E., Pietra, D., Borghini, A., Bianucci, A. M., Deri, P., & Batistoni, R. (2014). Berberine exposure triggers developmental effects on planarian regeneration. *Scientific Reports*, *4*. <https://doi.org/10.1038/SREP04914>
- Barbosa, R. S., Rotili, E. A., Magda, A., Santos, A., Ribeiro, F., Silvestre, A., Dornelas, P., Pereira, D. H., Soares Cavallini, G., Soares, A. M. V. M., Sarmiento, R. A., & Gravato, C. (2022). Eco(toxicological) Assessment of the Neonicotinoid Formulation Actara® Using Planarian *Girardia tigrina* as Model Organism. *Pollutants 2022, Vol. 2, Pages 546-555*, *2*(4), 546–555. <https://doi.org/10.3390/POLLUTANTS2040035>
- Barr, M. M. (2003). Super models. *Physiological Genomics*, *13*, 15–24. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00075.2002/ASSET/IMAGES/LARGE/H71030329001.JPEG>
- Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., & Memo, M. (2019). Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines 2019, Vol. 7, Page 23*, *7*(1), 23. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES7010023>
- Beard, J. (2006). DDT and human health. *The Science of the Total Environment*, *355*(1–3), 78–89. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2005.02.022>
- Beckingham, K. M., Armstrong, D., Texada, M. J., Munjaal, R., & Baker, D. A. (2005). *Drosophila melanogaster*: The model organism of choice for the complex biology of multicellular organisms. *Gravitational and Space Biology*, *18*(2). <https://www.research.ed.ac.uk/en/publications/drosophila-melanogaster-the-model-organism-of-choice-for-the-comp>
- Bernhardt, E. S., Rosi, E. J., & Gessner, M. O. (2017). Synthetic chemicals as agents of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *15*(2), 84–90.

<https://doi.org/10.1002/FEE.1450>

- Best, J. B., Goodman, A. B., & Pigon, A. (1969). Fissioning in planarians: control by the brain. *Science (New York, N.Y.)*, *164*(3879), 565–566. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.164.3879.565>
- Best, J. B., & Morita, M. (1991). Toxicology of planarians. *Hydrobiologia*, *227*(1), 375–383. <https://doi.org/10.1007/BF00027626/METRICS>
- Blacquière, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A. M., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology (London, England)*, *21*(4), 973–992. <https://doi.org/10.1007/S10646-012-0863-X>
- Bownik, A., & Wlodkovic, D. (2021). Applications of advanced neuro-behavioral analysis strategies in aquatic ecotoxicology. *Science of The Total Environment*, *772*, 145577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145577>
- Boyd, W. A., Smith, M. V., Co, C. A., Pirone, J. R., Rice, J. R., Shockley, K. R., & Freedman, J. H. (2016). Developmental Effects of the ToxCast™ Phase I and Phase II Chemicals in *Caenorhabditis elegans* and Corresponding Responses in Zebrafish, Rats, and Rabbits. *Environmental Health Perspectives*, *124*(5), 586–593. <https://doi.org/10.1289/EHP.1409645>
- Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., & Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species -- an update. *ALTEX*.
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S. K., Chung, B. chu, & Kah, O. (2012). Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PloS One*, *7*(5), e36069. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0036069>
- Bundgaard, H., & Hansen, S. H. (1982). Hydrolysis and epimerization kinetics of pilocarpine in basic aqueous solution as determined by HPLC. *International Journal of Pharmaceutics*, *10*(4), 281–289. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(82\)90163-6](https://doi.org/10.1016/0378-5173(82)90163-6)
- Buttarelli, F. R., Pellicano, C., & Pontieri, F. E. (2008). Neuropharmacology and behavior in

- planarians: Translations to mammals. In *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* (Vol. 147, Issue 4, pp. 399–408). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.01.009>
- Buttarelli, F. R., Pontieri, F. E., Margotta, V., & Palladini, G. (2000). Acetylcholine/dopamine interaction in planaria. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 125(2), 225–231. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00111-5](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00111-5)
- Buttke, D. E. (2011). Toxicology, environmental health, and the “One Health” concept. *Journal of Medical Toxicology : Official Journal of the American College of Medical Toxicology*, 7(4), 329–332. <https://doi.org/10.1007/S13181-011-0172-4>
- Calevro, F., Filippi, C., Deri, P., Albertosi, C., & Batistoni, R. (1999). Toxic effects of aluminium, chromium and cadmium in intact and regenerating freshwater planarians. *Chemosphere*, 38(1), 245. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00483-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00483-4)
- Carolei, A., Margotta, V., & Palladini, G. (1975). Proposal of a new model with dopaminergic-cholinergic interactions for neuropharmacological investigations. *Neuropsychobiology*, 1(6), 355–364. <https://doi.org/10.1159/000117512>
- Castro, V. L., Clemente, Z., Jonsson, C., Silva, M., Vallim, J. H., de Medeiros, A. M. Z., & Martinez, D. S. T. (2018). Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(7), 1998–2012. <https://doi.org/10.1002/ETC.4145>
- Cebrià, F. (2007). Regenerating the central nervous system: How easy for planarians! *Development Genes and Evolution*, 217(11–12), 733–748. <https://doi.org/10.1007/S00427-007-0188-6/FIGURES/6>
- Cebrià, F. (2008). Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: An immunocytochemical study. *Neuroscience Research*, 61(4), 375–384. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2008.04.005>
- Cebrià, F., Kobayashi, C., Umesono, Y., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., Itoh, M., Taira, M., Sánchez Alvarado, A., & Agata, K. (2002). FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians. *Nature*, 419(6907), 620–624.

<https://doi.org/10.1038/NATURE01042>

- Cebrià, F., Kudome, T., Nakazawa, M., Mineta, K., Ikeo, K., Gojobori, T., & Agata, K. (2002). The expression of neural-specific genes reveals the structural and molecular complexity of the planarian central nervous system. *Mechanisms of Development*, *116*(1–2), 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00134-X)
- Cebrià, F., M, N., K, M., K, I., T, G., & K, A. (2002). Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. *Development, Growth & Differentiation*, *44*(2), 135–146. <https://doi.org/10.1046/J.1440-169X.2002.00629.X>
- Cebrià, F., & Newmark, P. A. (2005). Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. *Development (Cambridge, England)*, *132*(16), 3691–3703. <https://doi.org/10.1242/DEV.01941>
- Cho, M., Nayak, S. U., Jennings, T., Tallarida, C. S., & Rawls, S. M. (2019). Predator odor produces anxiety-like behavioral phenotype in planarians that is counteracted by fluoxetine. *Physiology & Behavior*, *206*, 181–184. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2019.04.003>
- Claude, N., Goldfain-Blanc, F., & Guillouzo, A. (2009). La place des méthodes in silico, in vitro, in omic dans l'évaluation de la sécurité des médicaments. *Médecine/Sciences*, *25*(1), 105–110. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/2009251105>
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, *127*(3), 469–480. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.10.018>
- Cochet-Escartin, O., Mickolajczyk, K. J., & Collins, E. S. (2015). Scrunching: A novel escape gait in planarians. *Physical Biology*, *12*(5). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/12/5/056010>
- Collins, F. S., Gray, G. M., & Bucher, J. R. (2008). Toxicology. Transforming environmental health protection. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5865), 906–907. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1154619>
- Collins, J. J., Hou, X., Romanova, E. V., Lambrus, B. G., Miller, C. M., Saberi, A., Sweedler,

- J. V., & Newmark, P. A. (2010). Genome-wide analyses reveal a role for peptide hormones in planarian germline development. *PLoS Biology*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000509>
- Cross, S. D., Johnson, A. A., Gilles, B. J., Bachman, L. A., Inoue, T., Agata, K., Marmorstein, L. Y., & Marmorstein, A. D. (2015). Control of Maintenance and Regeneration of Planarian Eyes by ovo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(12), 7604–7610. <https://doi.org/10.1167/IOVS.15-17458>
- Currie, K. W., Molinaro, A. M., & Pearson, B. J. (2016). Neuronal sources of hedgehog modulate neurogenesis in the adult planarian brain. *ELife*, 5(NOVEMBER2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.19735>
- Currie, K. W., & Pearson, B. J. (2013). Transcription factors *lhx1/5-1* and *pitx* are required for the maintenance and regeneration of serotonergic neurons in planarians. *Development (Cambridge)*, 140(17), 3577–3588. <https://doi.org/10.1242/dev.098590>
- D'Souza, T. G., Schulte, R. D., Schulenburg, H., & Michiels, N. K. (2006). Paternal inheritance in parthenogenetic forms of the planarian *Schmidtea polychroa*. *Heredity* 2006 97:2, 97(2), 97–101. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800841>
- Davidson, C., Prados, J., Gibson, C. L., Young, A. M. J., Barnes, D., Sherlock, R., & Hutchinson, C. V. (2011). Shedding Light on Photosensitive Behaviour in Brown Planaria (*Dugesia Tigrina*). <Http://Dx.Doi.Org/10.1068/P6949>, 40(6), 743–746. <https://doi.org/10.1068/P6949>
- Dayeh, V. R., Bols, N. C., Schirmer, K., & Lee, L. E. J. (2003). The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants. *Current Protocols in Toxicology*, Chapter 1(1), Unit 1.5-Unit 1.5. <https://doi.org/10.1002/0471140856.TX0105S15>
- Delmas, M., Filangi, O., Paulhe, N., Vinson, F., Duperier, C., Garrier, W., Saunier, P. E., Pitarch, Y., Jourdan, F., Giacomoni, F., & Frainay, C. (2021). FORUM: building a Knowledge Graph from public databases and scientific literature to extract associations between chemicals and diseases. *Bioinformatics*, 37(21), 3896–3904. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAB627>
- Deochand, N., Costello, M. S., & Deochand, M. E. (2018). Behavioral Research with Planaria.

- Perspectives on Behavior Science*, 41(2), 447. <https://doi.org/10.1007/S40614-018-00176-W>
- Dinis-Oliveira, R. J. (2023). No Boundaries for Toxicology in Clinical Medicine: One Health, One Society and One Planet for All of Us. *Journal of Clinical Medicine* 2023, Vol. 12, Page 2808, 12(8), 2808. <https://doi.org/10.3390/JCM12082808>
- Doke, S. K., & Dhawale, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223–229. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2013.11.002>
- Eltemsah, Y. S., & Bøhn, T. (2019). Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 254, 112919. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.07.087>
- European Environment Agency. (2017). *Chemicals for a Sustainable Future: Report of the EEA Scientific Committee Seminar* (Issue May). https://www.eea.europa.eu/about-us/governance/scientific-committee/reports/chemicals-for-a-sustainable-future/at_download/file
- Faria, M., Prats, E., Novoa-Luna, K. A., Bedrossiantz, J., Gómez-Canela, C., Gómez-Oliván, L. M., & Raldúa, D. (2019). Development of a vibrational startle response assay for screening environmental pollutants and drugs impairing predator avoidance. *The Science of the Total Environment*, 650(Pt 1), 87–96. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.421>
- Farnesi, R. M., & Tei, S. (1980). *Dugesia lugubris* s.l. auricles: research into the ultrastructure and on the functional efficiency. *Rivista Di Biologia*, 73(1), 65–77. <https://europepmc.org/article/med/7466176>
- Felix, D. A., Gutiérrez-Gutiérrez, Ó., Espada, L., Thems, A., & González-Estévez, C. (2019). It is not all about regeneration: Planarians striking power to stand starvation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 87, 169–181. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2018.04.010>
- Figueira, F. H., de Quadros Oliveira, N., de Aguiar, L. M., Escarrone, A. L., Primel, E. G., Barros, D. M., & da Rosa, C. E. (2017). Exposure to atrazine alters behaviour and disrupts the dopaminergic system in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and*

Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 202, 94–102.
<https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2017.08.005>

Fischer, M., Belanger, S. E., Berckmans, P., Bernhard, M. J., Bláha, L., Schmid, D. E. C., Dyer, S. D., Haupt, T., Hermens, J. L. M., Hultman, M. T., Laue, H., Lillicrap, A., Mlnaříková, M., Natsch, A., Novák, J., Sinnige, T. L., Tollefsen, K. E., Von Niederhäusern, V., Witters, H., ... Schirmer, K. (2019). Repeatability and Reproducibility of the RTgill-W1 Cell Line Assay for Predicting Fish Acute Toxicity. *Toxicological Sciences*, 169(2), 353–364.
<https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFZ057>

Ford, A. T., Ågerstrand, M., Brooks, B. W., Allen, J., Bertram, M. G., Brodin, T., Dang, Z., Duquesne, S., Sahm, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Klüver, N., Lazorchak, J. M., Ledesma, M., Melvin, S. D., Mohr, S., Padilla, S., Pyle, G. G., ... Maack, G. (2021). The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection. *Environmental Science and Technology*, 55(9), 5620–5628.
https://doi.org/10.1021/ACS.EST.0C06493/ASSET/IMAGES/LARGE/ES0C06493_0002.JPG

Forsthoefel, D. J., Park, A. E., & Newmark, P. A. (2011). Stem cell-based growth, regeneration, and remodeling of the planarian intestine. *Developmental Biology*, 356(2), 445–459.
<https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.05.669>

Fraguas, S., Barberán, S., & Cebrià, F. (2011). EGFR signaling regulates cell proliferation, differentiation and morphogenesis during planarian regeneration and homeostasis. *Developmental Biology*, 354(1), 87–101. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2011.03.023>

Freires, I. A., Sardi, J. de C. O., de Castro, R. D., & Rosalen, P. L. (2017). Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharmaceutical Research*, 34(4), 681–686. <https://doi.org/10.1007/S11095-016-2069-Z/METRICS>

Gamo, J., & Noreña-Janssen, C. (1998). Old and new records of turbellarians from the central areas of Spain. *Hydrobiologia*, 383(1–3), 299–305.
<https://doi.org/10.1023/A:1003448029737/METRICS>

Garcia-Fernandez, J., Bayascas-Ramirez, J. R., Marfany, G., Munoz-Marmol, A. M., Casali, A., Baguna, J., & Salo, E. (1995). High copy number of highly similar mariner-like

- transposons in planarian (Platyhelminthe): evidence for a trans-phyla horizontal transfer. *Molecular Biology and Evolution*, 12(3), 421–431. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040217>
- Gaviño, M. A., & Reddien, P. W. (2011). A Bmp/Admp Regulatory Circuit Controls Maintenance and Regeneration of Dorsal-Ventral Polarity in Planarians. *Current Biology*, 21(4), 294–299. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2011.01.017>
- Gilbert, L. I. (2008). Drosophila is an inclusive model for human diseases, growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 293(1–2), 25–31. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2008.02.009>
- Gissi, F., Binet, M. T., & Adams, M. S. (2013). Acute toxicity testing with the tropical marine copepod *Acartia sinjiensis*: Optimisation and application. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 86–93. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2013.07.008>
- Grebe, E., & Schaeffer, D. J. (1991). Planarians in toxicology, standardization of a rapid neurobehavioral toxicity test using phenol in a crossover study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(6), 866–870. <https://doi.org/10.1007/BF01689731>
- Grohme, M. A., Schloissnig, S., Rozanski, A., Pippel, M., Young, G. R., Winkler, S., Brandl, H., Henry, I., Dahl, A., Powell, S., Hiller, M., Myers, E., & Rink, J. C. (2018). The genome of *Schmidtea mediterranea* and the evolution of core cellular mechanisms. *Nature* 2018 554:7690, 554(7690), 56–61. <https://doi.org/10.1038/nature25473>
- Guo, W., Pan, B., Sakkiah, S., Yavas, G., Ge, W., Zou, W., Tong, W., & Hong, H. (2019). Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2019, Vol. 16, Page 4361, 16(22), 4361. <https://doi.org/10.3390/IJERPH16224361>
- Hagstrom, D., Cochet-Escartin, O., & Collins, E. S. (2016). Planarian brain regeneration as a model system for developmental neurotoxicology. *Regeneration (Oxford, England)*, 3(2), 65–77. <https://doi.org/10.1002/REG2.52>
- Hagstrom, D., Cochet-Escartin, O., Zhang, S., Khuu, C., & Collins, E. S. (2015). Freshwater Planarians as an Alternative Animal Model for Neurotoxicology. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 147(1), 270–285.

<https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFV129>

- Hagstrom, D., Hirokawa, H., Zhang, L., Radic, Z., Taylor, P., & Collins, E. S. (2017). Planarian cholinesterase: in vitro characterization of an evolutionarily ancient enzyme to study organophosphorus pesticide toxicity and reactivation. *Archives of Toxicology*, *91*(8), 2837–2847. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1908-3>
- Hagstrom, D., Truong, L., Zhang, S., Tanguay, R., & Collins, E. S. (2019). Comparative Analysis of Zebrafish and Planarian Model Systems for Developmental Neurotoxicity Screens Using an 87-Compound Library. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, *167*(1), 45–57. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFY180>
- Hartenstein, V., & Stollewerk, A. (2015). The evolution of early neurogenesis. *Developmental Cell*, *32*(4), 390–407. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2015.02.004>
- Hartung, T. (2011). From alternative methods to a new toxicology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, *77*(3), 338–349. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2010.12.027>
- Hassanen, E. I., Issa, M. Y., Hassan, N. H., Ibrahim, M. A., Fawzy, I. M., Fahmy, S. A., & Mehanna, S. (2023). Potential Mechanisms of Imidacloprid-Induced Neurotoxicity in Adult Rats with Attempts on Protection Using *Origanum majorana* L. Oil/Extract: In Vivo and In Silico Studies. *ACS Omega*, *8*(21), 18491–18508. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.2C08295/ASSET/IMAGES/LARGE/AO2C08295_0009.JPEG
- Henry, J., & Wlodkowic, D. (2020). High-throughput animal tracking in chemobehavioral phenotyping: Current limitations and future perspectives. *Behavioural Processes*, *180*, 104226. <https://doi.org/10.1016/J.BEPROC.2020.104226>
- Hoshino, K., Ohnishi, K., Yoshida, W., & Shinozawa, T. (1991). Analysis of ploidy in a planarian by flow cytometry. *Hydrobiologia*, *227*(1), 175–178. <https://doi.org/10.1007/BF00027599/METRICS>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M.,

- Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013 496:7446, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hunt, P. R. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, 37(1), 50–59. <https://doi.org/10.1002/JAT.3357>
- Inoue, T., Hoshino, H., Yamashita, T., Shimoyama, S., & Agata, K. (2015). Planarian shows decision-making behavior in response to multiple stimuli by integrative brain function. *Zoological Letters*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/S40851-014-0010-Z>
- Inoue, T., Kumamoto, H., Okamoto, K., Umesono, Y., Sakai, M., Alvarado, A. S., & Agata, K. (2004). Morphological and functional recovery of the planarian photosensing system during head regeneration. *Zoological Science*, 21(3), 275–283. <https://doi.org/10.2108/ZSJ.21.275>
- Inoue, T., Yamashita, T., & Agata, K. (2014). Thermosensory signaling by TRPM is processed by brain serotonergic neurons to produce planarian thermotaxis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(47), 15701–15714. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5379-13.2014>
- Ireland, D., Bochenek, V., Chaiken, D., Rabeler, C., Onoe, S., Soni, A., & Collins, E. S. (2020). *Dugesia japonica* is the best suited of three planarian species for high-throughput toxicology screening. *Chemosphere*, 253. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.126718>
- Ireland, D., & Collins, E. S. (2022). New Worm on the Block: Planarians in (Neuro)Toxicology. *Current Protocols*, 2(12), e637. <https://doi.org/10.1002/CPZ1.637>
- Ivankovic, M., Haneckova, R., Thommen, A., Grohme, M. A., Vila-Farré, M., Werner, S., & Rink, J. C. (2019). Model systems for regeneration: Planarians. *Development (Cambridge)*, 146(17). <https://doi.org/10.1242/DEV.167684/222983>
- Jarman, W. M., & Ballschmiter, K. (2012). From coal to DDT: the history of the development of the pesticide DDT from synthetic dyes till Silent Spring. *Endeavour*, 36(4), 131–142. <https://doi.org/10.1016/J.ENDEAVOUR.2012.10.003>

- Jeffries, M. K. S., Stultz, A. E., Smith, A. W., Stephens, D. A., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., & Oris, J. T. (2015). The fish embryo toxicity test as a replacement for the larval growth and survival test: A comparison of test sensitivity and identification of alternative endpoints in zebrafish and fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(6), 1369–1381. <https://doi.org/10.1002/ETC.2932>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2897–2908. https://doi.org/10.1021/JF101303G/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2010-01303G_0011.GIF
- Johari, S. A., Rasmussen, K., Gulumian, M., Ghazi-Khansari, M., Tetarazako, N., Kashiwada, S., Asghari, S., Park, J. W., & Yu, I. J. (2018). Introducing a new standardized nanomaterial environmental toxicity screening testing procedure, ISO/TS 20787: aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater Lakes using *Artemia* sp. nauplii. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1512695>, 29(2), 95–109. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1512695>
- Jones, A. K., & Sattelle, D. B. (2010). Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 683, 25–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_3
- Judson, R. S., Houck, K. A., Kavlock, R. J., Knudsen, T. B., Martin, M. T., Mortensen, H. M., Reif, D. M., Rotroff, D. M., Shah, I., Richard, A. M., & Dix, D. J. (2010). In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project. *Environmental Health Perspectives*, 118(4), 485–492. <https://doi.org/10.1289/EHP.0901392>
- Kang, S. W., Seo, J., Han, J., Lee, J. S., & Jung, J. (2011). A comparative study of toxicity identification using *Daphnia magna* and *Tigriopus japonicus*: Implications of establishing effluent discharge limits in Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 63(5–12), 370–375. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2010.11.024>
- Kapu, M. M., & Schaeffer, D. J. (1991). Planarians in toxicology. Responses of asexual *Dugesia dorotocephala* to selected metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2), 302–307. <https://doi.org/10.1007/BF01688656>

- Kawakatsu, M., Nishino, M., Ogata, K., Kuranishi, R. B., Kobayashi, N., & Ohtaka, A. (2012). *Two North American Freshwater Planarian Species Now Naturalized in Japan: Girardia tigrina (Girard, 1850) and Girardia dorotocephala (Woodworth, 1897) ---In Connection with the Field Survey of Benthic Invertebrates---*.
- Khabib, M. N. H., Sivasanku, Y., Lee, H. B., Kumar, S., & Kue, C. S. (2022). Alternative animal models in predictive toxicology. *Toxicology*, *465*, 153053. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2021.153053>
- Killeen, M. T., & Sybingco, S. S. (2008). Netrin, Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Developmental Biology*, *323*(2), 143–151. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2008.08.027>
- Kim, A., & Rawls, S. M. (2022). Nicotine-induced C-shape movements in planarians are reduced by antinociceptive drugs: Implications for pain in planarian paroxysm etiology? *Brain Research*, *1778*. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2021.147770>
- Kim, Y. H., Kwon, D. H., Ahn, H. M., Koh, Y. H., & Lee, S. H. (2014). Induction of soluble AChE expression via alternative splicing by chemical stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *48*(1), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.001>
- Klaassen, C. D. (n.d.). *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons*.
- Knakievicz, T. (2014). Planarians as invertebrate bioindicators in freshwater environmental quality: the biomarkers approach. *Ecotoxicol. Environ. Contam.*, *V*, *9*(1), 1–12. <https://doi.org/10.5132/eec.2014.01.001>
- Knight, A. W., Little, S., Houck, K., Dix, D., Judson, R., Richard, A., McCarroll, N., Akerman, G., Yang, C., Birrell, L., & Walmsley, R. M. (2009). Evaluation of high-throughput genotoxicity assays used in profiling the US EPA ToxCast chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP*, *55*(2), 188–199. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2009.07.004>
- Koehlé-Divo, V., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Simonin, C., Bertrand, C., Sohm, B., Mouneyrac, C., Devin, S., & Giambérini, L. (2018). Genotoxicity and physiological effects of CeO₂ NPs on a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*). *Aquatic Toxicology*

- (*Amsterdam, Netherlands*), 198, 141–148.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2018.02.020>
- Krimsky, S. (2017). The unsteady state and inertia of chemical regulation under the US Toxic Substances Control Act. *PLOS Biology*, 15(12), e2002404.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2002404>
- Kudelska, M. M., Holden-Dye, L., O'Connor, V., & Doyle, D. A. (2017). Concentration-dependent effects of acute and chronic neonicotinoid exposure on the behaviour and development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pest Management Science*, 73(7), 1345–1351. <https://doi.org/10.1002/PS.4564>
- Kusk, K. O., & Wollenberger, L. (2007). Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology (London, England)*, 16(1), 183–195. <https://doi.org/10.1007/S10646-006-0112-2>
- Labbé, R. M., Irimia, M., Currie, K. W., Lin, A., Zhu, S. J., Brown, D. D. R., Ross, E. J., Voisin, V., Bader, G. D., Blencowe, B. J., & Pearson, B. J. (2012). A comparative transcriptomic analysis reveals conserved features of stem cell pluripotency in planarians and mammals. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(8), 1734–1745. <https://doi.org/10.1002/STEM.1144>
- Lahouel, A., Kebieche, M., Lakroun, Z., Rouabhi, R., Fetoui, H., Chtourou, Y., Djamila, Z., & Soulimani, R. (2016). Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19030–19040. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-6913-9/METRICS>
- Lapan, S. W., & Reddien, P. W. (2012). Transcriptome Analysis of the Planarian Eye Identifies ovo as a Specific Regulator of Eye Regeneration. *Cell Reports*, 2(2), 294–307. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2012.06.018>
- Legradi, J. B., Di Paolo, C., Kraak, M. H. S., van der Geest, H. G., Schymanski, E. L., Williams, A. J., Dingemans, M. M. L., Massei, R., Brack, W., Cousin, X., Begout, M. L., van der Oost, R., Carion, A., Suarez-Ulloa, V., Silvestre, F., Escher, B. I., Engwall, M., Nilén, G., Keiter, S. H., ... Hollert, H. (2018). An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. *Environmental Sciences Europe 2018 30:1*, 30(1), 1–34. <https://doi.org/10.1186/S12302->

018-0173-X

- Lein, P., Silbergeld, E., Locke, P., & Goldberg, A. M. (2005). In vitro and other alternative approaches to developmental neurotoxicity testing (DNT). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *19*(3), 735–744. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2004.12.035>
- Levin, E. D., Aschner, M., Heberlein, U., Ruden, D., Welsh-Bohmer, K. A., Bartlett, S., Berger, K., Chen, L., Corl, A. B., Eddins, D., French, R., Hayden, K. M., Helmcke, K., Hirsch, H. V. B., Linney, E., Lnenicka, G., Page, G. P., Possidente, D., Possidente, B., & Kirshner, A. (2009). Genetic aspects of behavioral neurotoxicology. *Neurotoxicology*, *30*(5), 741. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2009.07.014>
- Li, M. H. (2015). Effects of bisphenol A, two synthetic and a natural estrogens on head regeneration of the freshwater planarians, *Dugesia japonica*. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/02772248.2015.1007988>, *96*(8), 1174–1184. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1007988>
- Lillicrap, A., Belanger, S., Burden, N., Pasquier, D. Du, Embry, M. R., Halder, M., Lampi, M. A., Lee, L., Norberg-King, T., Rattner, B. A., Schirmer, K., & Thomas, P. (2016). Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: A review of developments over the last 2 decades and current status. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *35*(11), 2637–2646. <https://doi.org/10.1002/ETC.3603>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- MacRae, E. K. (1967). The fine structure of sensory receptor processes in the auricular epithelium of the planarian, *Dugesia tigrina*. *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)*, *82*(4), 479–494. <https://doi.org/10.1007/BF00337119>
- Malhotra, N., Chen, K. H. C., Huang, J. C., Lai, H. T., Uapipatanakul, B., Roldan, M. J. M., Macabeo, A. P. G., Ger, T. R., & Hsiao, C. Der. (2021). Physiological Effects of Neonicotinoid Insecticides on Non-Target Aquatic Animals—An Updated Review. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 9591*, *22*(17), 9591. <https://doi.org/10.3390/IJMS22179591>

- Mannini, L., Rossi, L., Deri, P., Gremigni, V., Salvetti, A., Saló, E., & Batistoni, R. (2004). Djeyes absent (Djeya) controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor Djsix-1. *Developmental Biology*, *269*(2), 346–359. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.042>
- Martinez, O., Sire, S., Saunier, A., Malgouyres, J.-M., Fournier, A., & Vignet, C. (2020). Behavioral responses of three freshwater planaria species to light, visual and olfactory stimuli: setting the stage for further ecotoxicological studies. *Behavioural Processes*, *183*, 104295. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104295>
- Martins, J., Oliva Teles, L., & Vasconcelos, V. (2007). Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, *33*(3), 414–425. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2006.12.006>
- März, M., Seebeck, F., & Bartscherer, K. (2013). A Pitx transcription factor controls the establishment and maintenance of the serotonergic lineage in planarians. *Development (Cambridge, England)*, *140*(22), 4499–4509. <https://doi.org/10.1242/DEV.100081>
- Mathiron, A. G. E., Rejo, L., Chapeau, F., Malgouyres, J.-M., Silvestre, F., & Vignet, C. (2023). Tools for photomotor response assay standardization in ecotoxicological studies: Example of exposure to gentamicin in the freshwater planaria *Schmidtea mediterranea*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *102*, 104242. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2023.104242>
- McKim, J. M. (1977). Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, *34*(8), 1148–1154. <https://doi.org/10.1139/F77-172>
- McVeigh, P., Kimber, M. J., Novozhilova, E., & Day, T. A. (2005). Neuropeptide signalling systems in flatworms. *Parasitology*, *131* Suppl(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0031182005008851>
- Melo, B. S., Ribeiro, F., Saraiva, A. S., da Silva Barbosa, R., de Jesus Ferreira, J. S., Melo, M. S., Rosa, L. P., Gravato, C., Soares, A. M. V. M., & Sarmiento, R. A. (2022). The multigenerational effects of clothianidin on *Chironomus xanthus*: Larvae exposed to this acetylcholine super agonist show no clear resistance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *245*, 114092. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.114092>

- Merryman, M. S., Sánchez Alvarado, A., & Jenkin, J. C. (2018). Culturing planarians in the laboratory. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1774, pp. 241–258). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_5
- Migula, P. J. (2005). Ecotoxicology, Invertebrate. *Encyclopedia of Toxicology*, 133–137. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00533-0>
- Mineta, K., Nakazawa, M., Cebrià, F., Ikeo, K., Agata, K., & Gojobori, T. (2003). Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7666–7671. https://doi.org/10.1073/PNAS.1332513100/SUPPL_FILE/2513TABLE4.XLS
- Miwa, J. M., Freedman, R., & Lester, H. A. (2011). Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses. *Neuron*, 70(1), 20–33. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2011.03.014>
- Molinaro, A. M., & Pearson, B. J. (2016). In silico lineage tracing through single cell transcriptomics identifies a neural stem cell population in planarians. *Genome Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-016-0937-9>
- Montgomery, J. R., & Coward, S. J. (1974). On the minimal size of a planarian capable of regeneration. *Transactions of the American Microscopical Society*, 93(3), 386–391. <https://doi.org/10.2307/3225439>
- Morgan, T. H. (1898). Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Archiv Für Entwicklungsmechanik Der Organismen*, 7(2–3), 364–397. <https://doi.org/10.1007/BF02161491/METRICS>
- Morita, M., & Best, J. B. (1984). Effects of photoperiods and melatonin on planarian asexual reproduction. *Journal of Experimental Zoology*, 231(2), 273–282. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1402310212>
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 74, 291–303. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.10.024>

- Mouche, I., Malésic, L., & Gillardeaux, O. (2017). FETAX assay for evaluation of developmental toxicity. *Methods in Molecular Biology*, 1641, 311–324. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_17
- Nagar, N., Saxena, H., Pathak, A., Mishra, A., & Poluri, K. M. (2023). A review on structural mechanisms of protein-persistent organic pollutant (POP) interactions. *Chemosphere*, 332, 138877. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138877>
- Nair, A., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Neumeyer, C. H., Gerlach, J. L., Ruggiero, K. M., & Covi, J. A. (2015). A novel model of early development in the brine shrimp, *Artemia franciscana*, and its use in assessing the effects of environmental variables on development, emergence, and hatching. *Journal of Morphology*, 276(3), 342–360. <https://doi.org/10.1002/JMOR.20344>
- Newmark, P. A., & Alvarado, A. S. (2002). Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nature Reviews. Genetics*, 3(3), 210–219. <https://doi.org/10.1038/NRG759>
- Nicolas, C. L., Abramson, C., & Levin, M. (2008). Analysis of Behavior in the Planarian Model. *Planaria: A Model for Drug Action and Abuse*, 95–106. <https://doi.org/10.1201/9781498713597-16>
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Sano, S., Yoshimoto, K., Inden, M., Takata, K., Taniguchi, T., Shimohama, S., & Agata, K. (2007). Reconstruction of dopaminergic neural network and locomotion function in planarian regenerates. *Developmental Neurobiology*, 67(8), 1059–1078. <https://doi.org/10.1002/DNEU.20377>
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Yoshimoto, K., Takeuchi, K., Taniguchi, T., & Agata, K. (2007). Identification and distribution of tryptophan hydroxylase (TPH)-positive neurons in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience Research*, 59(1), 101–106. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2007.05.014>
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Inoue, T., Umesono, Y., Yoshimoto, K., Taniguchi, T., & Agata, K. (2008). Characterization of tyramine beta-hydroxylase in planarian *Dugesia japonica*:

- cloning and expression. *Neurochemistry International*, 53(6–8), 184–192.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2008.09.006>
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Taniguchi, T., & Agata, K. (2010). Analysis of motor function modulated by cholinergic neurons in planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience*, 168(1), 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.038>
- Nishimura, K., Kitamura, Y., Umesono, Y., Takeuchi, K., Takata, K., Taniguchi, T., & Agata, K. (2008). Identification of glutamic acid decarboxylase gene and distribution of GABAergic nervous system in the planarian *Dugesia japonica*. *Neuroscience*, 153(4), 1103–1114. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2008.03.026>
- Norberg-King, T. J. (1989). An evaluation of the fathead minnow seven-day subchronic test for estimating chronic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(11), 1075–1089. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620081113>
- Noreña, C., Damborenea, C., & Brusa, F. (2015). Phylum Platyhelminthes. *Thorpe and Covich's Freshwater Invertebrates: Ecology and General Biology: Fourth Edition*, 1, 181–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385026-3.00010-3>
- OCDE 210. (2013). *Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test*. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264203785-en>
- OCDE 231. (2009). *Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay*. <https://doi.org/10.1787/9789264076242-EN>
- OCDE 236. (2013). *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- OCDE 241. (2015). *Test No. 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)*. <https://doi.org/10.1787/9789264242340-EN>
- OCDE 249. (2021). *Test No. 249: Fish Cell Line Acute Toxicity - The RTgill-W1 cell line assay*. <https://doi.org/10.1787/C66D5190-EN>
- Okamoto, K., Takeuchi, K., & Agata, K. (2005). Neural projections in planarian brain revealed by fluorescent dye tracing. *Zoological Science*, 22(5), 535–546. <https://doi.org/10.2108/ZSJ.22.535>

- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., & Heller, A. (2000). Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(1), 56–67. <https://doi.org/10.1006/RTPH.2000.1399>
- Oropesa, A. L., Floro, A. M., & Palma, P. (2017). Toxic potential of the emerging contaminant nicotine to the aquatic ecosystem. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(20), 16605–16616. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-9084-4>
- Pagán, O. R. (2014). *The first brain : the neuroscience of planarians*. Oxford University Press. <https://global.oup.com/academic/product/the-first-brain-9780199965045>
- Pagán, O. R., Deats, S., Baker, D., Montgomery, E., Wilk, G., Tenaglia, M., & Semon, J. (2013). Planarians require an intact brain to behaviorally react to cocaine, but not to react to nicotine. *Neuroscience*, 246, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.05.010>
- Pagán, Oné R., Baker, D., Deats, S., Montgomery, E., Tenaglia, M., Randolph, C., Kotturu, D., Tallarida, C., Bach, D., Wilk, G., Rawls, S. M., & Raffa, R. B. (2012). Planarians in pharmacology: parthenolide is a specific behavioral antagonist of cocaine in the planarian *Girardia tigrina*. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(1–2–3), 193–196. <https://doi.org/10.1387/IJDB.113486OP>
- Pagán, Oné R., Montgomery, E., Deats, S., Bach, D., & Baker, D. (2015). Evidence of Nicotine-Induced, Curare-Insensitive, Behavior in Planarians. *Neurochemical Research*, 40(10), 2087–2090. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1512-6>
- Pagán, Oné R., Rowlands, A. L., Fattore, A. L., Coudron, T., Urban, K. R., Bidja, A. H., & Eterović, V. A. (2009). A cembranoid from tobacco prevents the expression of nicotine-induced withdrawal behavior in planarian worms. *European Journal of Pharmacology*, 615(1–3), 118–124. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2009.05.022>
- Palladini, G., Ruggeri, S., Stocchi, F., De Pandis, M. F., Venturini, G., & Margotta, V. (1996). A pharmacological study of cocaine activity in planaria. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 115(1), 41–45. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(96\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(96)00053-9)

- Passarelli, F., Merante, A., Pontieri, F. E., Margotta, V., Venturini, G., & Palladini, G. (1999). Opioid–dopamine interaction in planaria: a behavioral study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *124*(1), 51–55. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00048-1)
- Persoone, G., Baudo, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, K. C., Moreira-Santos, M., Vollat, B., Törökne, A., & Han, T. (2009). Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, *393*(393), 01. <https://doi.org/10.1051/KMAE/2009012>
- Pestana, J. L. T., & Ofoegbu, P. U. (2021). Ecotoxicity Assays Using Freshwater Planarians. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 2240, pp. 125–137). Methods Mol Biol. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1091-6_11
- Petersen, C. P., & Reddien, P. W. (2009). A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(40), 17061–17066. https://doi.org/10.1073/PNAS.0906823106/SUPPL_FILE/0906823106SI.PDF
- Pierce Wise, J., & Pérez, A. (2018). One Environmental Health: An emerging perspective in toxicology [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, *7*. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.14233.1/DOI>
- Pineda, D., Gonzalez, J., Callaerts, P., Ikeo, K., Gehring, W. J., & Salo, E. (2000). Searching for the prototypic eye genetic network: *Sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(9), 4525–4529. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.9.4525>
- Poirier, L., Ghigo, É., Daudé, D., & Chabrière, É. (2019). Modèles alternatifs (6). *Médecine/Sciences*, *35*(6–7), 544–548. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019110>
- Polli, J. R., Dobbins, D. L., Kobet, R. A., Farwell, M. A., Zhang, B., Lee, M. H., & Pan, X. (2015). Drug-dependent behaviors and nicotinic acetylcholine receptor expressions in *Caenorhabditis elegans* following chronic nicotine exposure. *NeuroToxicology*, *47*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2014.12.005>

- Prá, D., Lau, A. H., Knakiewicz, T., Carneiro, F. R., & Erdtmann, B. (2005). Environmental genotoxicity assessment of an urban stream using freshwater planarians. *Mutation Research*, 585(1–2), 79–85. <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2005.04.002>
- Raffa, R. B., Baron, S., Bhandal, J. S., Brown, T., Song, K., Tallarida, C. S., & Rawls, S. M. (2013). Opioid receptor types involved in the development of nicotine physical dependence in an invertebrate (Planaria) model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 112, 9–14. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2013.09.012>
- Raffa, R. B., Holland, L. J., & Schulingkamp, R. J. (2001). Quantitative assessment of dopamine D2 antagonist activity using invertebrate (Planaria) locomotion as a functional endpoint. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 45(3), 223–226. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(01\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(01)00152-6)
- Ramakrishnan, L., & Desaer, C. (2011). Carbamazepine inhibits distinct chemoconvulsant-induced seizure-like activity in *Dugesia tigrina*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(4), 665–670. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.06.003>
- Rauthan, M., Gong, J., Liu, J., Li, Z., Wescott, S. A., Liu, J., & Xu, X. Z. S. (2017). MicroRNA Regulation of nAChR Expression and Nicotine-Dependent Behavior in *C. elegans*. *Cell Reports*, 21(6), 1434–1441. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.043>
- Rawls, S. M., Patil, T., Tallarida, C. S., Baron, S., Kim, M., Song, K., Ward, S., & Raffa, R. B. (2011). Nicotine behavioral pharmacology: clues from planarians. *Drug and Alcohol Dependence*, 118(2–3), 274–279. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2011.04.001>
- Reddien, P. W. (2018). The cellular and molecular basis for planarian regeneration. *Cell*, 175(2), 327. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.09.021>
- Reddien, P. W., & Sánchez Alvarado, A. (2004). FUNDAMENTALS OF PLANARIAN REGENERATION. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Cellbio.20.010403.095114>, 20, 725–757. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.20.010403.095114>
- Reho, G., Lelièvre, V., & Cadiou, H. (2022). Planarian nociception: Lessons from a scrunching flatworm. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 935918. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.935918/BIBTEX>

- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, *11*(6), 1114–1125. <https://doi.org/10.1101/GR.169101>
- Rejo, L., Malgouyres, J.-M., Bonnafé, E., & Vignet, C. (2023). Optimization and calibration of behavioural tests on different species of planaria for ecotoxicological studies. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *101*(June), 104189. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104189>
- Reuter, M., Gustafsson, M. K. S., Sheiman, I. M., Terenina, N., Halton, D. W., Maule, A. G., & Shaw, C. (1995). The nervous system of Tricladida. II. Neuroanatomy of *Dugesia tigrina* (Paludicola, Dugesiidae): an immunocytochemical study. *Invertebrate Neuroscience : IN*, *1*(2), 133–143. <https://doi.org/10.1007/BF02331911>
- Reynoldson, T. B., & Pearce, B. (2009). Predation on snails by three species of triclad and its bearing on the distribution of *Planaria torva* in Britain. *Journal of Zoology*, *189*(4), 459–484. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7998.1979.TB03974.X>
- Robb, S. M. C., Ross, E., & Alvarado, A. S. (2008). SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database. *Nucleic Acids Research*, *36*(suppl_1), D599–D606. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM684>
- Roberts-Galbraith, R. H., & Newmark, P. A. (2013). Follistatin antagonizes activin signaling and acts with notum to direct planarian head regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(4), 1363–1368. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1214053110>
- Rodrigues, A. C. M., Henriques, J. F., Domingues, I., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A. M. V. M., & Pestana, J. L. T. (2016). Behavioural responses of freshwater planarians after short-term exposure to the insecticide chlorantraniliprole. *Aquatic Toxicology*, *170*, 371–376. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2015.10.018>
- Rompolas, P., Patel-King, R. S., & King, S. M. (2010). An Outer Arm Dynein Conformational Switch Is Required for Metachronal Synchrony of Motile Cilia in Planaria. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(21), 3669. <https://doi.org/10.1091/MBC.E10-04-0373>
- Rondeau, G., Sánchez-Bayo, F., Tennekes, H. A., Decourtye, A., Ramírez-Romero, R., &

- Desneux, N. (2014). Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/SREP05566>
- Ross, K. G., Currie, K. W., Pearson, B. J., & Zayas, R. M. (2017). Nervous system development and regeneration in freshwater planarians. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(3), e266. <https://doi.org/10.1002/wdev.266>
- Ross, K. G., Molinaro, A. M., Romero, C., Dockter, B., Cable, K. L., Gonzalez, K., Zhang, S., Collins, E. S., Pearson, B. J., & Zayas, R. M. (2018). SoxB1 Activity Regulates Sensory Neuron Regeneration, Maintenance, and Function in Planarians. *Developmental Cell*, 47(3), 331-347.e5. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2018.10.014>
- Ross, K. G., Omuro, K. C., Taylor, M. R., Munday, R. K., Hubert, A., King, R. S., & Zayas, R. M. (2015). Novel monoclonal antibodies to study tissue regeneration in planarians. *BMC Developmental Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12861-014-0050-9>
- Rozanski, A., Moon, H. K., Brandl, H., Martín-Durán, J. M., Grohme, M. A., Hüttner, K., Bartscherer, K., Henry, I., & Rink, J. C. (2019). PlanMine 3.0—improvements to a mineable resource of flatworm biology and biodiversity. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D812–D820. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY1070>
- Rubnov, S., Levy, D., & Schneider, H. (1999). Liquid chromatographic analysis of physostigmine salicylate and its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(6), 939–945. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00099-5)
- Ruebhart, D. R., Cock, I. E., & Shaw, G. R. (2008). Brine shrimp bioassay: Importance of correct taxonomic identification of *Artemia* (Anostraca) species. *Environmental Toxicology*, 23(4), 555–560. <https://doi.org/10.1002/TOX.20358>
- Saad, A. Ben, Rjeibi, I., Brahmi, N., Elaloui, E., & Zouari, N. (2020). Nicotine-induced oxidative stress, testis injury, AChE inhibition and brain damage alleviated by *Mentha spicata*. *Inflammopharmacology*, 28(4), 939–948. <https://doi.org/10.1007/S10787-019-00650-0/METRICS>
- Saberi, A., Jamal, A., Beets, I., Schoofs, L., & Newmark, P. A. (2016). GPCRs Direct Germline Development and Somatic Gonad Function in Planarians. *PLoS Biology*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1002457>

- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M. N., Ismail, S., & Mansor, S. M. (2010). Brine shrimp lethality and acute oral toxicity studies on *Swietenia mahagoni* (Linn.) Jacq. seed methanolic extract. *Pharmacognosy Research*, 2(4), 215–220. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.69107>
- Sakurai, T., Lee, H., Kashima, M., Saito, Y., Hayashi, T., Kudome-Takamatsu, T., Nishimura, O., Agata, K., & Shibata, N. (2012). The planarian P2X homolog in the regulation of asexual reproduction. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(1–3), 173–182. <https://doi.org/10.1387/IJDB.113439TS>
- Sal, F., Prados, J., & Urcelay, G. P. (2021). Nicotine chronic tolerance development and withdrawal in the planaria (*Schmidtea mediterranea*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 200, 173075. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173075>
- Saló, E., & Agata, K. (2012). Planarian regeneration: a classic topic claiming new attention. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(1-2–3), 1–4. <https://doi.org/10.1387/IJDB.123495ES>
- Sandmann, T., Vogg, M. C., Owlarn, S., Boutros, M., & Bartscherer, K. (2011). The head-regeneration transcriptome of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Genome Biology*, 12(8). <https://doi.org/10.1186/GB-2011-12-8-R76>
- Sarnat, H. B., & Netsky, M. G. (2002). When does a ganglion become a brain? Evolutionary origin of the central nervous system. *Seminars in Pediatric Neurology*, 9(4), 240–253. <https://doi.org/10.1053/SPEN.2002.32502>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2019>
- Schmidt-Rhaesa, A., Harzsch, S., & Purschke, G. (2015). Introduction. *Structure and Evolution of Invertebrate Nervous Systems*, 1–3. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780199682201.003.0001>
- Sébillot, A., Dandimopoulou, P., Ogino, Y., Spirhantzlova, P., Miyagawa, S., Du Pasquier, D.,

- Mouatassim, N., Iguchi, T., Lemkine, G. F., Demeneix, B. A., & Tindall, A. J. (2014). Rapid fluorescent detection of (anti)androgens with spiggin-gfp medaka. *Environmental Science & Technology*, 48(18), 10919–10928. <https://doi.org/10.1021/ES5030977>
- Shimoyama, S., Inoue, T., Kashima, M., & Agata, K. (2016). Multiple Neuropeptide-Coding Genes Involved in Planarian Pharynx Extension. *Https://Doi.Org/10.2108/Zs150170*, 33(3), 311–319. <https://doi.org/10.2108/ZS150170>
- Shomrat, T., & Levin, M. (2013). An automated training paradigm reveals long-term memory in planarians and its persistence through head regeneration. *The Journal of Experimental Biology*, 216(Pt 20), 3799–3810. <https://doi.org/10.1242/JEB.087809>
- Sluys, R., & Riutort, M. (2018). Planarian Diversity and Phylogeny. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1774, 1–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_1
- Spirhanzlova, P., Leleu, M., Sébillot, A., Lemkine, G. F., Iguchi, T., Demeneix, B. A., & Tindall, A. J. (2016). Oestrogen reporter transgenic medaka for non-invasive evaluation of aromatase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 179, 64–71. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2015.08.011>
- Stevens, A. S., Pirotte, N., Plusquin, M., Willems, M., Neyens, T., Artois, T., & Smeets, K. (2015). Toxicity profiles and solvent–toxicant interference in the planarian *Schmidtea mediterranea* after dimethylsulfoxide (DMSO) exposure. *Journal of Applied Toxicology*, 35(3), 319–326. <https://doi.org/10.1002/JAT.3011>
- Stinson, S. A., Hasenbein, S., Connon, R. E., Deng, X., Alejo, J. S., Lawler, S. P., & Holland, E. B. (2022). Agricultural surface water, imidacloprid, and chlorantraniliprole result in altered gene expression and receptor activation in *Pimephales promelas*. *The Science of the Total Environment*, 806(Pt 4), 150920. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.150920>
- Stocchino, G. A., & Manconi, R. (2013). Italian Journal of Zoology Overview of life cycles in model species of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes: Tricladida) Overview of life cycles in model species of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes: Tricladida). *Italian Journal of Zoology*, 80(3), 319–328. <https://doi.org/10.1080/11250003.2013.822025>
- Stocchino, G. A., Sluys, R., Harrath, A. H., Mansour, L., & Manconi, R. (2019). The invasive

- alien freshwater flatworm *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Platyhelminthes, Tricladida) in Western Europe: new insights into its morphology, karyology and reproductive biology. *Contributions to Zoology*, 88(2), 236–256. <https://doi.org/10.1163/18759866-20191406>
- Stowell, N. C., Goel, T., Shetty, V., Noveral, J., & Collins, E. S. (2021). Quantifying Planarian Behavior as an Introduction to Object Tracking and Signal Processing. *The Biophysicist*. <https://doi.org/10.35459/tbp.2020.000159>
- Strange, K. (2007). Revisiting the Krogh Principle in the post-genome era: *Caenorhabditis elegans* as a model system for integrative physiology research. *Journal of Experimental Biology*, 210(9), 1622–1631. <https://doi.org/10.1242/JEB.000125>
- Sugimoto, T. (2010). A Theory for Ciliary Gliding in Freshwater Planarians. *Journal of Aero Aqua Bio-Mechanisms*, 1(1), 57–63. <https://doi.org/10.5226/JABMECH.1.57>
- Talbot, J., & Schötz, E. M. (2011). Quantitative characterization of planarian wild-type behavior as a platform for screening locomotion phenotypes. *The Journal of Experimental Biology*, 214(Pt 7), 1063–1067. <https://doi.org/10.1242/JEB.052290>
- Tallarida, C. S., Bires, K., Avershal, J., Tallarida, R. J., Seo, S., & Rawls, S. M. (2014). Ethanol and cocaine: Environmental place conditioning, stereotypy, and synergism in planarians. *Alcohol*, 48(6), 579–586. <https://doi.org/10.1016/J.ALCOHOL.2014.07.006>
- Tazaki, A., Gaudieri, S., Ikeo, K., Gojobori, T., Watanabe, K., & Agata, K. (1999). Neural network in planarian revealed by an antibody against planarian synaptotagmin homologue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(2), 426–432. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1999.0933>
- Thi-Kim Vu, H., Rink, J. C., McKinney, S. A., McClain, M., Lakshmanaperumal, N., Alexander, R., & Alvarado, A. S. (2015). Stem cells and fluid flow drive cyst formation in an invertebrate excretory organ. *ELife*, 4(JUNE2015). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.07405>
- Torre, C., & Ghigo, E. (2015). La planaire : un ver immortel pour élucider la réponse immunitaire de l'homme. *Médecine/Sciences*, 31(1), 20–22. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/20153101006>

- Udvardi, M. K., Czechowski, T., & Scheible, W. R. (2008). Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, *20*(7), 1736–1737. <https://doi.org/10.1105/TPC.108.061143>
- Umesono, Y., & Agata, K. (2009). Evolution and regeneration of the planarian central nervous system. *Development, Growth & Differentiation*, *51*(3), 185–195. <https://doi.org/10.1111/J.1440-169X.2009.01099.X>
- Umesono, Y., Tasaki, J., Nishimura, Y., Hrouda, M., Kawaguchi, E., Yazawa, S., Nishimura, O., Hosoda, K., Inoue, T., & Agata, K. (2013). The molecular logic for planarian regeneration along the anterior-posterior axis. *Nature*, *500*(7460), 73–76. <https://doi.org/10.1038/NATURE12359>
- Umesono, Y., Watanabe, K., & Agata, K. (1999). Distinct structural domains in the planarian brain defined by the expression of evolutionarily conserved homeobox genes. *Development Genes and Evolution*, *209*(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/S004270050224>
- Van Huizen, A. V., Tseng, A. S., & Beane, W. S. (2017). Methylisothiazolinone toxicity and inhibition of wound healing and regeneration in planaria. *Aquatic Toxicology*, *191*, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.013>
- Venturini, G., Stocchi, F., Margotta, V., Ruggieri, S., Bravi, D., Bellantuono, P., & Palladini, G. (1989). A pharmacological study of dopaminergic receptors in planaria. *Neuropharmacology*, *28*(12), 1377–1382. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(89\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0028-3908(89)90013-0)
- Vignet, C., Bégout, M. L., Péan, S., Lyphout, L., Leguay, D., & Cousin, X. (2013). Systematic Screening of Behavioral Responses in Two Zebrafish Strains. *Https://Home.Liebertpub.Com/Zeb*, *10*(3), 365–375. <https://doi.org/10.1089/ZEB.2013.0871>
- Vignet, C., Cappello, T., Fu, Q., Lajoie, K., De Marco, G., Clérandeau, C., Mottaz, H., Maisano, M., Hollender, J., Schirmer, K., & Cachot, J. (2019). Imidacloprid induces adverse effects on fish early life stages that are more severe in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) than in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, *225*, 470–478. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.03.002>

- Vila-Farré, M., & Rink, J. C. (2018). The ecology of freshwater planarians. *Methods in Molecular Biology*, 1774, 173–205. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1_3/COVER
- Wagner, D. E., Ho, J. J., & Reddien, P. W. (2012). Genetic regulators of a pluripotent adult stem cell system in planarians identified by RNAi and clonal analysis. *Cell Stem Cell*, 10(3), 299–311. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.01.016>
- Wählby, C., Kamentsky, L., Liu, Z. H., Riklin-Raviv, T., Conery, A. L., O'Rourke, E. J., Sokolnicki, K. L., Visvikis, O., Ljosa, V., Irazoqui, J. E., Golland, P., Ruvkun, G., Ausubel, F. M., & Carpenter, A. E. (2012). An image analysis toolbox for high-throughput *C. elegans* assays. *Nature Methods*, 9(7), 714–716. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1984>
- Waller, W. T., & Allen, H. J. (2008). Acute and Chronic Toxicity. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*, 32–43. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00368-2>
- Wang, I. E., Lapan, S. W., Scimone, M. L., Clandinin, T. R., & Reddien, P. W. (2016). Hedgehog signaling regulates gene expression in planarian glia. *ELife*, 5(September2016). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.16996>
- Wang, Z., Walker, G. W., Muir, D. C. G., & Nagatani-Yoshida, K. (2020). Toward a Global Understanding of Chemical Pollution: A First Comprehensive Analysis of National and Regional Chemical Inventories. *Environmental Science and Technology*, 54(5), 2575–2584. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.9B06379/ASSET/IMAGES/LARGE/ES9B06379_0002.JPEG
- Wheeler, N. J., Agbedanu, P. N., Kimber, M. J., Ribeiro, P., Day, T. A., & Zamanian, M. (2015). Functional analysis of *Girardia tigrina* transcriptome seeds pipeline for anthelmintic target discovery. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13071-014-0622-3/FIGURES/6>
- Wilson, M. P., & Schwarzman, M. R. (2009). Toward a New U.S. Chemicals Policy: Rebuilding the Foundation to Advance New Science, Green Chemistry, and Environmental Health. *Environmental Health Perspectives*, 117(8), 1202. <https://doi.org/10.1289/EHP.0800404>

- Wilson, W. W., Shapiro, L. P., Bradner, J. M., & Caudle, W. M. (2014). Developmental exposure to the organochlorine insecticide endosulfan damages the nigrostriatal dopamine system in male offspring. *NeuroToxicology*, *44*, 279–287. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2014.07.008>
- Wright, J. F. (1974). Some factors affecting the distribution of *Crenobia alpina* (Dana), *Polycelis felina* (Dalyell) and *Phagocata vitta* (Dugès) (Platyhelminthes) in Caernarvonshire, North Wales. *Freshwater Biology*, *4*(1), 31–59. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2427.1974.TB00938.X>
- Wu, J. P., Lee, H. L., & Li, M. H. (2014). Cadmium neurotoxicity to a freshwater planarian. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *67*(4), 639–650. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0056-0>
- Wu, J. P., & Li, M. H. (2015). Inhibitory effects of pain relief drugs on neurological enzymes: implications on their potential neurotoxicity to aquatic animals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *39*(2), 898–905. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2015.02.022>
- Wu, J. P., & Li, M. H. (2018). The use of freshwater planarians in environmental toxicology studies: Advantages and potential. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 161, pp. 45–56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.057>
- Xuezhu, H., Hongbo, L., Yaru, H., Fuwen, L., Sen, L., Qiang, L., & Kuangfei, L. (2018). Neurotoxicity of two neonicotinoid insecticides to *Caenorhabditis elegans*. *Asian Journal of Ecotoxicology*, *13*(5), 235–241.
- Yaffe, H., Buxdorf, K., Shapira, I., Ein-Gedi, S., Moyal-Ben Zvi, M., Fridman, E., Moshelion, M., & Levy, M. (2012). LogSpin: A simple, economical and fast method for RNA isolation from infected or healthy plants and other eukaryotic tissues. *BMC Research Notes*, *5*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-45/FIGURES/3>
- Zewde, A. M., Yu, F., Nayak, S., Tallarida, C., Reitz, A. B., Kirby, L. G., & Rawls, S. M. (2018). PLDT (planarian light/dark test): an invertebrate assay to quantify defensive responding and study anxiety-like effects. *Journal of Neuroscience Methods*, *293*, 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.10.010>
- Zhan, M., Crane, M. M., Entchev, E. V., Caballero, A., Fernandes de Abreu, D. A., Ch'ng, Q.

- L., & Lu, H. (2015). Automated Processing of Imaging Data through Multi-tiered Classification of Biological Structures Illustrated Using *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Computational Biology*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1004194>
- Zhang, H. C., Shi, C. Y., Sun, L. Q., Wang, F., & Chen, G. W. (2015). Toxic effects of ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant defense system of freshwater planarian, *Dugesia japonica*. <Http://Dx.Doi.Org/10.1177/0748233715573692>, *32*(9), 1675–1683. <https://doi.org/10.1177/0748233715573692>
- Zhang, J. G., Ma, D. D., Xiong, Q., Qiu, S. Q., Huang, G. Y., Shi, W. J., & Ying, G. G. (2021). Imidacloprid and thiamethoxam affect synaptic transmission in zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *227*, 112917. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112917>
- Zhang, S., Hagstrom, D., Hayes, P., Graham, A., & Collins, E. S. (2019). Multi-Behavioral Endpoint Testing of an 87-Chemical Compound Library in Freshwater Planarians. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, *167*(1), 105–115. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFY145>
- Zon, L. I., & Peterson, R. T. (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Drug Discovery* *2005 4:1*, *4*(1), 35–44. <https://doi.org/10.1038/nrd1606>

Annexes

Supplementary information – Article 1

Tools for photomotor response assay standardization in ecotoxicological studies:
example of exposure to gentamicin in the freshwater planaria *Schmidtea
mediterranea*

Anthony G.E. Mathiron, Lucia Rejo, Florian Chapeau, Jean-Michel Malgouyres, Frédéric
Silvestre and Caroline Vignet

1. Data importation

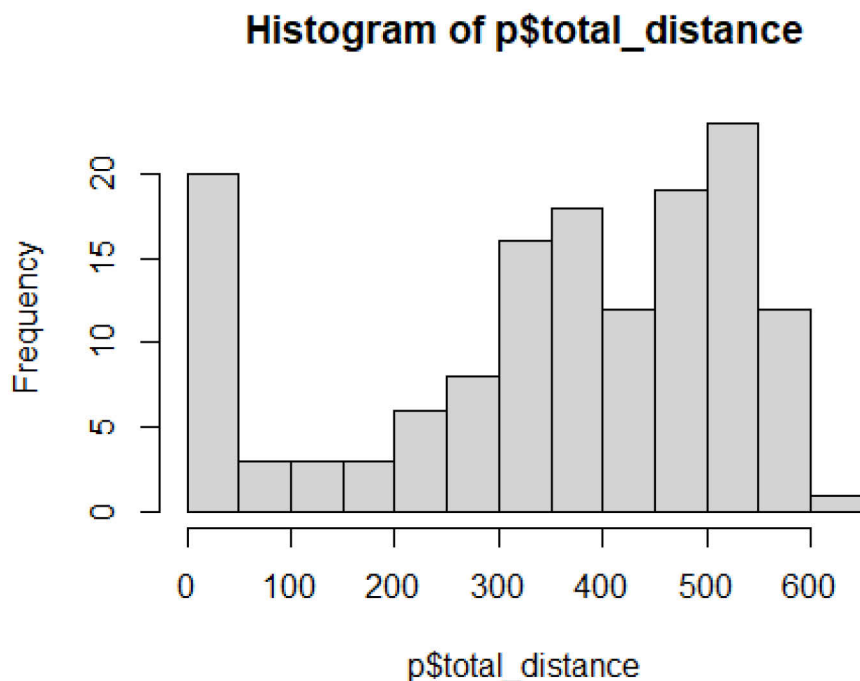
```
p<-read.table("planaria_gentamicin_pra.txt",sep="\t",header=T)
```

2. Change explanatory variables into factor

```
p$ind_id<-as.factor(p$ind_id)  
p$treatment<-as.factor(p$treatment)  
p$condition<-as.factor(p$condition)
```

3. Distribution of response variable: total distance

```
hist(p$total_distance) #distribution of total distance variable
```



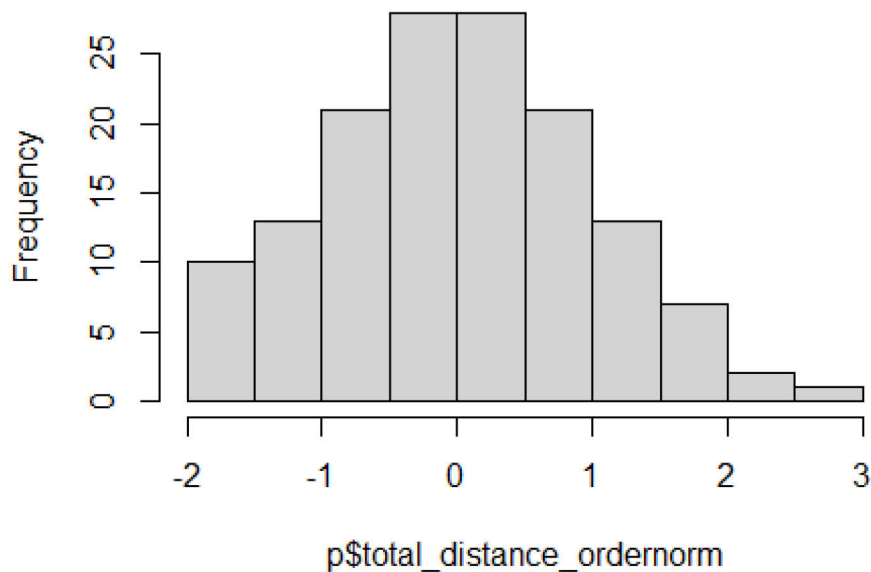
```
shapiro.test(p$total_distance) # no distribution normality
```

```
##  
## Shapiro-Wilk normality test  
##  
## data: p$total_distance  
## W = 0.90518, p-value = 4.342e-08
```

4. Transforming total distance to fit normal distribution

```
library(bestNormalize) # to find best data transformation  
bestNormalize(p$total_distance) #orderNorm is the best transformation  
  
## Best Normalizing transformation with 144 Observations  
## Estimated Normality Statistics (Pearson P / df, lower => more normal):  
## - arcsinh(x): 6.5512  
## - Center+scale: 1.8301  
## - Exp(x): 4.8  
## - Log_b(x+a): 8.4442  
## - orderNorm (ORQ): 1.2811  
## - sqrt(x + a): 3.7764  
## - Yeo-Johnson: 2.3208  
## Estimation method: Out-of-sample via CV with 10 folds and 5 repeats  
##  
## Based off these, bestNormalize chose:  
## orderNorm Transformation with 144 nonmissing obs and ties  
## - 137 unique values  
## - Original quantiles:  
##    0%    25%    50%    75%    100%  
## 0.000 257.458 377.288 499.878 620.052  
  
orderNorm_dist<-orderNorm(p$total_distance, warn=F) #create an object  
encompassing orderNorm transformation  
p$total_distance_ordernorm<-predict(orderNorm_dist) #create new variable  
encompassing transformed data  
  
hist(p$total_distance_ordernorm) # distribution of total distance  
(orderNorm-transformed)
```

Histogram of p\$total_distance_ordernorm



```
shapiro.test(p$total_distance_ordernorm) # normally distributed
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  p$total_distance_ordernorm
## W = 0.99143, p-value = 0.5339
```

5. Testing model with all explanatory variables and interaction

```
library(lme4) # to use Linear mixed models
## Le chargement a nécessité le package : Matrix
model<-lmer(total_distance_ordernorm~condition
            +treatment
            +condition:treatment
            +(1|ind_id)
            ,data=p
            ,REML=T)

library(car) #to use 'Anova' function
## Le chargement a nécessité le package : carData
Anova(model,test="Chisq") # significant effect of interaction between
Light/dark condition and gentamicin treatment
## Analysis of Deviance Table (Type II Wald chisquare tests)
##
## Response: total_distance_ordernorm
##              Chisq Df Pr(>Chisq)
```

```
## condition          22.0359  3  6.412e-05 ***
## treatment          4.2613  2   0.11876
## condition:treatment 15.7849  6   0.01496 *
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

library(lmerTest) #to use 'ranova' function

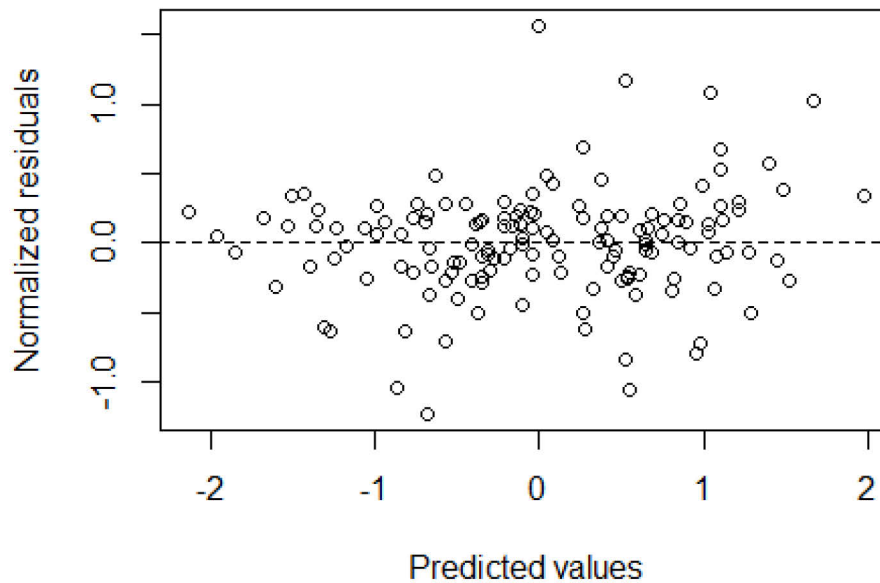
##
## Attachement du package : 'lmerTest'
## L'objet suivant est masqué depuis 'package:lme4':
##
##      lmer
## L'objet suivant est masqué depuis 'package:stats':
##
##      step

ranova(model) # significant effect of random factor (ind_id)
## ANOVA-like table for random-effects: Single term deletions
##
## Model:
## total_distance_ordernorm ~ condition + treatment + (1 | ind_id) +
condition:treatment
##           npar  logLik    AIC    LRT Df Pr(>Chisq)
## <none>         14 -143.99 315.98
## (1 | ind_id)   13 -194.97 415.93 101.95  1 < 2.2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

6. Model validation

6.1. Check for homogeneity of variance: residuals vs predicted values

```
plot(resid(model)~fitted(model), xlab="Predicted values", ylab="Normalized
residuals")+ abline(h=0, lty=2) #homogeneity of variance
```



```
## integer(0)
```

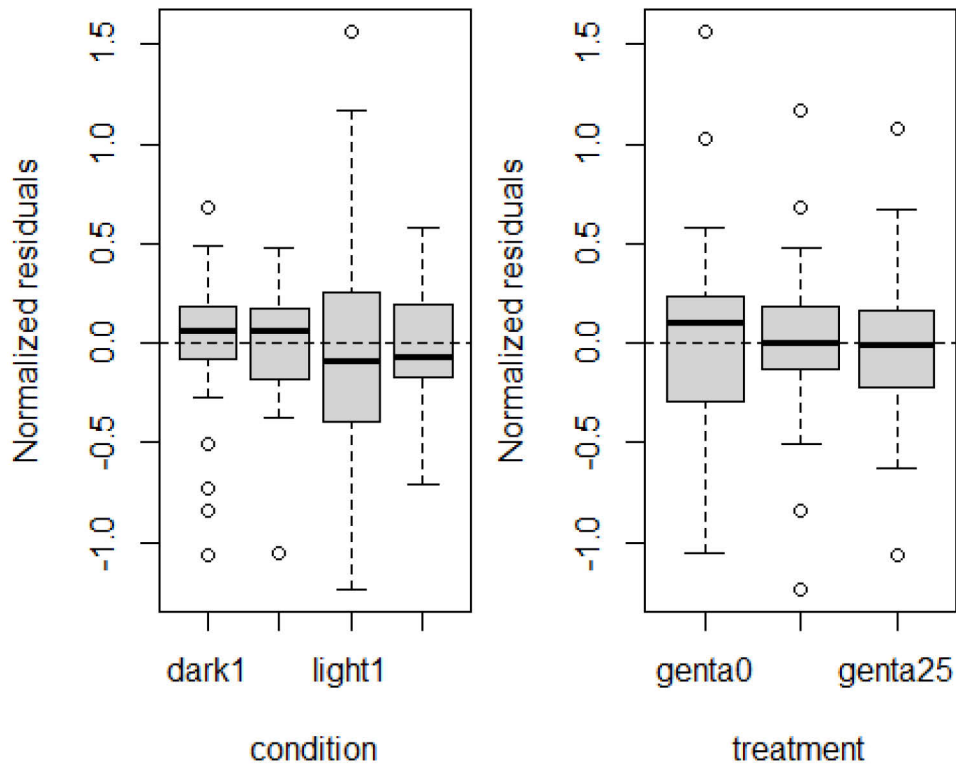
6.2. Check for independence of residuals versus individual explanatory variables

```
par(mfrow=c(1,2), mar=c(4,4,.5,.5))
```

```
plot(resid(model)~p$condition, xlab="condition", ylab="Normalized  
residuals")+ abline(h=0, lty=2) #independence of residuals
```

```
## integer(0)
```

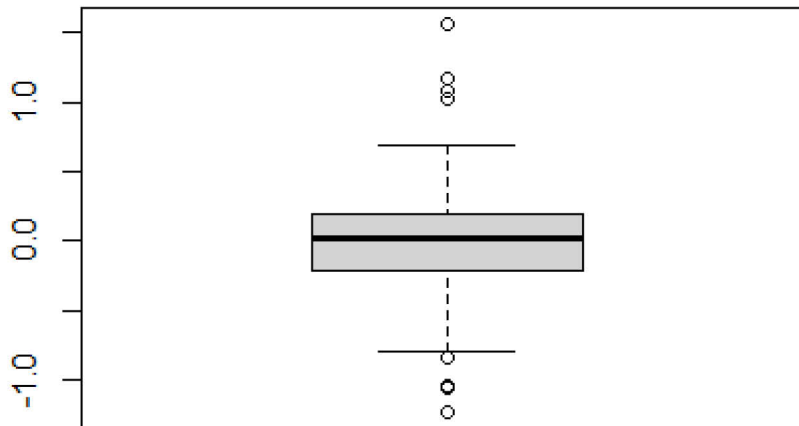
```
plot(resid(model)~p$treatment, xlab="treatment", ylab="Normalized  
residuals")+  
  abline(h=0, lty=2) #independence of residuals
```



```
## integer(0)
dev.off()
## null device
##      1
```

6.3. Check for normality of residuals

```
boxplot(resid(model)) #we assume that residuals are normally distributed
```



7. Post hoc pairwise tests

```
library(emmeans) #to use 'emmeans' function for post hoc test
emmeans(model, pairwise~condition|treatment)
```

```
## $emmeans
## treatment = genta0:
## condition emmean SE df lower.CL upper.CL
## dark1 -0.5703 0.273 48.3 -1.1196 -0.0209
## dark2 -0.7435 0.273 48.3 -1.2928 -0.1941
## light1 0.1200 0.273 48.3 -0.4293 0.6693
## light2 -0.4540 0.273 48.3 -1.0033 0.0954
##
## treatment = genta12.5:
## condition emmean SE df lower.CL upper.CL
## dark1 0.1425 0.273 48.3 -0.4068 0.6918
## dark2 0.1960 0.273 48.3 -0.3533 0.7453
## light1 0.1439 0.273 48.3 -0.4055 0.6932
## light2 0.3746 0.273 48.3 -0.1747 0.9240
##
## treatment = genta25:
## condition emmean SE df lower.CL upper.CL
## dark1 -0.0206 0.273 48.3 -0.5700 0.5287
## dark2 -0.0248 0.273 48.3 -0.5742 0.5245
## light1 0.4692 0.273 48.3 -0.0802 1.0185
## light2 0.4279 0.273 48.3 -0.1214 0.9773
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95
```



```
##
## $contrasts
## treatment = genta0:
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## dark1 - dark2   0.17320 0.189 99   0.914 0.7973
## dark1 - light1 -0.69025 0.189 99  -3.643 0.0024
## dark1 - light2 -0.11631 0.189 99  -0.614 0.9274
## dark2 - light1 -0.86345 0.189 99  -4.557 0.0001
## dark2 - light2 -0.28951 0.189 99  -1.528 0.4248
## light1 - light2  0.57394 0.189 99   3.029 0.0163
##
## treatment = genta12.5:
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## dark1 - dark2  -0.05349 0.189 99  -0.282 0.9921
## dark1 - light1 -0.00136 0.189 99  -0.007 1.0000
## dark1 - light2 -0.23212 0.189 99  -1.225 0.6125
## dark2 - light1  0.05213 0.189 99   0.275 0.9927
## dark2 - light2 -0.17862 0.189 99  -0.943 0.7819
## light1 - light2 -0.23076 0.189 99  -1.218 0.6170
##
## treatment = genta25:
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## dark1 - dark2   0.00421 0.189 99   0.022 1.0000
## dark1 - light1 -0.48980 0.189 99  -2.585 0.0536
## dark1 - light2 -0.44854 0.189 99  -2.367 0.0902
## dark2 - light1 -0.49402 0.189 99  -2.607 0.0507
## dark2 - light2 -0.45276 0.189 99  -2.390 0.0857
## light1 - light2  0.04126 0.189 99   0.218 0.9963
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimate
```

Supplementary information – Article 2

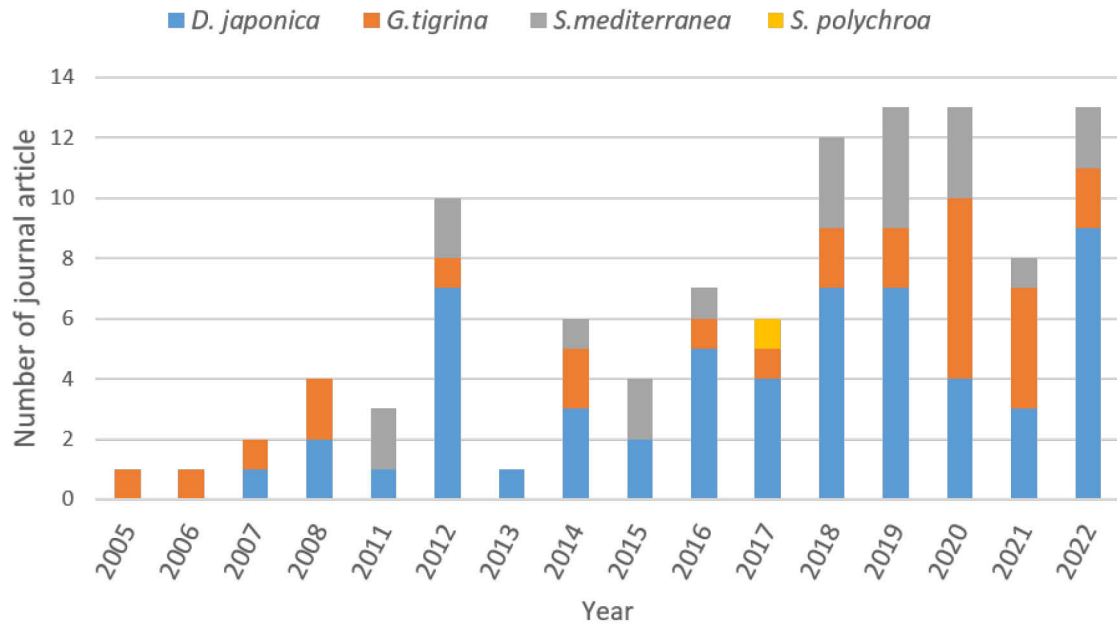
Optimization and calibration of behavioural tests on different planarian species for ecotoxicological studies

Lucia Rejo¹, Jean-Michel Malgouyres¹, Elsa Bonnafé¹, Caroline Vignet¹

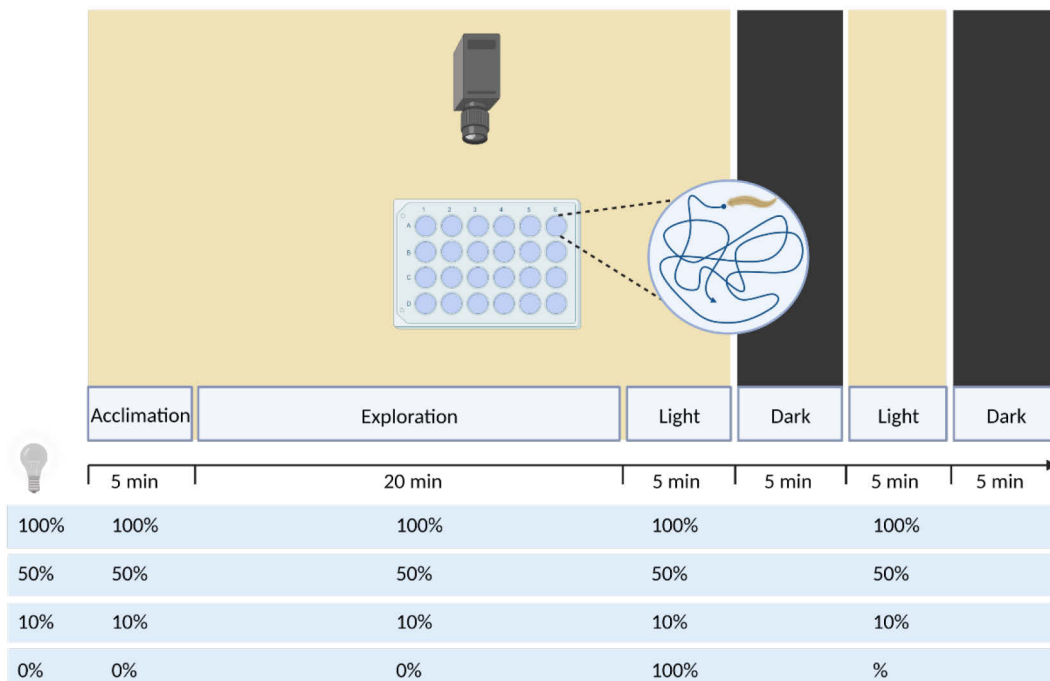
¹ Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA- 7417, Institut National Universitaire J-F Champollion, Albi France

Supplementary table 1 : Overview of genomic and transcriptomic data availability, strains origins, and fields in which the four planarian species studied in the article are used. N.A means not available. Lab. established refers to laboratory established strain of planaria species.

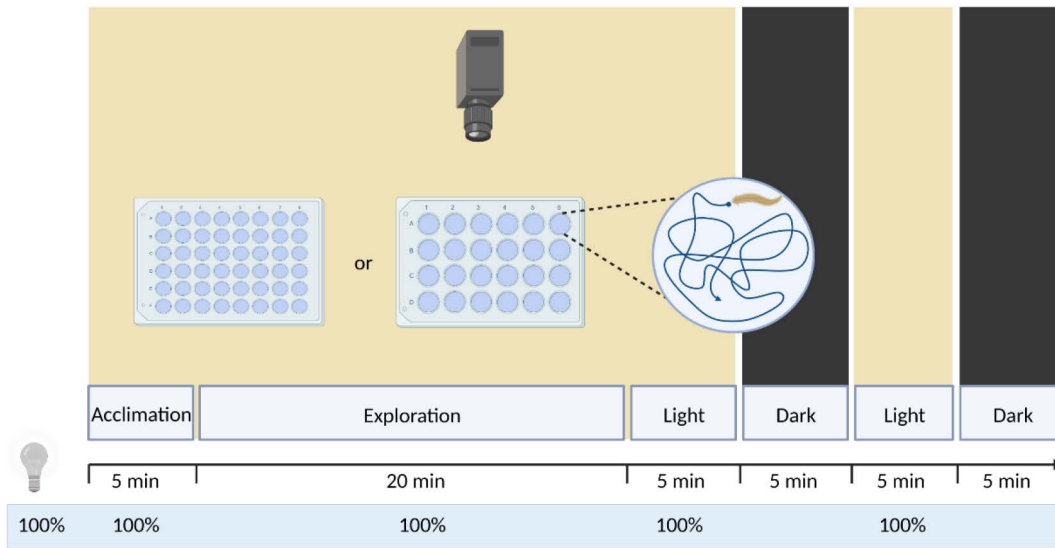
| Species | Genome | Tran- scriptome | Ploidy | Special features | Planaria origin | Scientific field | References |
|-------------------------------|-----------------|--------------------|--------|--|--------------------|-------------------------------------|---|
| <i>Dugesia japonica</i> | Draft genome | Available | 2n=16 | | Lab. established | Toxicology, Neurobiology | (An et al., 2018; Hoshino et al., 1991) |
| <i>Girardia tigrina</i> | Draft genome | Available | 2n=16 | High level of mobile genetic elements (<i>mariner</i>) | Commercial | Toxicology | (Garcia-Fernandez et al., 1995; Wheeler et al., 2015) |
| <i>Schmidtea mediterranea</i> | Genome assembly | Available | 2n=8 | | Lab. established | Stem cell, Regeneration | (Grohme et al., 2018; Robb et al., 2008; Rozanski et al., 2019) |
| <i>Schmidtea polychroa</i> | N.A | Available | 3n=12 | | Local (native) | Toxicology (effect on reproduction) | (D'Souza et al., 2006) |



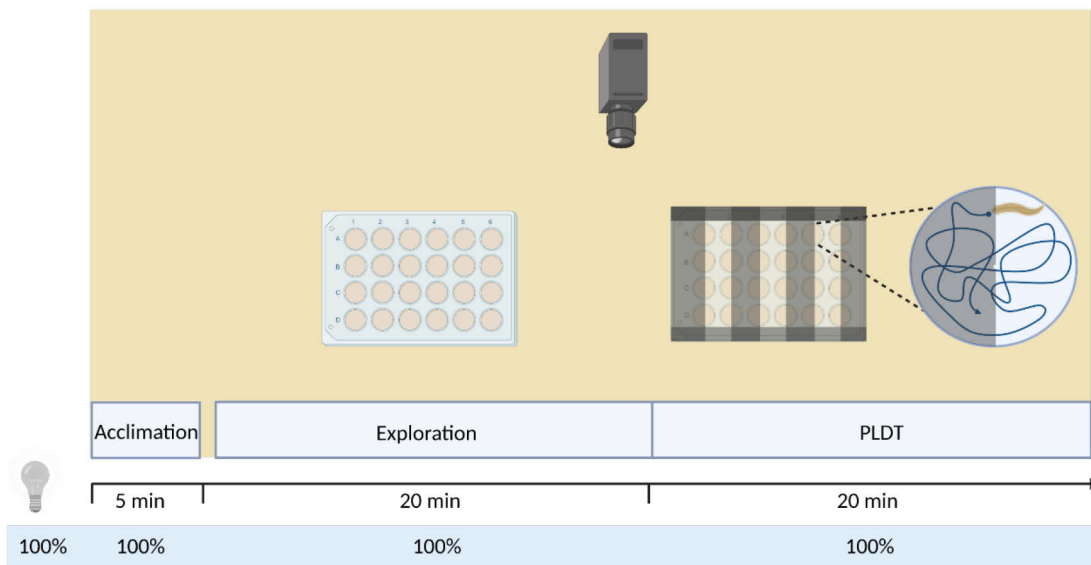
Supplementary data 1: Number of journal articles reporting toxicological studies on the four species of freshwater planaria over time. The literature search was conducted using PubMed with the following queries (accessed in January 2023): (((planarian OR flatworm) NOT marine NOT parasitic NOT Schistosoma) AND (toxic) NOT review) AND (*Dugesia japonica*) OR (*Schmidtea mediterranea*) OR (*Girardia* OR *Dugesia*) *tigrina*) OR (*Schmidtea polychroa*) AND (toxic) NOT review).



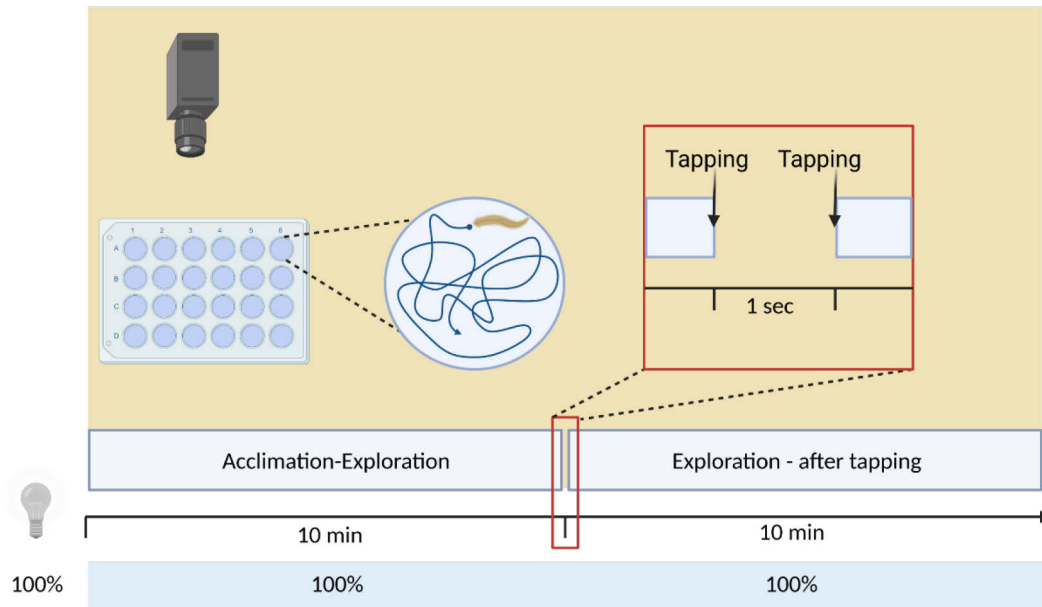
Supplementary data 2: Graphical methodology of the general protocol performed at 100% light, or at different light intensities. It starts with an acclimation period of 5 minutes at light, followed by a 20 min measurement of spontaneous swimming behaviour in the presence of light, referred to as “exploration”, then followed by the photomotor response (PMR) assay, alternating dark and light periods each lasting 5 min. Each planaria (one per well in 24 well-plate) is recorded and tracked throughout 45 minutes. Light intensity vary for the light intensity standardization assay. Figure was created on BioRender.com.



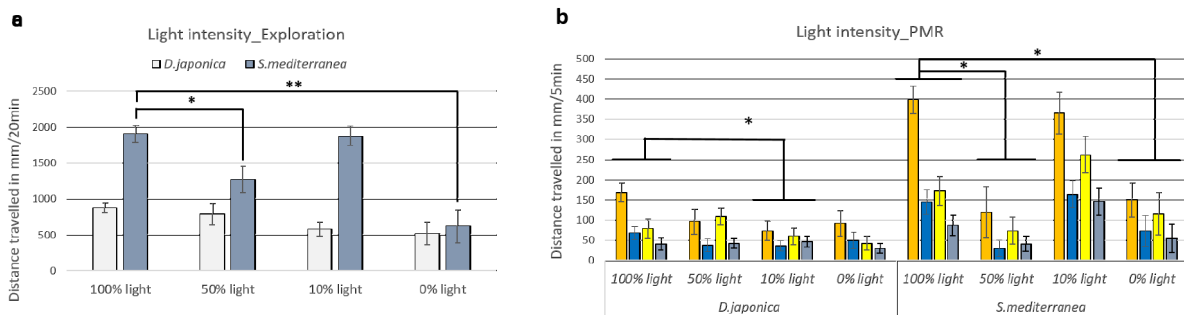
Supplementary data 3: Graphical methodology for the well size assay. The general protocol described in supp.data 2 is performed with planarians set either in 24 or 48 well-plates. The protocol is performed at 100% light. Figure was created on BioRender.com.



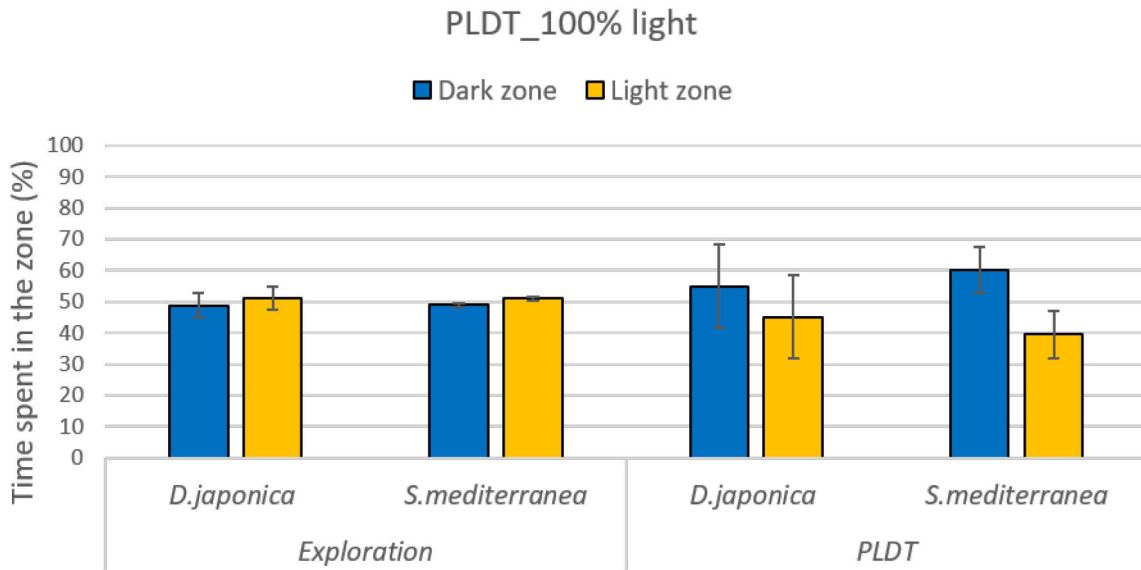
Supplementary data 4: Graphical methodology for the Planarian Light Dark Test. Planarians are set for acclimation for 5min, then recorded for 20 min without the plexiglas frame (referred as exploration), afterwards the plexiglas frame is placed below the plate, covering half of each well, planarians are then recorded for additional 20min (referred as PLDT). The protocol is performed at 100% light with 24 well-plates. Figure was created on BioRender.com.



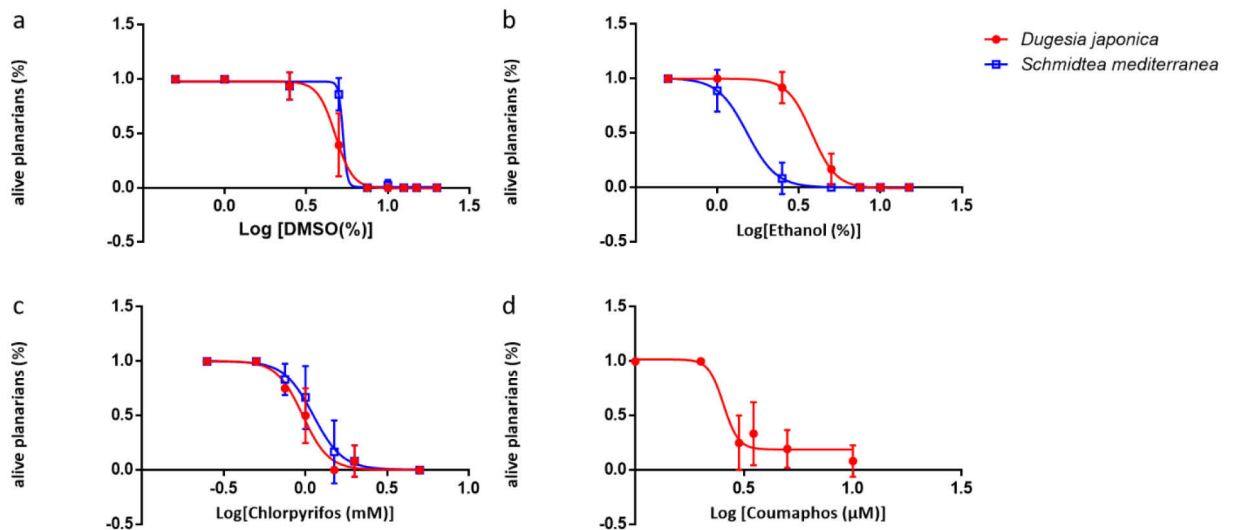
Supplementary data 5: Graphical methodology for the Tapping assay. Planarian were allowed to acclimate for 10 min, follows two intense tapping stimuli (scale 8 on 8) done at 1 sec of interval. Then, planaria activity is recorded for additional 10 min after tappings. The protocol is performed at 100% light with 24 well-plates. Figure was created on BioRender.com.



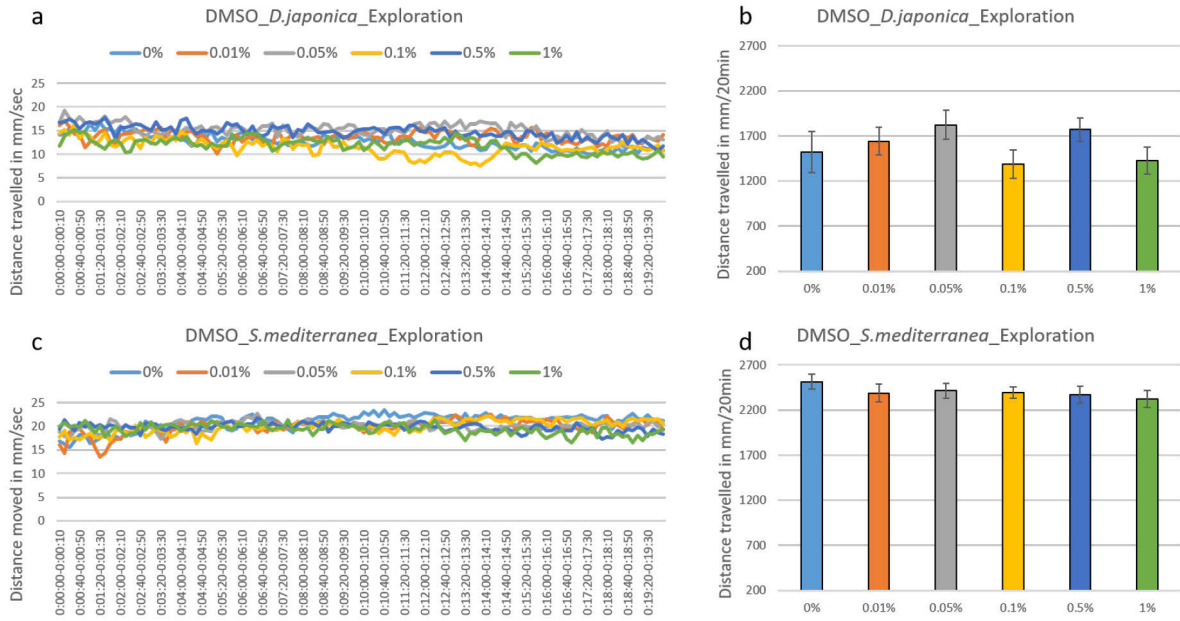
Supplementary data 6: Comparison of the behavioral responses of two planarian species to the variation of light intensity. Effect of light intensity on behavioural response of *D.japonica* and *S.mediterranea* in 24 well plates; (a) Cumulative distance travelled for *D.japonica* and *S.mediterranea*; (b) Effect of light stimuli on distance travelled over 5 minutes periods of recording (n= 21 for *D.japonica* 100% light, n=9 for *D.japonica* 50% light, n=22 for *D.japonica* 10% light, n=12 for *D.japonica* 0% light, n=24 for *S.mediterranea* 100% and 10% light and n=12 for *S.mediterranea* 50% and 0% light). Data represents means \pm SE. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$.



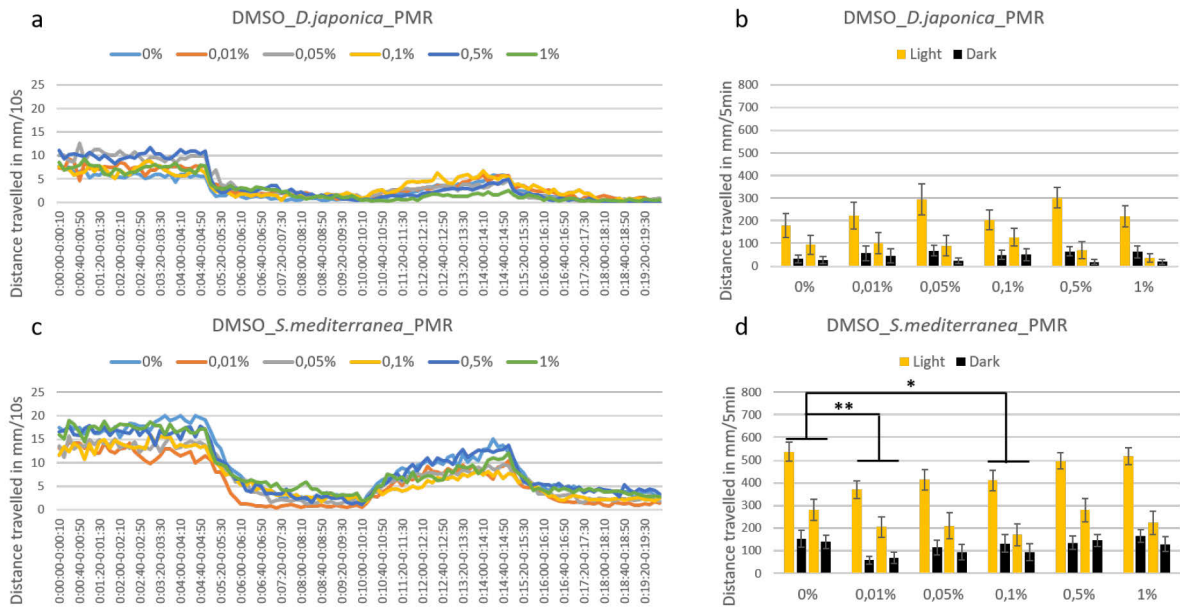
Supplementary data 7: Comparison of the behavioral responses of two planarian species to the Planarian Light Dark Test. Time spent in the dark and light zones of 24-well plates by planarians during 20 minutes (For exploration n= 21 for *D. japonica* and n=24 for *S. mediterranea*; and n=8 for *D. japonica* and n=12 for *S. mediterranea* in PLDT assay). Data represents means \pm SE. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$ *** $p < 0.0005$.



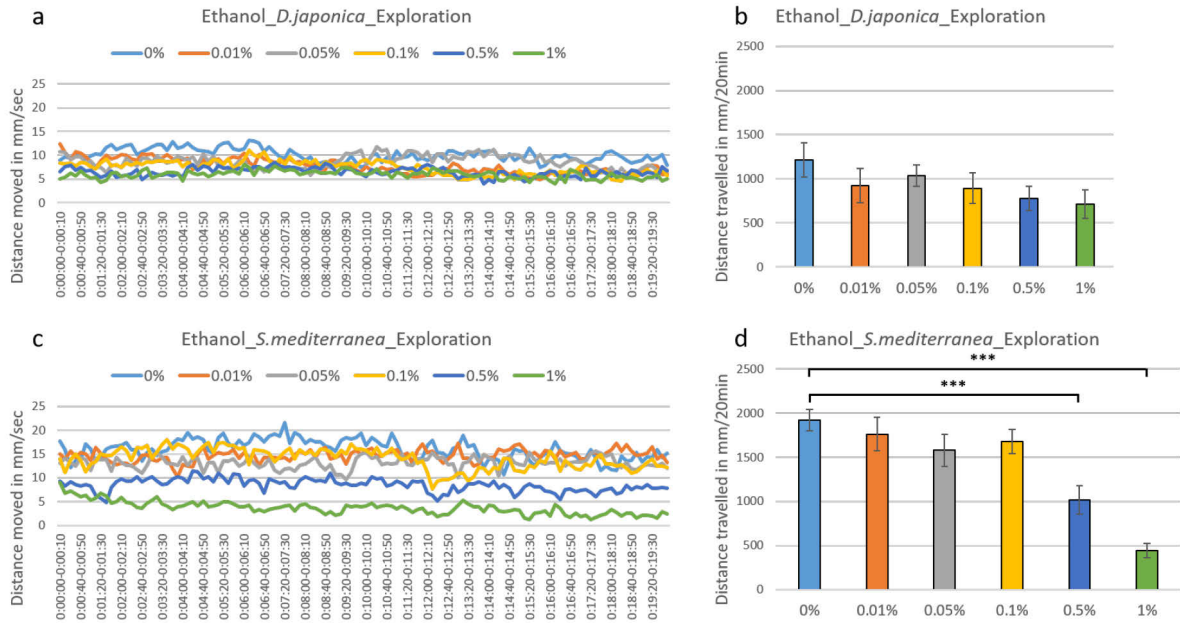
Supplementary data 8: Mortality curves of *D. japonica* and *S. mediterranea* exposed to DMSO (a), Ethanol (b), Chlorpyrifos (c), and Coumaphos (d) for 24h, represented by the percentage of alive planarians as function of Log of concentration. Ten concentrations (0; 0.5; 1; 2.5; 5; 7.5; 10; 12.5; 15; 20 %) over 5 replicates have been tested for DMSO, for replicates 1 to 4, n=4 per species and per concentration, for replicate 5, n=9 per species and per concentration. For Ethanol, Chlorpyrifos and Coumaphos, eight concentrations (0; 0.5; 1; 2.5; 5; 7.5; 10; 15% for Ethanol; 0; 0.25, 0.50; 0,75; 1; 1.5; 2; 5mM for Chlorpyrifos; 0; 1, 2; 3; 3.5; 5; 10 μ M for Coumaphos) over 3 replicates have been tested, for each replicate n=4 per species and per concentration. For DMSO, 24h LC_{50} =4.76% for *D. japonica*, 24h LC_{50} =5.31 % (approximately) for *S. mediterranea*. For Ethanol, 24h LC_{50} =3.80% for *D. japonica*, 24h LC_{50} =1.52% for *S. mediterranea*. For Chlorpyrifos, 24h LC_{50} =961 μ M for *D. japonica*, 24h LC_{50} =1118 μ M for *S. mediterranea*. For Coumaphos, 24h LC_{50} =2.55 μ M for *D. japonica*.



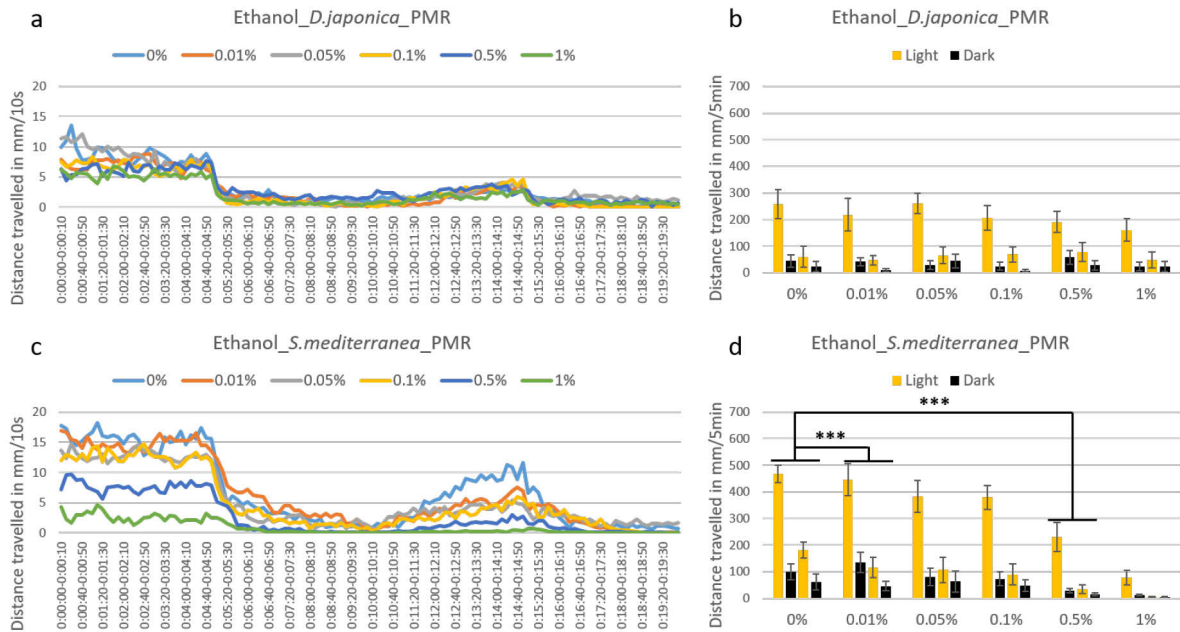
Supplementary data 9: Comparison of distance travelled by *D.japonica* and *S.mediterranea* species exposed to increasing concentration of DMSO (0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%). (a,c) Graphical representation of raw data of distance travelled in mm every 10s by each species. (b,d) Cumulative distance travelled over 20 minutes of recording. (a,b) are data of *D.japonica*. (c,d) are data of *S.mediterranea*. Data represent the mean \pm SE. (n=12).



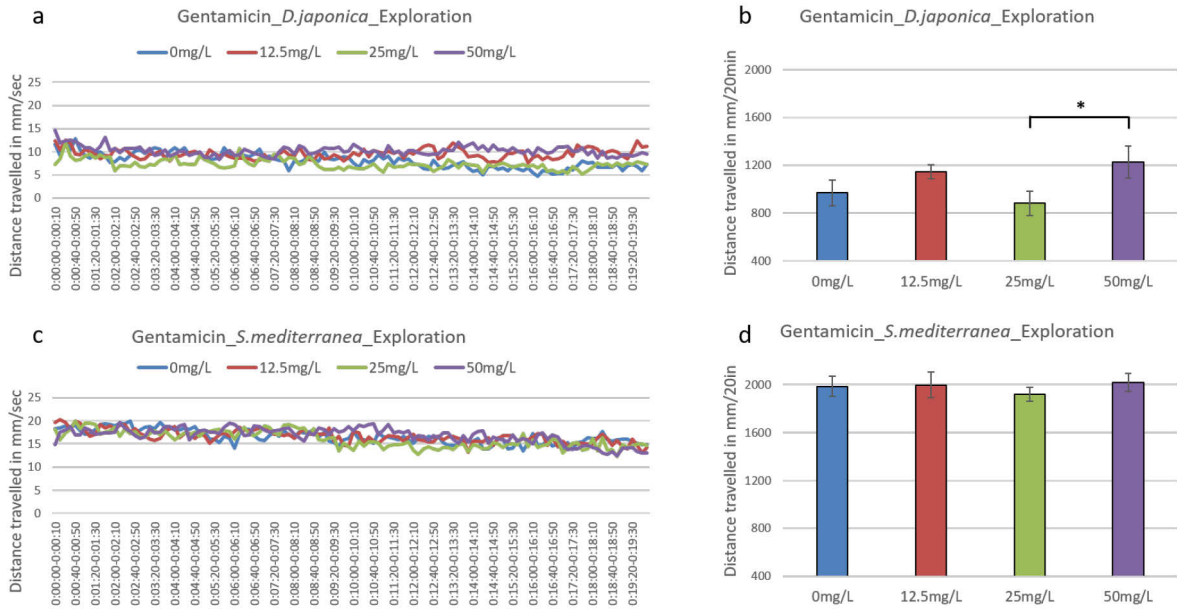
Supplementary data 10: Effect of light stimuli on distance travelled by *D.japonica* and *S.mediterranea* exposed to DMSO (0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%). (a,c) Graphical representation of raw data of distance travelled in mm every 10s by each species. (b,d) Cumulative distance travelled over 5 minutes periods of recording. (a,b) are data of *D.japonica*. (c,d) are data of *S.mediterranea*. Data represent the mean \pm SE. (n=12) *p<0.05 **p<0.005 compared with control group (0%) (n=12).



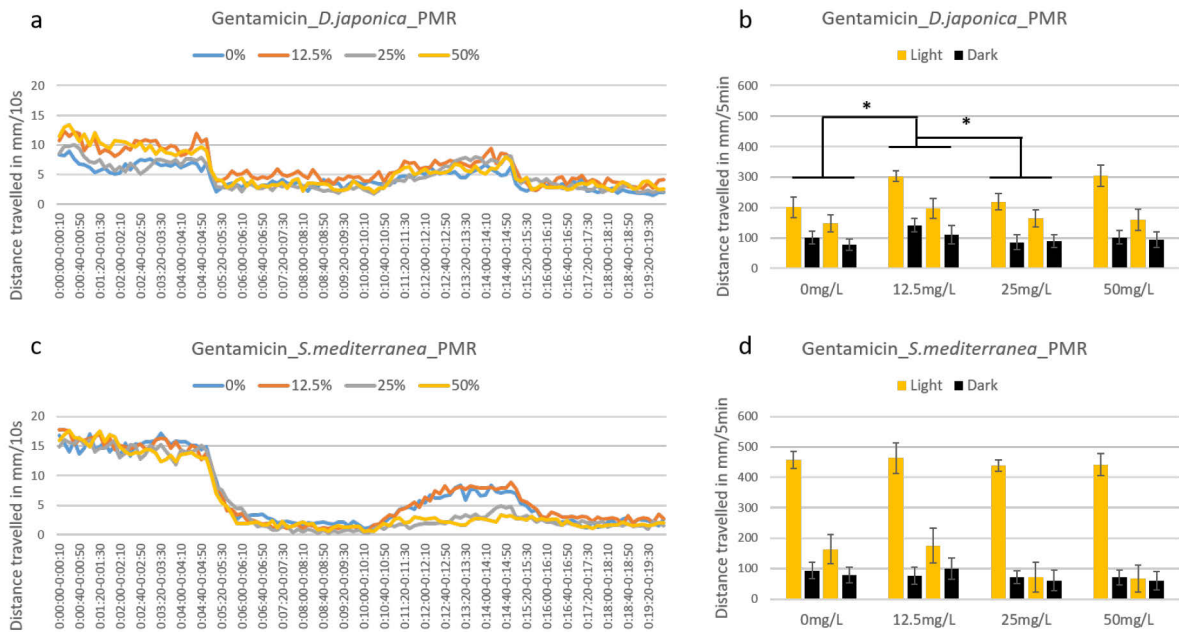
Supplementary data 11: Comparison of distance travelled by *D.japonica* and *S.mediterranea* species exposed to Ethanol (0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%). (a,c) Graphical representation of raw data of distance travelled every 10s by each species. (b,d) Cumulative distance travelled over 20 minutes of recording. (a,b) are data of *D.japonica*. (c,d) are data of *S.mediterranea*. Data represent the mean ± SE. *** p<0.0005 compared with control group (n=12 except for *D.japonica* 1% for which n=11).



Supplementary data 12: Effect of light stimuli on distance travelled by *D.japonica* and *S.mediterranea* species exposed to Ethanol (0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%). (a,c) Graphical representation of raw data of distance travelled in mm every 10s by each species. (b,d) Cumulative distance travelled over 5 minutes periods of recording. (a,b) are data of *D.japonica*. (c,d) are data of *S.mediterranea*. Data represent the mean ± SE. *** p<0.0005 compared with control group (n=12 except for *D.japonica* 1% for which n=11).



Supplementary data 13: Comparison of distance travelled by *D.japonica* and *S.mediterranea* species exposed to Gentamicin (12.5mg/L, 25mg/L, 50mg/L). (a,c) Graphical representation of raw data of distance travelled in mm every 10s by each species. (b,d) Cumulative distance travelled over 20 minutes of recording. (a,b) are data of *D.japonica*. (c,d) are data of *S.mediterranea*. Data represent the mean \pm SE. * $p<0.05$ compared with control group (n=12).



Supplementary data 14: Effect of light stimuli on distance travelled by *D.japonica* and *S.mediterranea* species exposed to Gentamicin (12.5mg/L, 25mg/L, 50mg/L). (a,c) Graphical representation of raw data of distance travelled in mm every 10s by each species. (b,d) Cumulative distance travelled over 5 minutes periods of recording. (a,b) are data of *D.japonica*. (c,d) are data of *S.mediterranea*. Data represent the mean \pm SE. * $p<0.05$ compared with control group (n=12).

Supplementary information - Article 3

Effect of acute exposure to two neuroactive compounds, nicotine and imidacloprid, on the behavioural response (locomotion, stereotypies) and expression of nicotinic receptor-encoding genes in planaria *Schmidtea mediterranea*

Lucia Rejo¹, Marie Ksen¹, Jean-Luc Carayon¹, Pierre Marty¹, Jean-Michel Malgouyres¹, Elsa Bonnafé¹, Caroline Vignet¹

¹Biochimie et Toxicologie des Substances Bioactives, EA, 7417, Institut National Universitaire J-F Champollion, 81012 Albi, France

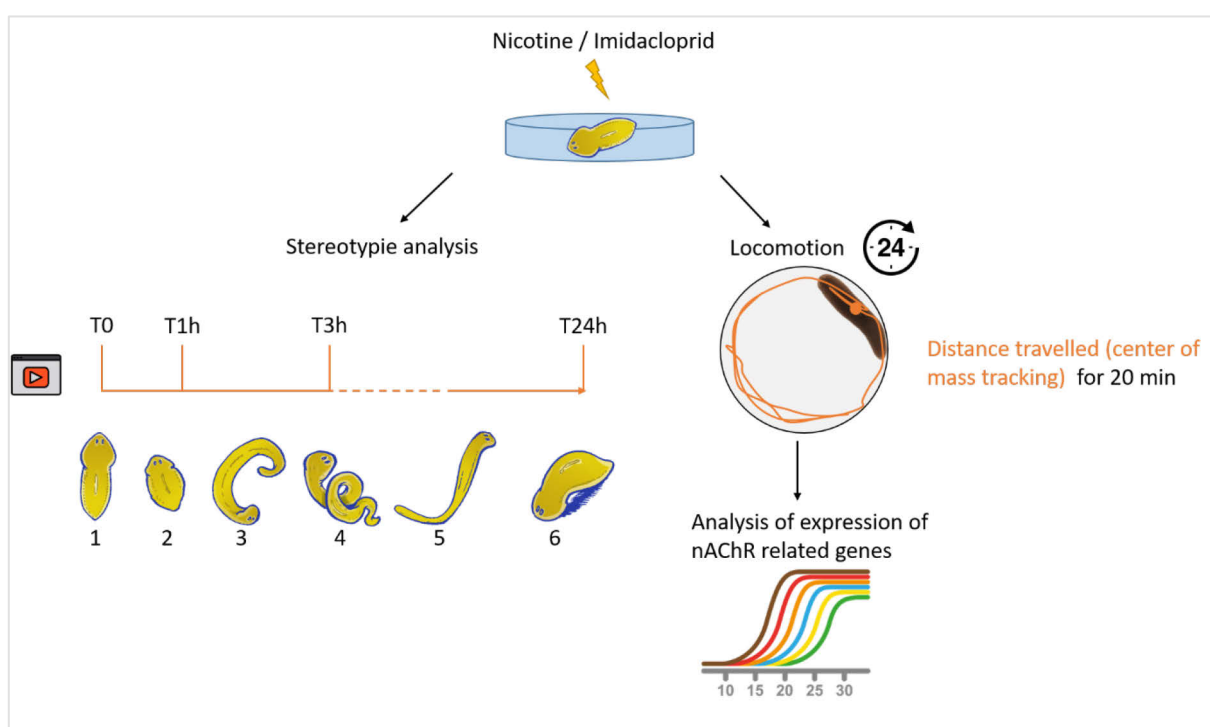


Figure S 1 : Graphical summary of methods, for detailed description see material and method section. The stereotypies observed are represented by drawings: numbers 1 to 6 represent, in that order, wildtype, walnut, C-shape, screw, snake and bridge-like.

Table S 1: Identification of nAChR genes by BlastP analysis on the *S.mediterranea* genome database (SmedSx14.0)

| Protein coding gene origin * | BlastP match in <i>SmedSx1 protein assembly version 4.0</i> | E-value (BlastP) | Subunit-type | Prosites (conserved site) | Phobius (Topology) | Gene name |
|---|---|------------------|--------------|--|---|---------------|
| | Cha-1 (P32756) [<i>C.elegans</i>] | | | "20-35" Acyltransferases ChoActase/COT/CPT family signature 1 [PS00439] "319-346" Acyltransferases ChoActase/COT/CPT family signature 2 [PS00440] "29-44" Acyltransferases ChoActase/COT/CPT family signature 1 [PS00439] | "1-627" Non cytoplasmic domain | |
| | DjChAT (D5MS68 (UniprotKB)) [<i>D.japonica</i>] | | | "331-358" Acyltransferases ChoActase/COT/CPT family signature 2 [PS00440] | "1-682" Non-cytoplasmic domain | |
| DjChAT [<i>D.japonica</i>] | maker-scaffold33854-augustus-gene-0.31 | 1.00e-56 | | "47-62" Acyltransferases ChoActase/COT/CPT family signature 1 [PS00439] | "1-186" Cytoplasmic; "187-207" Transmembrane domain; "208-622" Non cytoplasmic domain | <i>chat_2</i> |
| DjChAT [<i>D.japonica</i>] | maker-scaffold11794-snap-gene-0.12 | 2.79e-09 | | | "1-226" Non cytoplasmic | <i>chat_1</i> |
| | AChE (P38433 (UniprotKB);) [<i>C.elegans</i>] | | | "107-117" Carboxylesterases type-B signature 2 [PS00941] "203-218" Carboxylesterases type-B serine active site [PS00122] | "1-17" signal peptide; "1-3" N-ter; "4-11" Hydrophobic region; "12-17" C-ter; "18-620" Non cytoplasmic domain | |
| AChE (P38433 (UniprotKB);) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold25946-snap-gene-0.13 | 2.98e-92 | | "212-227" Carboxylesterases type-B serine active site [PS00122] | "1-629" Non cytoplasmic domain | <i>ache_3</i> |
| AChE [<i>C.elegans</i>] | augustus_masked-scaffold43100-processed-gene-0.0 | 4.60e-98 | | | "1-547" Non cytoplasmic domain | <i>ache_1</i> |
| AChE [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold25379-snap-gene-0.11 | 1.16e-54 | | | "1-588" Non cytoplasmic domain | <i>ache_2</i> |

| | | | | | | |
|------------------------------------|---|----------|--------------------|--|---|----------------|
| AChE [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold458-augustus-gene-1.36 | 1.07e-60 | | "114-124" Carboxylesterases type-B signature 2 [PS00941] | "1-510" Non cytoplasmic domain | <i>ache_4</i> |
| | Acr7 (α -type subunit; P45963) [<i>C.elegans</i>] | | | "160-174" Neurotransmitter-gated ion channel, conserved site [PS00236] | "1-5" "275-279" "333-343" "532-538" Non-cytoplasmic domain; "6-25" "248-274" "280-298" "310-332" "344-362" "512-531" Transmembrane region; "26-247" "299-309" "363-511" Cytoplasmic domain; "1-20" signal peptide; "1-6" N-ter; "7-16" Hydrophobic region; "17-20" C-ter; "21-265" "319-329" "546-575" Non cytoplasmic domain; "266-289" "301-318" "330-353" "520-545" Transmembrane region; "290-300" "354-519" Cytoplasmic domain | |
| | Acr2 (β -type subunit; P48182) [<i>C.elegans</i>] | | | "185-199" Neurotransmitter-gated ion channel, conserved site [PS00236] | "1-259" "314-324" Cytoplasmic; "260-283" "295-313" "325-348" Transmembrane region; "284-294" "349-396" Non cytoplasmic domain | |
| acr2 (P48182) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold12302-augustus-gene-1.41 | 2.53e-75 | non α -type | "148-162" Neurotransmitter-gated ion channel, conserved site [PS00236] | "1-198" "252-363" Cytoplasmic; "199-224" "230-251" "364-384" Transmembrane region; "225-229" | <i>nicor_1</i> |
| acr8 (Q23355) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold1662-snap-gene-0.35 | 1.04e-75 | α -type | "99-113" Neurotransmitter-gated ion channel, conserved site [PS00236] | | <i>nicor_2</i> |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------|----------------|--|---|----------------|
| acr16 (P48180) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold1662-snap-gene-0.36 | 9.76e-11 | α -type | | "385-418" Non cytoplasmic domain | |
| | | | | | "1-16" signal peptide: "1" N-ter; "2-12" Hydrophobic region; "13-16" Cter; "17-91" Non cytoplasmic domain "1-20" "291-301" "356-521" Cytoplasmic; "21-38" "271-290" "302-320" "332-355" "522-543" | <i>nicor_5</i> |
| acr9 (Q18556) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold2267-augustus-gene-0.31 | 1.44e-121 | non- α | "175-189" Neurotransmitter-gated ion channel, conserved site [PS00236] | Transmembrane region;"39-270" "321-331" "544-554" Non cytoplasmic domain "274-279" "336-458" Cytoplasmic; "249-273" "280-298" "310-335" "459-478" | <i>nicor_3</i> |
| acr12 (G5EDF1) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold2427-augustus-gene-0.47 | 1.28e-94 | α -type | "145-159" Neurotransmitter-gated ion channel, conserved site [PS00236] | Transmembrane region;"1-248" "299-309" "479-508" Non cytoplasmic domain "1-241" "292-302" "357-397" Cytoplasmic; "242-267" "273-291" "303-326" "338-356" Transmembrane region;"268-272" "327-337" Non cytoplasmic domain "82-155" Cytoplasmic; "60-81" Transmembrane region;"1-59" Non cytoplasmic domain | <i>nicor_4</i> |
| acr12 (G5EDF1) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold4665-snap-gene-0.13 | 2.61e-83 | α -type | "147-159" Neurotransmitter-gated ion channel, conserved site [PS00236] | | <i>nicor_6</i> |
| acr25 (Q65XS8) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold6196-snap-gene-0.33 | 8.63e-12 | α -type | | | <i>nicor_7</i> |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|---|----------|----------------|--|--|-------------------|
| acr16 (P48180) [<i>C.elegans</i>] | maker-scaffold9388-snap-gene-0.38 | 2.36e-83 | α -type | "152-166" Neurotransmitter-gated ion channel, conserved site [PS00236] | "1-19" Sigal peptide; "1-2" N-ter; "3-14" Hydrophobic region; "15-19" C-ter; "269-281" Cytoplasmic; "245-268" Transmembrane region;"20-244" Non cytoplasmic domain | <i>nicor 8</i> |
| gapdh (mk4.002051.00 (S.medGD)) | maker-scaffold6085-augustus-gene-0.8 | | 0 | | | <i>gapdh</i> |
| Beta-actin (mk4.000205.04 (S.medGD)) | augustus_masked-scaffold1280-processed-gene-0.1 | | 0 | | | <i>beta-actin</i> |

| Gene name | Efficiency (%) |
|----------------|----------------|
| <i>b-actin</i> | 109.70 |
| <i>gapdh</i> | 100.70 |
| <i>ache1</i> | 108.89 |
| <i>ache2</i> | 106.70 |
| <i>ache3</i> | 109.13 |
| <i>ache4</i> | 106.84 |
| <i>chat2</i> | 99.96 |
| <i>nicor2</i> | 103.60 |
| <i>nicor3</i> | 109.80 |
| <i>nicor4</i> | 105.95 |
| <i>nicor5</i> | 101.40 |
| <i>nicor6</i> | 107.04 |
| <i>nicor7</i> | 108.80 |
| <i>nicor8</i> | 107.57 |

Table S 2: PCR efficiency of primer pairs was estimated by serial dilution to 1/4, except for *nicor7* which was tested at 1/5, over four points of dilution. Primers with efficiencies between 90% and 110% were validated. The R² slopes of the calibration curves were validated. The R² slopes of the calibration curves were $\geq 99\%$.

Table S 3: Details of Quantitative Real-time PCR Experiments (MIQE guidelines)

| | |
|--|---|
| Experimental design | |
| Definition of experimental and control groups | Experimental group: - Fully developed planarians exposed to 5µM Nicotine or 0.01µM Imidacloprid for 24h; Control group: planarians in Montjuich water |
| Number within each group | n=24 |
| Sample | |
| If frozen, how ? | for each concentration, planarians were pooled in pairs and soaked in RNAlater™ (Invitrogen™) overnight at 4°C, then RNA later was removed |
| Sample storage condition | Stored at -80°C |
| Nucleic acid extraction | |
| Procedure/instrumentation | Planaria tissues were disrupted using TissueLyser II (Quiagen) at 30 beats per minute for two minutes, in TRIzol™ reagent (Invitrogen™). 1/5 TRIzol volume of Chloroform-isoamil alcohol 24:1 (Sigma-Aldrich) was added to the TRIzol lysate. After centrifugation, the upper aqueous phase containing RNA was recovered and mixed with 1 volume of 96% ethanol. Mixture was loaded onto Quick Plasmid Mini Columns (Pure Link, Invitrogen™). RNA was washed twice with 3M Sodium acetate (Sigma-Aldrich), then precipitated with 70% ethanol. RNA was eluted in 22µL of 0.1% treated DEPC (Diethyl pyrocarbonate) water. |
| Details of Dnase or Rnase treatment | Genomic DNA was removed with DNA-free™ (Invitrogen™) |
| Nucleic acid quantification | RNA concentration were assessed using spectrophotometry |
| Instrument and method | Biotek Cytation 1 microplate reader (Agilent Technologies) using Gen5 software (Biotek, v3.10.06) |
| Purity | 260/280 and 260/230 analysis |

| Reverse transcription | | |
|--|---|------------------------------|
| Complete reaction condition | 200 U/μL M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) | |
| Amount of RNA and reaction volume | 200ng of total RNA in reaction volume of 20μL | |
| Storage condition of cDNA | cDNA was diluted to 1/10 in UP water, stored at -20°C | |
| qPCR target information | | |
| Gene symbol and accession | <i>β-actin</i> (mk4.000205.04); <i>gapdh</i> (mk4.002051.00) SmedGD | |
| Amplicon length | <i>ache_1</i> (163); <i>ache_2</i> (151); <i>ache_3</i> (180); <i>ache_4</i> (135); <i>chat_2</i> (192); <i>nicor_2</i> (143); <i>nicor_3</i> (158); <i>nicor_4</i> (124); <i>nicor_5</i> (138); <i>nicor_6</i> (149); <i>nicor_7</i> (110); <i>nicor_8</i> (182). <i>β-actin</i> (120); <i>gapdh</i> (207) | |
| Location of each primer by exon or intron | Intron spanning primers | |
| qPCR oligonucleotides | | |
| Primer sequences | Forward and Reverse (5'-3') | |
| <i>ache_1</i> | 5'-GGAATGCCGTTTTCAAAGAA-3' | 5'-AGGGCCATGATA-GAGTCGAG-3' |
| <i>ache_2</i> | 5'-TGCAATAATGTTAAGCGGGG-3' | 5'-AGCCCAAGCAAAGCTGAAGAA-3' |
| <i>ache_3</i> | 5'-AGGGGTCATGCATGGATATG-3' | 5'-CCCTTCTCAGT-GAAATCGGT-3' |
| <i>ache_4</i> | 5'-CGGTTGGTCGATTGAGATTC-3' | 5'-TCCTCCAAGCTGGATTGTTC-3' |
| <i>chat_2</i> | 5'-TGGACATAGCGTGAAACCAG-3' | 5'-GCAGCT-GAATCGATTTTTTCG-3' |

| | |
|----------------|--|
| <i>nicor_2</i> | 5'-CAATGAGACAGACGATATTCCAG-3' 5'- TTCGAACACCTTCAAGAGCC-3' |
| <i>nicor_3</i> | 5'-GTTGGTAGCCGACAAATTGC-3' 5'- AAGGTGGAAGCTGGCTTGAGA-3' |
| <i>nicor_4</i> | 5'-TTCCAACATCTTTTGGTAGCAC-3' 5'- TGAGCAGTCCCCTTTTGA-3' |
| <i>nicor_5</i> | 5'-TGAGACGACGTGGCTATGAC-3' 5'-CCCACATGTT- GAGCACGATA-3' |
| <i>nicor_6</i> | 5'-AACTTAAAGCACATGGCACAGA-3' 5'-GTCAC- CAGGGATCTTTCTGC-3' |
| <i>nicor_7</i> | 5'-TGGTTTTTCTTCGATTGGGA-3' 5'- CTTTTCTCTCCCGACATGG-3' |
| <i>nicor_8</i> | 5'-TGGAAGTTGGACATATGAGGG-3' 5'-ACGTTTCAGGA- CAACAAGGA-3' |
| <i>β-actin</i> | 5'-AACAGCTTCAGCCTCGTCAT-3' 5'-CCCAAGAACTT- GGTTGGAA-3' |
| <i>gapdh</i> | 5'-TCAAGGCCGCTATTAAGCAT-3' 5'-GATCGATTA- CACGGCAACTGT-3' |

qPCR protocol

| | |
|--|--|
| Complete reaction conditions | SsoFast™ EvaGreen® Supermix (1X final) (Biorad) |
| Reaction volume and amount of cDNA/DNA | Reaction volume: 6μL; Amount of cDNA: 2μL |
| Primer | 500nM of each primer (forward and reverse) |
| Polymerase, Mg²⁺, dNTP, buffer | Included in SsoFast™ EvaGreen® Supermix (1X final) (Biorad) |
| Complete thermocycling parameters | Hold: 95°C for 20 seconds; 40 cycles: 3s at 95°C and 30s at 60°C |
| Manufacturer of qPCR instrument | QuantStudio5 instrument (Applied Biosystems, Thermofisher) |

| qPCR validation | |
|--|--|
| Specificity (gel, sequence, melt or digest) | Samples with melt temperature (T _m) deviating from the product specific T _m were excluded |
| PCR efficiency | 0.85-0.110 |
| R² of calibration curve | ≥ 97% |
| Data analysis | |
| qPCR analysis program (source, version) | QuantStudio design and analysis (Applied Biosystems, Thermofisher) |
| Method of C_q determination | 2-(ΔΔC _t) |
| Statistical method analysis | Mann-Whitney |
| Software (source, version) | R software |

Table S 4: Comparison of exposure conditions to nicotine and behavioural responses in planarians with previously published studies. All concentrations have been converted into mM to facilitate comparison. pLMV refers to planarian locomotor velocity method (Raffa et al., 2001), pSLM (planarian seizure-like movement), pSLA (planarian seizure-like activity), WNP (Walnut positions) and “paroxysms” refers to different types of stereotypy movement.

| Concentrations (mM) | Planarian species | LC50/ IC50 (reported) | Locomotion | Stereotypy | Observed response | References |
|--|-------------------------------|-------------------------------|---|---|--|---------------------------|
| 0.007-0.29mM (locomotion) 0.091-0.81mM (Stereotypy) | <i>Schmidtea mediterranea</i> | | T0-T24h :nicotine exposure ; at T24h, 20min COM tracking of planarian | T0, T1h, T3, T24h: stereotypy 30s video recording | Concentration-dependant decrease in locomotion ; T0: C-shape & Screw-like, from T1h :concentration-dependant increase of WNP | Current study |
| 0.123 - 3.08mM | <i>Dugesia gonocephala</i> | | | T0 - T60min: stereotypy observation; 3 time wash; 60 - 240 min additional observation | T0- T15 min: 10-15min latency (the higher the concentration, the lower the latency); T15- T60min: concentration dependant increase in WNP; T60-T75min: residual WNP | (Buttarelli et al., 2000) |
| 0.01-10mM | <i>Dugesia dorotocephala</i> | | T0-T5min: pLMV | T0-T5min: stereotypy observation | Biphasic effect on motility: 0.01 mM: increased motility; 0.3–10mM: decreased motility. Stereotypies (1-5mM): concentration-dependant increase in C-shape (1-5mM); 10mM: C-shape (less than observed at previous concentrations). | (Rawls et al., 2011) |
| 0.01-1mM (motility); 0.01-2mM (Stereotypy) | <i>Girardia tigrina</i> | IC50 of 0.162 mM (locomotion) | T0-T8min: pLMV | T0-T10min: pSLM observation | concentration-dependent decrease in velocity; concentration-dependant increase in C-shape | (Bach et al., 2016) |
| 0.1-2mM | <i>Girardia tigrina</i> | | | T0-T10min: pSLM observation | concentration-dependent increase in C-shape with maximal effect at ~ 0.4mM | (Pagán et al., 2015) |
| ~0.01-1mM | <i>Dugesia dorotocephala</i> | IC50 of 0.075 mM (locomotion) | T0-T15: nicotine incubation period; T15-23min: pLMV | | concentration-dependent decrease in motility | (Pagán et al., 2009) |

| | | | | | |
|--------------------|-------------------------------|---|---|---|-------------------------------|
| 0-0.092mM | <i>Dugesia dorotocephala</i> | 5 days LC50 between 0.46 and 0.62 mM ;10 days LC50: between 0.31 and 0.46mM | T0-T24h: nicotine incubation; at T24h 6min: pLMV (number of line crossed by planarians) | concentration-dependent decrease in motility and suppression of motility at 0.092mM nicotine | (Best & Morita, 1991) |
| 0.0001-1mM | <i>Girardia tigrina</i> | | T0-T5min: stereotypy (pSLA: C-shape, Snake-like, screw-like) observation | concentration-dependent elicitation of stereotypies; 0.0001-0.01mM: C-like and screw-like; ≥ 0.05 mM: WNP; C-shapes induced | (Ramakrishnan & Desaer, 2011) |
| 1mM | <i>Girardia tigrina</i> | | T0-10min: pSLM observation | C-shapes induced | (Pagán et al., 2013) |
| 0.125-1mM | <i>Girardia tigrina</i> | | T0-10min: pSLM observation | concentration-dependant increase in C-shapes | (Pagán et al., 2012) |
| 0.1-10mM | <i>Dugesia dorotocephala</i> | | T0-T5min: « paroxysms » observation | concentration-dependent increase in C-shapes | (A. Kim & Rawls, 2022) |
| 0.1mM | <i>Dugesia dorotocephala</i> | | T0-60min: pre-incubation with nicotine; T60-65min: pLMV | No effect: planarians pre-incubated and tested on nicotine had same locomotor velocity as pre-incubated and tested in water (Fig.3) | (Raffa et al., 2013) |
| 0.1-5mM | <i>Dugesia dorotocephala</i> | | T0-T5min: stereotypy observation | concentration-dependent increase in C-shapes eliciting the greatest effect at 5mM | (Tallarida et al., 2014) |
| 0.025-0.1mM | <i>Schmidtea mediterranea</i> | | SharpCap capture software (record four planaria at the same time) over 30min (tracking on viewpoint over 10min time bins) | Reduced motility ("unconditioned response to nicotine") | (Sal et al., 2021) |

Développement de la planaire comme modèle simplifié d'études *in vivo* du système nerveux en toxicologie et écotoxicologie

Résumé :

La planaire d'eau douce, un ver plat, invertébré émerge comme un modèle animal prometteur pour évaluer la toxicité des substances chimiques susceptibles de se retrouver dans l'environnement aquatique. Leur petite taille permet un criblage *in vivo* à moyen et haut débit de la toxicité. Et leur système nerveux partage les mêmes sous-populations neuronales et les mêmes neurotransmetteurs que le cerveau des mammifères, ce qui en font des outils de dépistage potentiels pour prédire la toxicité de substances neurotoxiques, pour les mammifères. Cette thèse, avait pour objectif de mettre au point des tests *in vivo* de criblage fonctionnel simple et haut débit permettant de révéler rapidement l'effet de substances neurotoxiques. Nous avons montré la possibilité d'adapter l'usage du PMR (*photomotor response*), un test comportemental utilisé pour identifier les composés neuroactifs chez le poisson zèbre, à notre modèle d'étude. Puis nous avons montré que le test d'exploration, basé sur l'analyse de la locomotion par suivi du centre de masse (*tracking*), réalisé dans 24 plaques à 10 000 lux est robuste et fiable pour les études toxicologiques sur les planaires. Les espèces *Dugesia japonica* et *Schmidtea mediterranea* sont des modèles sensibles pour le dépistage toxicologique des pesticides organophosphorés (Coumaphos et chlorpyrifos). Enfin nous avons évalué l'effet d'une exposition aiguë à la nicotine et à l'imidaclopride, deux agonistes des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine. L'exposition à 0,09 à 0,8 mM de nicotine pendant 24 heures a produit des effets biphasiques sur la stéréotypie: les *S.mediterranea* ont présenté des hyperkinésies de type *screw-like* et *c-shape* à T0, et des hypokinésies de type *walnut* de T1h à 24h. Lors de l'exposition à 0,1 à 1,7 μ M d'imidaclopride, les planaires ont en majorité montré un comportement de type sauvage (*wildtype*) mais des hyperkinésies de type *screw-like* ont également été observées de façon concentration- dépendante. L'exposition à 0,08 à 0,3 mM de nicotine pendant 24 heures a diminué la mobilité des planaires de manière concentration-dépendante. Alors que 0,01 et 0,1 μ M d'imidaclopride ont augmenté la mobilité, puis de 0,3 à 1,92 μ M, les planaires se sont comportées comme des contrôles. Au niveau moléculaire, la réduction de la locomotion à 7,8 μ M de nicotine a été accompagnée d'une légère surexpression du gène *ache2* (*acetylcholine esterase*). Et l'augmentation de la motilité à 0,01 μ M d'imidaclopride a été accompagnée d'une légère sous expression du gène *chat2* (*Choline acetyl-transferase*) et de deux gènes codant des sous unités de récepteurs nicotiques, *nicor3* et *nicor4*. Cette étude contribue au développement de la planaire comme modèle simplifié d'études du système nerveux en (éco) toxicologie.

Titre : Développement de la planaire comme modèle simplifié d'études in vivo du système nerveux en toxicologie et écotoxicologie

Mots clés : système nerveux, planaire, comportement, locomotion, récepteurs cholinergiques, expression génique

Résumé : La planaire d'eau douce, un ver plat, invertébré émerge comme un modèle animal prometteur pour évaluer la toxicité des substances chimiques susceptibles de se retrouver dans l'environnement aquatique. Leur petite taille permet un criblage in vivo à moyen et haut débit de la toxicité. Et leur système nerveux partage les mêmes sous-populations neuronales et les mêmes neurotransmetteurs que le cerveau des mammifères, ce qui en font des outils de dépistage potentiels pour prédire la toxicité de substances neurotoxiques, pour les mammifères. Cette thèse, avait pour objectif de mettre au point des tests in vivo de criblage fonctionnel simple et haut débit permettant de révéler rapidement l'effet de substances neurotoxiques. Nous avons montré la possibilité d'adapter l'usage du PMR (photomotor response), un test comportemental utilisé pour identifier les composés neuroactifs chez le poisson zèbre, à notre modèle d'étude. Puis nous avons montré que le test d'exploration, basé sur l'analyse de la locomotion par suivi du centre de masse (tracking), réalisé dans 24 plaques à 10 000 lux est robuste et fiable pour les études toxicologiques sur les planaires. Les espèces *Dugesia japonica* et *Schmidtea mediterranea* sont des modèles sensibles pour le dépistage toxicologique des pesticides organophosphorés (Coumaphos et Chlorpyrifos). Enfin nous avons évalué l'effet d'une exposition aiguë à la nicotine et à l'imidaclopride, deux agonistes des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine. L'exposition à 0,09 à 0,8 mM de nicotine pendant 24 heures a produit des effets biphasiques sur la stéréotypie: les *S.mediterranea* ont présenté des hyperkinésies de type screw-like et c-shape à T0, et des hypokinésies de type walnut de T1h à 24h. Lors de l'exposition à 0,1 à 1,7 μM d'imidaclopride, les planaires ont en majorité montré un comportement de type sauvage (wildtype) mais des hyperkinésies de type screw-like ont également été observées de façon concentration-dépendante. L'exposition à 0,08 à 0,3 mM de nicotine pendant 24 heures a diminué la mobilité des planaires de manière concentration-dépendante. Alors que 0,01 et 0,1 μM d'imidaclopride ont augmenté la mobilité, puis de 0,3 à 1,92 μM , les planaires se sont comportées comme des contrôles. Au niveau moléculaire, la réduction de la locomotion à 7,8 μM de nicotine a été accompagnée d'une légère surexpression du gène *ache2* (codant pour une acetylcholine esterase putative). Et l'augmentation de la motilité à 0,01 μM d'imidaclopride a été accompagnée d'une légère sous expression du gène *chat2* (Choline acetyl-transferase putative) et de deux gènes putatifs codant des sous-unités de récepteurs nicotiques, *nicor3* et *nicor4*. Cette étude contribue au développement de la planaire comme modèle simplifié d'études du système nerveux en (éco)toxicologie.

Title: Developing the planaria as a simplified model for in vivo studies of the nervous system in toxicology and ecotoxicology

Key words: nervous system, planarian, behaviour, locomotion, nAChRs, gene expression

Abstract: The freshwater planarian, an invertebrate flatworm, is emerging as a promising animal model for assessing the toxicity of chemicals that may end up in the aquatic environment. Their small size enables medium- to high-throughput in vivo toxicity screening. And their nervous system shares the same neuronal subpopulations and neurotransmitters as the mammalian brain, making them potential screening tools for predicting the toxicity of neurotoxic substances to mammals. The aim of this thesis was to develop simple, high-throughput in vivo functional screening assays to rapidly reveal the effect of neurotoxic substances. We demonstrated the possibility to adapt the use of PMR (photomotor response), a behavioral test used to identify neuroactive compounds in zebrafish, to our model. We then showed that the exploration test, based on the analysis of locomotion by center-of-mass tracking, performed in 24 plates at 10,000 lux, is robust and reliable for toxicological studies on planaria. The species *Dugesia japonica* and *Schmidtea mediterranea* were found to be sensitive models for the toxicological screening of organophosphate pesticides (Coumaphos and Chlorpyrifos). Finally, we evaluated the effect of acute exposure to nicotine and imidaclopride, two nicotinic acetylcholine receptor agonists. Exposure to 0.09 to 0.8 mM nicotine for 24 h produced biphasic effects on stereotypy: *S.mediterranea* exhibited screw-like and c-shape hyperkinesias at T0, and walnut hypokinesias from T1h to 24h. When exposed to 0.1 to 1.7 μM imidacloprid, planarians showed predominantly wildtype behavior, but screw-like hyperkinesias were also observed in a concentration-dependent manner. Exposure to 0.08 to 0.3 mM nicotine for 24 hours decreased planaria mobility in a concentration-dependent manner. While 0.01 and 0.1 μM of imidacloprid increased mobility, and then from 0.3 to 1.92 μM , planaria behaved like controls. At the molecular level, the reduction in locomotion at 7.8 μM nicotine was teamed with a slight overexpression of the *ache2*, a putative acetylcholine esterase gene. And the increase in motility at 0.01 μM imidacloprid was accompanied by a slight under-expression of the *cat2* (putative choline acetyl-transferase) gene and two genes encoding putative nicotinic receptor subunits, *nicor3* and *nicor4*. This study contributes to the development of the planarian as a simplified model for studying the nervous system in (eco)toxicology.